



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΈΣ ΣΕΙΡΕΣ ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10»

ΖΑΜΑΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ





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

Bachelor's Thesis

«STUDY OF THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF HYPOXIA-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR HIF-2α IN NEUROBLASTOMA CELL LINES AND INVESTIGATION OF ITS INTERACTION WITH ATAXIN-10 PROTEIN»

ZAMANIS GEORGIOS

LARISA, SEPTEMBER 2023

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων Λιάκος Παναγιώτης

Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Συνεπιβλέπων Λεωνίδας Δημήτριος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος επιτροπής Σίμος Γεώργιος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία περατώθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την καθοδήγηση του Επιβλέποντα Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Λιάκο Παναγιώτη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου χαρά για την εποικοδομητική συνεργασία με τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Λιάκο Παναγιώτη. Επιπρόσθετα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη συνολική προσέγγιση της διπλωματικής εργασίας μου από την ανάθεση της, τον πειραματικό σχεδιασμό της μέχρι την ολοκληρωμένη προφορική και γραπτή παρουσίασή της. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για το γεγονός αφενός ότι δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική εργασία σε συνεργασία μαζί του και αφετέρου ότι προσπάθησε να συνδυάσει το κατάλληλο ερευνητικό project με το σύνολο των επιθυμιών μου. Επιπλέον μέσα από αυτή την προσέγγιση με περιήγησε αβίαστα μέσα από όλα τα στάδια μια ερευνητικής διαδικασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Λεωνίδα Δημήτριο για τη μετάδοση των βασικών γνώσεων της Βιοχημείας και για την πρώτη εργαστηριακή εμπειρία στα πλαίσια του μαθήματος. Ακόμη για την αποδοχή του αιτήματός να βρίσκεται στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για τη συνεισφορά του στη διεκπεραίωση της εργασίας μέσω των επισημάνσεών του.

Στο πλαίσιο αυτό οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας κ. Σίμο Γεώργιο που μου έδωσε την ευκαιρία να υλοποιήσω την παρούσα διπλωματική εργασία στο εργαστήριο. Επιπλέον για το γεγονός ότι δέχτηκε να αποτελεί μέλος της επιτροπής της διπλωματικής εργασίας. Σημαντική ήταν η συμβολή του τόσο για τη βελτιστοποίηση της διπλωματικής εργασίας μέσω των στοχευμένων υποδείξεων όσο και της συνολικής παρουσίας στο εργαστήριο μέσω των σεμιναρίων.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρ Δισερή Κατερίνα για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε καθώς και για την υπομονή και επιμονή της προκειμένου να με βοηθήσει στην κατανόηση και την εκτέλεση των πειραμάτων. Μέσα από τη συνεργασία έλαβα σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη διαχείριση των εργαστηριακών συνθηκών.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας, τα όποια καθόλη τη διάρκεια ήταν πρόθυμα να παρέχουν βοήθεια και συμβουλές. Επιπλέον ήταν ιδιαίτερα φιλικοί κάτι το οποίο προσέφερε στο ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ПЕРІЛНҰН	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 MOPIAKO ОΞΥΓΟΝΟ (O ₂)	10
1.2 ҮПОЕІА	10
1.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤ HIF 11	ΈΣ
1.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙF-1α	12
1.5 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙF-2α	13
1.6 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙF-3α	14
1.7 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ HIF-1β Η ARNT	15
1.8 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΗΙF-2α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ	15
1.9 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α	16
1.10 ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2	17
1.11 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α	18
1.11.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	18
1.11.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ	19
1.11.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΣΕ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟ ΕΠΙΠΕΛΟ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ	20
1.11.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΣΕ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟ ΕΠΙΠΕΛΟ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	23
1.12 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α ΑΠΟ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	28
1.13 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	29
1.14 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2 ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ	33
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
3. YAIKA-ME@O4OI	35
3.1 YAIKA	35
3.1.1 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	35
3.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΒL21 RIL	35
3.1.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pGEX-4T1	36
3.1.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΤΗΡΙΑ	36
3.1.5 ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	36
3.1.6 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α	37
3.1.7 ANTIΣΩMATA	37
3.1.8 ДІАЛУМАТА	37

<i>3.2 МЕООЛОІ</i>	12
3.2.Ι ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	12
3.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	1 5
<i>3.3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</i>	54
<i>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i>	54
4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ U87MG ΚΑΙ Τ98G ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ6	54
4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385 ΣΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ U87MG ΚΑΙ T98G 6	55
4.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΗΙF-2α6	59
4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΘΕΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa	2
4.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa	7 5
5. $\Sigma YM\Pi EPA\Sigma MATA - \Sigma YZHTH\Sigma H$	/8
5.1 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΗΙF-2Α ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385 ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ U87MG ΚΑΙ T98G	79
5.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΘΕΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-108	30
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	33

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρουσία του μοριακού οξυγόνου (O₂) είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη ζωή των αερόβιων οργανισμών. Ωστόσο υπάρχουν χρονικοί περίοδοι, όπου οι οργανισμοί, οι ιστοί και τα κύτταρα αντιμετωπίζουν περιορισμένη διαθεσιμότητα O₂, ένα φαινόμενο που ονομάζεται υποξία (1%O₂). Μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η υποξία παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η εμβρυογένεση, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος με το σχηματισμό συμπαγών όγκων. Τα κύτταρα αποκρινόμενα στις συνθήκες υποξίας επάγουν τη έκφραση γονιδίων τα οποία συμμετέχουν σε διαδικασίες που ρυθμίζουν τον επαναπρογραμματισμό της κυτταρικής λειτουργίας με στόχο τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού. Όλες οι παραπάνω διεργασίες συντονίζονται μέσω της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.

Ο επαγόμενος από την υποξία HIF-2 συμπεριλαμβάνεται στους κύριους μεταγραφικούς ενεργοποιητές της κυτταρικής προσαρμογής στην υποξία. Ο HIF-2 αποτελεί ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο, το οποίο σχηματίζεται από μια ευαίσθητη στο οξυγόνο HIF-2α υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη HIF-β υπομονάδα ανεξάρτητη από μεταβολές του οξυγόνου, που καλείται ARNT. Η ρύθμιση της έκφρασης και της δράσης του έχει δειχθεί ότι εκτός από τα επίπεδα του οξυγόνου ρυθμίζεται και από ανεξάρτητους από το οξυγόνο παράγοντες, όπως από την αλληλεπίδραση του HIF2 με άλλες πρωτεΐνες ή μεταγραφικούς παράγοντες. Πρόσφατα αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υποδεικνύουν ότι η HIF-2α υπομονάδα σε συνθήκες υποξίας, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 και ρυθμίζει την δραστικότητα του HIF-2. Παρόλο που η πρωτεΐνη ATAXIN-10 έχει συσχετιστεί με τη νευροεκφυλιστική ασθένεια Spinocerebellar ataxia type, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την έκφρασή της σε όλους τους ιστούς.

Επομένως μελετήθηκε η ρύθμιση της έκφρασης και της μεταγραφικής δράσης της υπομονάδας HIF-2α παρουσία του ειδικού αναστολέα PT2385 στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG και T98G. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι ο HIF-2α εκφράζεται στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, καθώς και ότι η έκφρασή του και η μεταγραφική του δραστικότητα επάγονται σε συνθήκες υποξίας. Η παρουσία του ειδικού αναστολέα PT2385 σε συνθήκες υποξίας δεν μεταβάλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α, ενώ μειώνει σημαντικά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου-στόχος PAI-1 σε συνθήκες υποξίας. Τα πειράματα μελέτης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός τους αυξάνεται σε υποξία τις πρώτες 24 ώρες σε σχέση με τη νορμοξία, ενώ τις επόμενες 24 ώρες φαίνεται να αντιστρέφεται αυτό το φαινόμενο και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η πιθανή θέση της νέας αλληλεπίδρασης της υπομονάδας HIF-2α με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 σε κύτταρα HeLa, *in vitro*. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου έγινε μελέτη της αλληλεπίδρασης των υπερεκφρασμένων τμημάτων του HIF-2α με την ενδογενή αλλά και την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη ATAXIN-10 σε κύτταρα HeLa. Από τα αποτελέσματα φαίνεται η πρωτεΐνη ATAXIN-10 φαίνεται να αλληλεπίδρά άμεσα με το τμήμα 542-870 του HIF-2α.

Τα αποτελέσματα της ανάδειξης της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την παραπάνω πρωτεΐνη υποδεικνύουν τη συμμετοχή του HIF-2α σε λειτουργίες των νευρικών κυττάρων, οι οποίες και διερευνήθηκαν στην παρούσα διπλωματική. Ωστόσο τα παραπάνω δεδομένα χρήζουν περισσότερης μελέτης για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τα νέα αυτά δεδομένα αναμένεται να συμβάλλουν στην βελτίωση της γνώσης των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του HIF-2.

ABSTRACT

The presence of molecular oxygen (O_2) is indissolubly associated with the existence of aerobics organisms Nonetheless, there are brief periods of time when the bioavailability of oxygen is greatly constrained at the organism, tissue, and cell levels. This phenomenon is called hypoxia (1%O₂). A plethora of scientific studies have shown that hypoxia could be observed both in normal conditions, such as embryogenesis, and in pathological conditions, such as cancer, where solid tumors form. Under hypoxic conditions, cells promote the expression of genes required for cellular function reprogramming with thew goal of preserving organism's homeostasis.

HIF-2 (Hypoxia inducible factor-2) is one of the key transcriptional activators of cellular adaptation to hypoxia. HIF-2 is a heterodimeric complex formed by an oxygensensitive HIF-2 α subunit and a stably expressed HIF- β subunit independent of oxygen changes, called ARNT. In addition to oxygen levels, oxygen-independent variables such as HIF-2 interaction with various proteins or transcription factors have been demonstrated to regulate its expression and activity. Recent unpublished findings of the University of Thessaly's Biochemistry Laboratory of Medicine show that the HIF-2 subunit interacts with ATAXIN-10 protein and regulates its HIF-2 activity in hypoxic situations. Whereas, ATAXIN-10 has been linked to the neurodegenerative disorder Spinocerebellar ataxia type, there is evidence that it is expressed in all organs.

Namely, the modulation of HIF-2 subunit expression and transcriptional action was examined in glioma cells U87MG and T98G in the presence of the specific inhibitor PT2385. The findings reveal that HIF-2 is expressed in glioma cells and that its expression and transcriptional activity are enhanced by hypoxia. Moreover, it is shown that the addition of the selective inhibitor PT2385 in hypoxic settings has no effect on HIF-2 protein levels while drastically lowering PAI-1 target gene mRNA levels. Notably, the experiments that conducted for the evaluation of the proliferation levels of glioblastoma cells revealed that their proliferation rises at hypoxia in the first 24 hours compared to normoxia, but this impact appears to be reversed in both cell lines in the following 24 hours.

The second part of this thesis investigated the possible site of the novel interaction of the HIF-2 α subunit with the ATAXIN-10 protein in HeLa cells, *in vitro*. To achieve this goal, the interaction of the overexpressed portions of HIF-2 α with both endogenous and overexpressed ATAXIN-10 protein was studied in HeLa cells. From the results it appears that ATAXIN-10 protein directly interacts with the 542-870 segment of HIF-2 α . The results highlighting the interaction of HIF-2 with ATAXIN-10 show the role of HIF-2 in nerve cell functions studied in this thesis. However, the above data need further study to confirm the results. These new data are expected to contribute to improve the knowledge of the molecular mechanisms of HIF-2 regulation.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 MOPIAKO ΟΞΥΓΟΝΟ (O₂)

Η παρουσία του μοριακού οξυγόνου (O2) στην ατμόσφαιρα της Γης αν και δε συνδέεται με την εμφάνιση των πρώτων μορφών ζωής στον πλανήτη προοδευτικά κατέκλυσε την ατμόσφαιρα της Γης και κατά επέκταση τα συστήματα οργάνωσης των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών λειτουργώντας ως δείκτης εξέλιξης στην αρχή. Αυτή η εγκαθίδρυση ξεκίνησε πριν από περίπου 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια από τη φωτοσύνθεση αναερόβιων βακτηρίων (Κυανοβακτήρια) άμεση συνέπεια της οποίας ερμηνεύεται από το τετράπτυχο ελεύθερο οξυγόνο στην ατμόσφαιρα, οξειδωτικές αντιδράσεις, περισσότερες χημικές αλληλεπιδράσεις και αποτελεσματικότερη χρήση ενέργειας [Baracaldo and Cardona, (2019)]. Αδιαμφισβήτητη ήταν η σύνδεση του με το μεταβολισμό και τις υπόλοιπες φυσιολογικές λειτουργίες των θηλαστικών εξαιτίας της συμμετοχής του στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας και του ρόλου ως συμπαράγοντα για πολλά ένζυμα [Choudhry and Harris, (2018)]. Βάσει αυτού πολλοί οργανισμοί παρουσιάζουν μια οξυγόνο-εξαρτώμενη επιβίωση και για το λόγο αυτό έχουν αναπτύξει καρδιοαγγειακά και αναπνευστικά συστήματα ικανά να διατηρήσουν την ομοιόσταση (μηγανισμός παροχής και κατανάλωσης) του μοριακού οξυγόνου [Zepeda et. al, (2013)]. Η δράση της συγκεκριμένης έφερε στην επιφάνεια τρεις (3) όρους για την περιγραφή της συγκέντρωσης του O_2 σε κυτταρικό επίπεδο, οι οποίοι είναι i) υποξία (0.1-1% O₂), ii) νορμοξία (21% O₂) και iii) υπεροξία (>21% O₂). Αναδεικνύοντας παράλληλα ότι η βιοδιαθεσιμότητα του μοριακού Ο2 περιγράφεται από μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην κυκλοφορία του αίματος και τον κορεσμό του O₂ [Mendoza et. al, (2023)]. Επιπρόσθετα έχουν επιφορτιστεί και με την ομαλή κατανομή του Ο2 στους διάφορους ιστούς. Στους τελευταίους λειτουργεί ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίου στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάδοση της χημικής ενέργειας εντός των μιτοχονδρίων για την παραγωγή ενέργειας μέσω σύνθεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Έτσι λοιπόν η ζωή ορίζεται ως μια διαδικασία που απαιτεί υψηλά ενεργειακά κόστη [Bogdanova et. al, (2016)]. Βέβαια το ίδιο το οργανίδιο σε συνθήκες απόκλισης από το O2 είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS, το οποίο αλληλεπιδρά με κυτταρικά μακρομόρια διαταράσσοντας την ισορροπία της κυτταρικής λειτουργίας, οδηγώντας σε ένα φαινόμενο περιορισμένης συγκέντρωσης Ο2 που καλείται υποξία (1% Ο2) [Semenza, (2012)].

1.2 ΥΠΟΞΙΑ

Οι οργανισμοί, οι ιστοί και τα κύτταρα σε κάποιες περιόδους της ζωής τους έρχονται αντιμέτωποι με ανεπαρκή διαθεσιμότητα O₂ ή υποξία τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές συνθήκες [Patel and Simon, (2008)]. Όσον αφορά το πρώτο σκέλος η υποξία συμμετέχει κατά το στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στην έντονη άσκηση ευνοώντας την ερυθροποίηση και την αγγειογένεση [Befani and Liakos, (2018)].

Η κύρια δράση του σχετίζεται με την ισχαιμία, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τη φλεγμονή και το σχηματισμό συμπαγών όγκων [Ruan et. al, (2009)]. Σε απόκριση στις συγκεκριμένες συνθήκες τα κύτταρα αυξορρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως ο επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού, η ερυθροποίηση, η εισβολή και η μετάσταση [Rankin and Giaccia, (2016)]. Επίσης στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως υποξία στους συμπαγείς καρκίνους προσφέρει αντίσταση στην ακτινό- και χημειο-θεραπεία [Zhao et. al, (2015)]. Αυτό το συγκεκριμένο μοτίβο αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο συντονίζεται μέσω της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων ΗΙF (Hypoxia-inducible-factors) [Gkotinakou et. al, (2019)].

1.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΗΙΓ

Η ανακάλυψη των μεταγραφικών παραγόντων επαγόμενων από την υποξία ως κεντρικών ρυθμιστών στη διατήρηση της ομοιόστασης Ο2 πραγματοποιήθηκε από το Semenza το 1992 [Zhang et. al, (2021)]. Η δράση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF αποκαλύπτει ότι αποτελούν ετεροδιμερή σύμπλοκα των οποίων η δομή ακολουθεί τη βασική διαμόρφωση έλικας-βρόχου-έλικας με χαρακτηριστικές επικράτειες (bHLH)/Per-Arnt-Sim (PAS) [Patel and Simon, (2008)]. Οι ΗΙΓ αποτελούνται από μια ασταθή οξυγόνο-εξαρτώμενη ΗΙΓ-α υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη και ανεξάρτητη από μεταβολές του οξυγόνου πυρηνική HIF-β υπομονάδα που καλείται ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Όσον αφορά την HIF-α υπομονάδα έχουν ταυτοποιηθεί τρείς (3) ισομορφές που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος [Yeo, (2019)]. Όταν η συγκέντρωση του Ο2 βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα τότε αυτό αποτελεί υπόστρωμα για συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων τα οποία επιδρούν με δύο (2) διαφορετικούς τρόπους στην παραγόμενη πρωτεΐνη HIF-α υπομονάδα. Η πρώτη προσέγγιση στοχεύει είτε στην οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση με τροποποίηση πλευρικών αλυσίδων αμινοξικών καταλοίπων είτε στην αδρανοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας κατά συνέπεια να είναι δυνατή η παραγωγή αλλά όχι η πρόσδεση στα ειδικά στοιχεία απόκρισης στην υποξία(HREs) στον πυρήνα [Webb et. al, (2009)]. Με την επικράτηση συνθηκών υποξίας αίρονται οι δράσεις των προηγούμενων ενζύμων με συνέπεια την παραγωγή να ακολουθεί η σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-α στο κυτταρόπλασμα και έπειτα να μετατοπίζεται στον πυρήνα μέσα στον οποίο πραγματοποιείται η συμπλοκοποίηση με τη β-υπομονάδα και έναρξη της μεταγραφικής δράσης ύστερα από την πρόσδεση του συμπλόκου στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία με τη συναφής αλληλουχία G/ACGTG που αποκαλούνται ως HREs (Hypoxia Response Elements) που βρίσκονται εντός υποκινητών ή ενισχυτών γονιδίων που ρυθμίζουν την προσαρμογή σε αυτές [Befani and Liakos, (2018)].



Εικόνα 1: Οι ισομορφές της ΗΙF-α υπομονάδας και η ΗΙF-β υπομονάδα με τις χαρακτηριστικές τους επικράτειες των επαγόμενων από την υποζία μεταγραφικών παραγόντων ΗΙF (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BioRender**).

1.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙΓ-1α

Η πρώτη και πιο μελετημένη ισομορφή των ΗΙΕ είναι ο ΗΙΕ-1α. Στα θηλαστικά ο ΗΙΕ-1α κωδικοποιείται από την αλληλουχία του γονιδίου HIF1A χαρτογραφείται στο γρωμόσωμα 14q23.2. Ο ρόλος του ως κεντρικό ρυθμιστής στην απόκριση στην υποξία δικαιολογεί την πανταχού παρούσα έκφραση σε όλους τους κυτταρικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα η σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-1α ρυθμίζεται μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών PI3K και MAPK [Semenza, (2003)]. Η πρωτεϊνική αλληλουγία του HIF-1α συνιστάται συνολικά από 826 αμινοξέα που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 93kDa. Η δράση του εκδηλώνεται κατόπιν ετεροδιμερισμού εντός του πυρήνα με την ομόλογη υπομονάδα HIF-β όσον αφορά τη βασική δομή έλικα-στροφή-έλικα [Soni and Padwad, (2017)]. Αναλυτικά και οι δύο (2) υπομονάδες στην αμινοτελική αλληλουχία κατά σειρά χαρακτηρίζονται από μία (1) bHLH επικράτεια που τους δίνει τη δυνατότητα να προσδένονται σε κατάλληλες αλληλουχίες DNA και μάλιστα σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων που ελέγχονται από τον συγκεκριμένο. Καθοδικά εντοπίζονται δύο (2) επικράτειες PAS-A και PAS-B μέσω των οποίων συντελείται ο ετεροδιμερισμός ανάμεσα στην υπομονάδα HIF-1α και HIF-1β. Προκύπτει ότι η λειτουργική διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο (2) υπομονάδες έγκειται στην παρουσία δύο (2) επικαρατειών συν-ενεργοποίησης TAD (Transactivation domains) στο καρβοξυτελικό μισό του HIF-1α. Η ποιοτική σύσταση των αμινοξέων που τις συνθέτουν ευνοεί τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α, οι οποίες έχουν αντίκτυπο στη σταθερότητα (N-TAD) και στη μεταγραφική δραστικότητα (C-TAD) της υπομονάδας. Η πρώτη επίσης εμπεριέχεται σε μία ευρύτερη επικράτεια, η αλλαγή της οποίας ελέγχει την οξυγονο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση [Infantino et. al, (2021)]. Η επαγωγή της μεταγραφικής δραστικότητας του HIF-1α κατά την υποξία ανιχνεύεται με την ενίσχυση γονιδίων που αφορούν το μεταβολισμό της γλυκόζης και του σιδήρου όπως επίσης και την επιβίωση [Lee et. al, (2004)] (Mylonis et al 2008).

1.5 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙΓ-2α

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο EPAS1 στα θηλαστικά που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 2p21 και ανιγνεύεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η συγκεκριμένη ταυτοποίηση της έδωσε και την ονομασία EPAS1 (endothelial PAS domain protein). Επιπλέον εναλλακτικές αναφορές αξιοποιούνται όπως HLF (HIF-like factor) και MOP2 (member of PAS superfamily) που απορρέουν από τη δομική της σύσταση. Η πρωτεΐνη συντίθεται από 870 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιγούν σε μοριακό βάρος 96kDa. Η αμινοξική της αλληλουχία παρουσιάζει ποσοστό ομολογίας 48% με την αντίστοιχη του HIF-1α [Patel and Simon, (2008)]. Αναλυτικά στο αμινοτελικό άκρο φέρει ένα μοτίβο της μορφή bHLH που ευνοεί την αλληλεπίδραση και την πρόσδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που αποκαλούνται ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE και το οποίο εμφανίζει 90% ομολογία με τον HIF-1α. Αυτού έπονται δύο (2) σχεδόν ίδιου μήκους αμινοξικές επικράτειες PAS-A και PAS-B, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό με την υπομονάδα ARNT προς τη δημιουργία ενεργού μεταγραφικά συμπλόκου και τα οποία συνολικά έχουν 70% ομολογία με τον HIF-1α. Άλλη μια επικράτεια επονομαζόμενη C-TAD στο καρβοξυτελικό άκρο είναι αναγνωρισμένη πως συμβάλλει επίσης στη μεταγραφική δραστικότητα μέσω αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές όπως CBP/p300 (CREB-binding protein/E1A binding protein p300). Λειτουργία κοινή στα δύο (2) πρώτα μέλη των HIF δικαιολογείται από το υψηλό ποσοστό συντήρησης των αμινοξικών αλληλουχίων (περίπου 50 αμινοξέα συμπεριλαμβανομένου του καταλοίπου ασπαραγίνης Asn) [Hu et. al, (2003)]. Η αντίστοιγη επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης N-TAD εμφανίζει ένα μικρότερο ποσοστό ομολογίας βασιζόμενο πάνω στο οποίο έχει στηριχτεί πως η συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία εξειδικεύει τη μεταγραφική στόχευση γονιδίων αποκλειστικά από τον HIF-2α, μέσω αλληλεπίδρασης με διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Συνολικά τα μοτίβα TADs εμφανίζουν την μικρότερη ομολογία με τον HIF-1α περίπου στο 40%. Πιθανόν αυτή η έντονη διαφοροποίηση στα μοτίβα TADs συμβάλλει και στο γεγονός της ιστοειδικής έκφρασης του HIF-2α, η οποία περιορίζεται σε ιστούς όπως το ενδοθήλιο, η καρδιά, ο εγκέφαλος και το έντερο [Wiesener et. al, (2003)]. Επιπλέον από τις επικράτειες ρύθμισης της μεταγραφικής δραστικότητας εντοπίζεται και μια οξυγονο-εξαρτώμενη επικράτεια υπεύθυνη για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης που ονομάζεται ODDD (oxygen-dependent degradation domain) στην οποία υπάρχει 80% ομολογία με τον HIF-1α. Αναλυτικά ο συγκεκριμένος μηγανισμός βασίζεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης που πυροδοτούνται από τα επίπεδα της συγκέντρωσης του Ο2. Σε νορμοξικές καταστάσεις εκτελείται η αποικοδόμησή του στο κυτταρόπλασμα, ενώ κατά την υποξία ο HIF-2a σταθεροποιείται και εισέργεται στον πυρήνα όπου διακρίνεται με στικτό εντοπισμό γύρω από την ενεργή πολυμεράση του RNA, χαρακτηριστικό που προσφέρει καλύτερη πρόσβαση σε ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων στόχων [Befani and Liakos, (2018)].

Στη δεύτερη περίπτωση η στόχευση στον πυρήνα ευνοείται από δύο (2) μικρές επικράτειες στα άκρα της πρωτεΐνης που αντικατοπτρίζουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού γνωστά ως NLS (nuclear localization signal) [Luo and Shibuya, (2001)].



Εικόνα 2: Η δομή του μεταγραφικού παράγοντα ΗΙΓ-2α και η ομολογία των συντηρημένων επικρατειών με την ΗΙΓ-1α (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BioRender**).

1.6 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΗΙΓ-3α

Το τρίτο μέλος στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF είναι ο HIF-3a του οποίου το γνωστικό υπόβαθρο είναι περιορισμένο εξαιτίας των πολλαπλών παραλλαγών ματίσματος του γονιδίου HIF-3α. Στον άνθρωπο η ομώνυμη γονιδιακή αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-3α εκτείνεται σε 43kb πάνω στις γρωμοσωμικές συντεταγμένες 19q13.2 [Gu et. al, (2021)]. Το προϊόν της έκφρασης εντοπίζεται κυρίως σε ιστούς όπως ο η καρδιά, ο πνεύμονας και οι νεφροί και αποτελείται από 667 αμινοξέα που αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 72kDa [Yang et. al, (2015)]. Η δομική ανάλυση αυτής αναδεικνύει πως ο HIF-3α διατηρεί με την ίδια σειρά τα μοτίβα (bHLH, PAS-A και PAS-B) που είναι απαραίτητα για τη δράση ως μεταγραφικού συμπλόκου όπως επίσης και την επικράτεια ODD μέσω της οποίας ανιχνεύονται τα επίπεδα οξυγόνου και τελούνται οι αντίστοιχες τροποποιήσεις. Η ίδια φανέρωσε πως το μικρότερο μέγεθος της σε σχέση με τις άλλες διαπιστώνεται και από την απουσία της καρβοξυτελικής επικράτειας συν-ενεργοποίησης (C-TAD). Μάλιστα το καρβοξυτελικό άκρο διακρίνεται από την επικράτεια μοτίβου φερμουάρ λευκίνης (LZIP). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης τόσο μεταγραφικά όσο και έναντι των δύο (2) άλλων μελών της οικογένειας είναι ακόμα αμφιλεγόμενος [Duan, (2016)]. Σύμφωνα με τελευταίες έρευνες η κύρια δράση του φαίνεται να εστιάζει στην ανασταλτική σύνδεση με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α στο κυτταρόπλασμα αποτρέποντας την μετατόπιση τους στον πυρήνα με άμεση συνέπεια τη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας [Heikkila et. al., (2001)]. Παρά το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση του HIF-3α με τον HIF-2α δεν είναι τόσο ισχυρή, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει την πυρηνική στόχευση η μεταγραφική δράση του δεύτερου περιορίστηκε καθώς συνδεόταν άμεσα την υπομονάδα HIF-1β [Kim et. al, (2015)].

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Όλα τα παραπάνω συγκλίνουν στην άποψη ότι ο HIF-3α καταστέλλει τη μεταγραφική δραστικότητα του HIF-1α και HIF-2α και επάγει την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από τον ίδιο, αναδύοντας πιθανόν ένα διαφορετικό τρόπο προσαρμογής στην υποξία [Zhang et. al, (2014)].

1.7 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ ΗΙ**Γ-1**β Η ARNT

Ο σταθερά εκφραζόμενος παράγοντας επαγόμενος από την υποξία HIF-1β (hypoxiainducible-factor), ο οποίος είναι γνωστός και ως ARNT (Aryl hydrocarbon nuclear translocator) διακρίνεται σε δύο (2) ισομορφές στον άνθρωπο (ARNT-1, ARNT-2). Η κωδικοποιητική αλληλουγία του γονιδίου arnt εντοπίζεται στη γρωμοσωμική θέση 1q21 και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση πρωτεΐνης αποτελούμενης από 789 αμινοξέα, μήκος που αντιστοιγεί περίπου σε 87kDa [Mandl & Depping, (2014)]. Η δομική σύσταση του ARNT του επιτρέπει να συμμετέχει σε δύο (2) διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ανταποκρίνονται σε ξεχωριστά περιβαλλοντικά ερεθίσματα αυτό του υποδογέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) και των HIF. Αναλυτικά τα μοτίβα PAS-A και PAS-B ευνοούν τον ετεροδιμερισμό με παράγοντες που είναι επιφορτισμένοι με την ανίχνευση του ερεθίσματος σε κάθε περίπτωση. Επιπρόσθετα ο ARNT φέρει μια αμινοξική αλληλουγία πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal) μέσω της οποίας διαμεσολαβείται η είσοδος στον πυρήνα με τη βοήθεια του πρωτεϊνικού συστήματος ιμπορτίνης. Η απουσία της οξυγόνο-εξαρτώμενης επικράτειας σίγουρα αποκαλύπτει την απευαισθητοποίηση ως προς την παρουσία του οξυγόνου. Από την άλλη όμως πρόσφατες μελέτες σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι η υποξία αυξάνει τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του ARNT, φέρνοντας στο προσκήνιο νέες ρόλους κατά την καρκινογένεση [Rahman & Thomas, (2018)].

1.8 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΗΙ**Γ-2α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ**

Η συμμετοχή της στο ετεροδιμερές σύμπλοκο του μεταγραφικού παράγοντα επαγόμενου από την υποξία HIF-2 κατόπιν συνδυασμού με την ιδιοσύστατα εκφραζόμενη HIF-1β υπομονάδα (ARNT) δημιουργεί τις συνθήκες ώστε η ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας να πραγματοποιείται σε πολλαπλά επίπεδα και εντός δύο (2) υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Ο εντοπισμός του στο κυτταρόπλασμα ευνοεί τη λειτουργία της επικράτειας ODD ως αισθητήρα των συγκεντρώσεων του O₂ επάγοντας την οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση που περιλαμβάνει κυρίως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που εφαρμόζονται σε πλευρικές αλυσίδες συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων. Οι μετα μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να πυροδοτηθούν και από μηχανισμούς ανεξάρτητους από το μοριακό οξυγόνο όπως η επίδραση σηματοδοτικών μονοπατιών αυξητικών παραγόντων. Πάνω σε αυτές στηρίζεται και η ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου ΕΡΑS1 και μετάφρασης του mRNA του HIF-2α αλλά και η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες εντός του πυρήνα. Το σύνολο των μηχανισμών μοριακών και ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της σταθερότητας και της δραστικότητας του HIF-2α.

1.9 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α

Κατά την ομαλή λειτουργία της ομοιόστασης του μοριακού O2 η υπομονάδα HIF-2a μεταγράφεται και εκφράζεται σταθερά [Befani & Liakos, (2018)]. Παράλληλα όταν η δυναμική ισορροπία βιοδιαθεσιμότητας του μοριακού Ο2 διατηρείται σταθερή συνεπάγεται επαρκή παρογή Ο2, το οποίο σε συνδυασμό με το μεταβολικό προϊόν ακετογλουταρικό και την παρουσία σιδήρου ως συμπαράγοντα αποτελούν υπόστρωμα για μια εξειδικευμένη οικογένεια ενζύμων που ονομάζεται διοξυγενάσες [Qing & Simon, (2009)]. Μέλος της οικογένειας αυτής είναι οι υδροξυλάσες καταλοίπων προλίνης γνωστές ως PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain), οι οποίες κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου Ο2 (νορμοξία) εξασφαλίζουν τα απαραίτητα συστατικά δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο ένα σύμπλοκο, η καταλυτική περιοχή του οποίου αναγνωρίζει το ειδικό μοτίβο LNNLAP εντός της οξυγόνο-εξαρτώμενης επικράτειας ODD της υπομονάδας του HIF-2α [Chowdhury et. al, (2009)]. Αυτή η αναγνώριση επάγει την υδροξυλίωση ενός ή και των δύο (2) συντηρημένων καταλοίπων προλίνης στις θέσεις 405 και 531, η οποία αποτελεί έναυσμα στρατολόγησης του ογκοκατασταλτικού παράγοντα von Hippel-Lindau (VHL). Ως μέλος συμπλόκου ουβικουϊτίνης στις συγκεκριμένες θέσεις πυροδοτείται η προσέλκυση ομότυπων παραγόντων Cullin-2, Elongin και Ring-Box για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου με δράση ενζύμου Ε3-λιγάσης που εκκινεί το μονοπάτι πολύ-ουβικουϊτίνωσης της πρωτεΐνης HIF-2α και την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος 26S με χρόνο ημιζωής περίπου τα 5 λεπτά. [Alabanese et. al, (2021)-Shen & Kaelin, (2013)]. Ένας παρόμοιος μηγανισμός που εστιάζει στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστικότητας του HIF-2α καταλύεται από τον FIH (factor inhibiting HIF), ο οποίος εμφανίζει δραστικότητα υδροξυλάσης ασπαραγίνης και επίσης ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών. Φυσικό επακόλουθο είναι πως η δράση του σχετίζεται άμεσα με την παρουσία του οξυγόνου και του σιδήρου. Αναλυτικά η φυσιολογική κυτταρική ομοιόσταση επιτρέπει την υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης στη θέση 847 που εντοπίζεται στην αλληλουχία CX(D/N)XXXX(P/Y)XCXC στο καρβοξυτελικό άκρο και μάλιστα εντός της επικράτειας C-TAD [Linke et. al, (2004)]. Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση στη συγκεκριμένη θέση διαταράσσει τη διαμόρφωση γεγονός που αποτρέπει την πρόσδεση του συν-ενεργοποιητή CBP/p300 στην επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD του HIF-2α, επιδρώντας ανασταλτικά. Το φαινόμενο υδροξυλίωσης των πολικών καταλοίπων κατά μήκος κυρίως του καρβοξυτελικού άκρου της HIF-2α υπομονάδας φαίνεται να περιορίζεται ή ακόμα να εξαλείφεται σε συνθήκες υποξίας καθώς η απουσία τόσο του ίδιου του οξυγόνου όσο και των συστατικών που παράγονται από τον μεταβολισμό θέτουν τις διοξυγενάσες μερικώς ενεργές ή ανενεργές αντίστοιχα. Κατά αυτό τον τρόπο η HIF-2α υπομονάδα σταθεροποιείται, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν μετατοπίζει στον πυρήνα, όπου σγηματίζει ετεροδιμερή με τον ARNT και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας με την πρόσδεση σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων για την προσαρμογή στην υποξία.



Εικόνα 3: Η ενεργοποίηση των μονοπατιών υδροζυλίωσης ορισμένων καταλοίπων του HIF-2 κατά τη νορμοζία και το αντίκτυπό τους στη δραστικότητα και τη μεταγραφική δράση του HIF-2α και η αναστολή των συγκεκριμένων τροποποιήσεων σε συνθήκες υποζίας (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BioRender**).

1.10 ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2

Κύριος στόχος της δράσης του HIF-2α ως μεταγραφικού παράγοντα είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων, η οποία συντελείται μέσω της αναγνώρισης ειδικών μοτίβων σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (γνωστά ως HREs) που εντοπίζονται ανοδικά και μάλιστα εντός της ρυθμιστικής αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου από το μοτίβο bHLH του HIF-2α. Η δομική του σύσταση και η ομολογία με τον HIF-1α του επιτρέπουν να συμμετέχει τόσο σε λειτουργίες που ελέγχονται από κοινού από τον HIF-2 αξιοποιώντας το μοτίβο C-TAD όπως συμβαίνει στο μεταβολισμό, στην αγγειογένεση και στην απόπτωση όσο και σε λειτουργίες που ελέγχονται από τον HIF-2α μέσω του N-TAD μεταξύ άλλων η ερυθροποίηση, η ινωδόλυση και η βλαστικότητα. Βέβαια υπάρχουν μελέτες σχετικά με το γεγονός ότι στην από κοινού ρύθμιση η δράση και των δύο (2) παραγόντων HIF μπορεί να προκαλέσει αντικρουόμενα αποτελέσματα σε μια κυτταρική λειτουργία.



Εικόνα 4: Η επαγωγή κοινών και ειδικών γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α.

1.11 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α

1.11.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙ**F-2α ΣΕ ΕΠΙΠΕΛΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ**

Υπάρχουν επίσης καταστάσεις που μοιάζουν προς το υποξικό περιβάλλον (όπως φλεγμονή) και δημιουργούν τις συνθήκες για την ενίσχυση της μεταγραφής γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως γονίδια επαγόμενα στην υποξία. Κυρίαργα σε αυτή την ομάδα είναι τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HIF (HIF-1 και HIF-2) που διαμεσολαβούν για την κυτταρική προσαρμογή. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του HIF-2α έχει αντίκτυπο στη μεταγραφική ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν σχετικά με την αγγειογένεση (VEGF-a), ερυθροποίηση (EPO) και φλεγμονή (iNOS) [Abe et. al, (2017)]. Έρευνες σε μακροφάγα ποντικιών ανέδειξε την εξειδικευμένη έκφραση του HIF-2α στα πολωμένα τύπου M2 μακροφάγα. Η ενεργοποίησή του σε αυτά φαίνεται να ρυθμίζεται από την έκκριση και δράση των κυτταροκινών (IL)-4 και IL-13 που παράγονται από Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (Th2). Η επαγόμενη από τις ιντερλευκίνες παραγωγή του HIF-2α στοχεύει στην έκφραση του γονιδίου Arginase1, η αυξημένη παρουσία του οποίου ελαττώνει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO), λόγω αξιοποίησης των υποστρωμάτων [Takeda et al, (2010)]. Μάλιστα η συγκεκριμένη μεταγραφική ρύθμιση αποκαλύπτει και ένα μηγανισμό εναλλαγής ανάμεσα στις ισομορφές HIF-1α και HIF-2α το οποίο εξαρτάται από το είδος των κυτταροκινών που επιδρούν στα αντίστοιχα γονίδια. Στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα η θετική ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων και της δραστικότητας του HIF-2α πραγματοποιείται μέσω του συνδεδεμένου με τον κυτταρικό κύκλο μεταγραφικού παράγοντα E2F1. Τελευταίες έρευνες έχουν δείξει ότι στα καρκινικά κύτταρα διαπιστώνεται αυξημένη έκφραση αποουβικουϊτινάση Cezanne, η οποία δεσμεύει το μεταγραφικό παράγοντα αποτρέποντας την αποικοδόμηση και ευνοώντας την πρόσδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στον υποκινητή του γονιδίου EPAS1 [Moniz et. al, (2015)].

Άλλοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση του HIF-2a περιλαμβάνουν επιγενετικές τροποποιήσεις σε ρυθμιστικά στοιγεία του υπεύθυνου γονιδίου EPAS1. Η σημαντική δράση στην πρόοδο του καρκίνου οφείλεται σε γεγονότα που ελέγχουν την περιοχή γύρω από τη θέσης έναρξη της μεταγραφής. Μελέτες αναφέρουν πως η συμμετοχή του HIF-2α στο καρκίνο του μαστού εξαρτάται από το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή εντός των νησίδων GpC. Το συγκεκριμένο μοτίβο μπορεί να τροποποιηθεί με τη δράση της πρωτεΐνης MBD3, η οποία ύστερα από την πρόσδεση στον υποκινητή του γονιδίου ευνοεί την απομεθυλίωση της περιοχής, ενισχύοντας τη μετγραφή [Cui et. al, (2016)]. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί το HIF-2α είναι ευαίσθητο στην αναστολή της έκφρασης από τις απακετυλάσες ιστονών (class I/II HDACs) σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου [Nakazawa et. al, (2016)]. Οι τελευταίες εκδηλώνουν τη δράση τους ως μέλη συμπλόκων μεταγραφικής καταστολής, συμπεριλαμβανομένου του SIN3A. Η συμμετοχή του παράγοντα SINHCAF συνδέει τη δράση του μεταγραφικού συμπλόκου καταστολής με την απόκριση στην υποξία. Αναλυτικά ο παράγοντας SINHCAF στογεύει στον υποκινητή του γονιδίου EPAS1 και διατηρείται σε αυτόν μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1. Αμέσως μετά στρατολογεί το σύμπλοκο SIN3/HDAC η δράση του οποίου προκαλεί τη γονιδιακή αποσιώπηση του EPAS1 [Biddlestone et. al, (2018)].

1.11.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Το επόμενο στάδιο ρύθμισης συντελείται στο κυτταρόπλασμα και αφορά την ιστοειδική μετάφραση του mRNA του γονιδίου EPAS1. Τα επίπεδα του HIF-2α, όπως και του HIF-1α ελέγχονται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR με κύριο διαμεσολαβητή της ρύθμισης τον mTOR (mammalian target of rapamycin), ο οποίος δρα στοχεύοντας σε παράγοντες μετάφρασης, καθώς είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της πρωτεΐνης HIF-2α. Η εκκίνηση του μονοπατιού οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K), η οποία με τη σειρά της επάγει φωσφορυλίωση ενεργοποίησης των κινασών Akt και mTOR.

Ο παράγοντας mTOR ανάλογα με τη σύνθεση των υπομονάδων του συμμετέχει σε δύο (2) σύμπλοκα εντός του κυττάρου το mTORC1 και το mTORC2, τα οποία συντίθενται από κοινά (mLST8/GβL) και διαφορετικά (Raptor-Rictor) πρωτεϊνικά συστατικά. Ειδικά το σύμπλοκο mTORC2 συνδέεται με Rictor και με την πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με την MAPK που ενεργοποιείται κατά το στρες (mSIN1) [Martin et. al, (2022)]. Κατά το στρες ενεργοποιούνται οι οξειδάσες NOX που επάγονται από την p22phox, η οποία σταθεροποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης Rictor και κατ' επέκταση τη συναρμολόγηση του συμπλόκου mTORC2. Το mTORC2 στοχεύει στην κινάση Akt για την πλήρη ενεργοποίησή της. Παράλληλα φωσφορυλιώνει το 4E-BP1 με συνέπεια να ευνοείται η δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης eIF4E/eIF4G και απενεργοποίηση του αναστολέα tuberin και ενεργοποίηση του μονοπατιού της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 κινάσης 1/4E-BP1 με μηχανισμό που δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Συνολικά αυτή η καθοδική σηματοδότηση καθορίζεται από την οξειδωτική ρύθμιση του συμπλόκου mTORC2 και στοχεύει στη μετάφραση του mRNA του HIF-2α.

1.11.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΣΕ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

1.11.3.1 *ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ*

Η ακετυλίωση ανήκει στις αντιστρεπτές αντιδράσεις αντικατάστασης, η οποία σε μεταμεταφραστικό επίπεδο περιλαμβάνει την πρόσδεση ομάδων ακετυλίου (C3H2O) σε πρωτεΐνες που δεν εντάσσονται στην κατηγορία των ιστονών. Ειδικά σε αυτό το επίπεδο πραγματοποιείται η ακετυλίωση Ν(-αμινοτελικών) στοιχείων της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων λυσίνης (K) που καταλύεται από ένζυμα με δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης. Πολλές φορές συζευγνύεται και με την αντίστορφη διαδικασία, δηλαδή την απομάκρυνση ακετυλομάδων από τα ίδια κατάλοιπα, διαδικασία που συντελείται από τις απακετυλάσες. Αυτό το μοτίβο φαίνεται να ακολουθούν οι δραστηριότητες της CBP και της Sirt1 που απαιτούνται για τη μέγιστη σηματοδότηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α. Αναλυτικά κατά την υποξία, στην οποία σταθεροποιείται ο HIF-2α ευνοείται η σύνδεση του με την πρωτεΐνη CBP, η οποία έχει δειχθεί με πειράματα αποσιώπησης ότι ακετυλιώνει τον HIF-2α στο καρβοξυτελικό άκρο, γεγονός που έχει αντίκτυπο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δράσης του [Yoon et. al, (2014)]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι στόχος αυτής της τροποποίησης είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου Sirt1, μέσω της πρόσδεσης σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) [Chen et. al, (2012)]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συγκαταλέγεται στην οικογένεια των αποκετυλασών που είναι ευαίσθητες στο οξειδοαναγωγικό στρες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η Sirt1 εμφανίζει τη δράση απακετυλάσης σε ορισμένα κατάλοιπα λυσίνης κατά μήκος όλης της υπομονάδας HIF-2α. Η περαιτέρω τροποποίηση επιτρέπει μεγαλύτερη συνάφεια του HIF-2α για τους υποκινητές γονιδίων-στόχων του. Συνεπώς η συνδυαστική δράση ακετυλίωσης και απακετυλίωσης από διαφορετικά ένζυμα της HIF-2α υπομονάδας σε μεταμεταφραστικό επίπεδο εντείνει τη μεταγωγή σήματος που πυροδοτείται από την απόκριση στην υποξία [Dioum et. al, (2009)].

1.11.3.2 ΣΟΥΜΟΫΛΙΩΣΗ

Η συμμετοχή της σουμοϋλίωσης την καθιστά σημαντική όσον αφορά το ρόλο της κυρίως στη σταθερότητα αλλά και στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α. Περιλαμβάνει την ομοιοπολική πρόσδεση της μικρής πρωτεΐνης SUMO (small ubiquitin-related modifier) σε μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του HIF-2α, σε πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης. Όπως δηλώνει και το όνομα της πρωτεΐνης εμφανίζει μηχανισμό δράσης παρόμοιο με την ουβικουϊτίνη καθώς και αυτή απαιτεί την παρουσία των E1, E2 και E3 ενζύμων. Απλά η συγκεκριμένη διαδικασία έχει συνδεθεί κατά κύριο λόγο με έναν ρυθμιστικό ρόλο κατά την κυτταρική απόκριση στην υποξία και το οξειδωτικό στρες. Ειδικά συμμετέχει στον έλεγχο των μηχανισμών πυρηνικής μεταφοράς, αλλά γενικά λαμβάνει μέρος και στον κυτταρικό κύκλο, στην ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων [Filippopoulou et. al, (2020)].

Ο HIF-2α φέρει δύο (2) συντηρημένες θέσεις σουμοϋλίωσης καταλοίπων λυσίνης (K394, K497) για την πρωτεΐνη SUMO-2 στην αμινοτελική και ενδιάμεση επικράτεια (ODD) εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού ομολογίας σε αυτές τις θέσεις με τον HIF-1α [Hagen et. al, (2010)]. Βέβαια ύστερα από μελέτες μεταλλαξιγένεσης αναδείχθηκε ότι η κύρια θέση σουμοΰλίωσης με αντίκτυπο στη δράση του HIF-2α είναι η λυσίνη στη θέση 394. Η συγκεκριμένη τροποποίηση επιφέρει μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α, γεγονός που οφείλεται στην αποικοδόμηση του με τη συμμετοχή του RNF4 στο σύστημα πρωτεασώματος ουβικουϊτίνης κατά την υποξία. Επίσης βρέθηκε ότι η σουμοϋλίωση στη μία ή και στις δύο θέσεις δεν επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α. Επιπλέον αναφέρεται ότι η διαδικασία σουμοϋλίωσης του HIF-2α από τη SUMO-2 εξαρτάται και από άλλους παράγοντες μεταξύ των οποίων και την πρωτεάση SENP1.

1.11.3.3 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Κυρίαρχη στους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς ρύθμισης ανεξάρτητους από το οξυγόνο είναι η φωσφορυλίωση, καθώς υπάρχουν πολλές θέσεις κατά μήκος της υπομονάδας HIF-2α και εμφανίζει ποικίλους ρόλους στη ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταγραφικής δραστικότητας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α [Albanese et. Al, (2021)]. Η φωσφορυλίωση καταλύεται από μια εξειδικευμένη ομάδα ενζύμων που ονομάζονται κινάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τη γ-φωσφορική ομάδα από την ΑΤΡ (τριφωσφορική αδενοσίνη) και να την προσθέτουν σε ομάδες υδροξυλίου (-OH) των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων σερίνη (S), θρεονίνη (T) και τυροσίνη (Y) της πρωτεΐνης. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αρνητικού φορτίου του τμήματος-στόχου και τη δομική αναδιαμόρφωση. Φυσικά εντοπίζονται και ένζυμα-φωσφατάσες που καταλύουν την ακριβώς αντίθετη διαδικασία, δηλαδή την αποφωσφορυλίωση. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της υπομονάδας HIF-2α η πρώτη τροποποίηση φωσφορυλίωσης εκδηλώνεται από την πρωτεϊνική κινάση D1 (PKD1), η οποία φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο θρεονίνης στη θέση 324 (Τ-324). Η συγκεκριμένη τροποποίηση εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα SP-1, στην οποία έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο παίζει και το παρακείμενο αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης στη θέση 329 (P-329). Κατά αυτό τον τρόπο ευνοείται η δημιουργία του μεταγραφικού συμπλόκου SP1/Myc και η πρόσδεση του στους υποκινητές γονιδίων στόχων με συνεπακόλουθο την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα νιμπρίνη (NBS1), ο οποίος συμμετέχει στο μηγανισμό επιμέλειας και επιδιόρθωσης του DNA. [Gkotinakou et. al., (2019), To et. al, (2006)]. Μέσω της συγκεκριμένης διαπιστώνεται πως οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης αποτελούν μέσο για τη διάκριση της βιολογικής δράσης ανάμεσα στις υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α, μέσω αλληλεπίδρασης με διαφορετικούς συμπαράγοντες μεταγραφής.

Πρόσφατες μελέτες που εστιάζουν στην ενδιάμεση επικράτεια της υπομονάδας HIF-2α έδειξαν ότι τη σκυτάλη φωσφορυλίωσης λαμβάνει η πρωτεϊνική κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ), η οποία φωσφορυλιώνει τον HIF-2α σε δύο (2) αμινοξικά κατάλοιπα σερίνη και θρεονίνη στις θέσεις 383 και 528 (S-383, T-528) αντίστοιχα, οι οποίες οριοθετούν μια περιοχή που φέρει τα συντηρημένα μοτίβα ODD και N-TAD. Κατά τη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της φωσφορυλίωσης δείχθηκε ότι η δράση της κινάσης CK1δ εντός του οξυγόνο-εξαρτώμενου μοτίβου δεν επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-2α. Μάλιστα ο φωσφορυλιωμένος HIF-2α στις συγκεκριμένες θέσεις εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα κατά τη διάρκεια της υποξίας παρά τη συνεχή πρωτεϊνική μετάφραση. Επίσης στη συγκεκριμένη μορφή ευνοείται η μετατόπιση και η συσσώρευση του HIF-2α στον πυρήνα καθώς αποτρέπει την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα. Στηριζόμενοι σε αυτό έχει υποστηριγθεί ότι η φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ ενισχύει τη μεταγραφική δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α καθώς η παραμονή στον πυρήνα του επιτρέπει να ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και να αλληεπιδρά και με άλλους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές, γεγονότα που επάγουν την έκφραση γονιδίων για την προσαρμογή των κυττάρων [Pangou et. al, (2016)]. Παράλληλες έρευνες έδειξαν ότι η κινάση CK1δ φωσφορυλιώνει και τον HIF-1α σε ένα κατάλοιπο σερίνης που βρίσκεται στη θέση 247, δηλαδή εντός του μοτίβου PAS B, αλλαγή που παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με την υπομονάδα ARNT επιδρώντας αρνητικά στη μεταγραφική δράση του [Kalousi et. al, (2010), Kourti et. al, (2010)]. Συνεπώς, η προκαλούμενη τροποποίηση του HIF-2α από την κινάση CK1δ συμβαδίζει με την πρωτεϊνική κινάση PKD1 όσον τη διαφορική βιολογική δράση ανάμεσα στον HIF-1α και ΗΙF-2α.

Ακόμη ένα μέλος της οικογένειας των κινασών καζεΐνης είναι η πρωτεϊνική κινάση CK2, η οποία σύμφωνα με μελέτες εκδηλώνει τη δράση της αποκλειστικά σε παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των HIF. μεταγραφικούς Πιο ειδικά φωσφορυλιώνει τον HIF-2α στο καρβοξυτελικό του άκρο στο αμινοξύ θρεονίνη στη θέση 844 (Τ-844), η οποία βρίσκεται εντός της αλληλουχίας που είναι υπεύθυνη για την υδροξυλίωση του μοτίβου C-TAD. Έτσι όταν προηγείται η φωσφορυλίωση επάγεται η αλλαγή της διαμόρφωσης στη συγκεκριμένη επικράτεια, γεγονός που πιθανόν συμβάλλει στην ελάττωση της συγγένειας του HIF-2α για τον ανασταλτικό παράγοντα FIH. Ταυτόχρονα μέσω της δομικής αλλαγής αλλά και η τοπική διαφοροποίηση του φορτίου θεωρούνται απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP/p300. Αυτή η αλληλουχία διεργασιών έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α [Gradin et. al, (2002)]. Στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι η βιολογική δράση της κινάσης CK2 έχει το ίδιο αντίκτυπο και στον HIF-1α παρόλο που θρεονίνη βρίσκεται σε άλλη θέση [Mottet et. al, (2005)].

Επιπλέον μελέτες συνδέουν την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Raf/MEK/ERK με τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του HIF-2α κατά την υποξία. Το συγκεκριμένο μονοπάτι που συχνά αναφέρεται ως καταρράκτης MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) στοχεύει στην ενεργοποίηση των εξωτερικά ρυθμιζόμενων κινασών ERK1/2, οι οποίες είναι γνωστό ότι είναι επιφορτισμένες με την transενεργοποίηση γονιδίων, η οποία διαμεσολαβείται μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης των καθοδικών μεταγραφικών παραγόντων HIF. Υπό αυτές τις συνθήκες οι συγκεκριμένοι προτιμώνται ως υποστρώματα καθώς φέρουν θέσεις φωσφορυλίωσης που ικανοποιούν το μοτίβο Pro-X-Ser/Thr-Pro [Kietzmann et. al, (2016)]. Πιο ειδικά οι κινάσες ERK1/2 καταλύουν τη φωσφορυλίωση του HIF-2α στο αμινοξύ σερίνη στη θέση 672 (S-672), η οποία σύμφωνα με δομικές αναλύσεις εντοπίζεται ανάμεσα στα μοτίβα μεταγραφικής ενεργοποίησης TADs, δηλαδή εντός της ανασταλτικής επικράτειας. Αυτή η επαγόμενη φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις κινάσες ERK1/2 επικαλύπτει ένα λειτουργικό σήμα πυρηνικής εξόδου (NES) παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της εξπορτίνης CRM1 με το συγκεκριμένο μοτίβο, ελέγχοντας κατά αυτό τον τρόπο την εξαρτώμενη από την CRM1 πυρηνική μετατόπιση. Παράλληλα ρυθμίζει έμμεσα και τη δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α μέσω της διατήρησης στο πυρήνα, μέσα στον οποίο σχηματίζει ετεροδιμερή με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόγων [Gkontinakou et. al, (2019)]. Κατά αντιστοιχία μελέτες στο HIF-1α δείχνουν ότι το εξαρτώμενο από την εξπορτίνη CRM1 σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) του επικαλύπτεται επίσης όταν ένα (1) ή/και τα δύο (2) παρακείμενα κατάλοιπα σερίνης στις θέσεις 641 και 643 (S-641,643) φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες ERK1/2 [Mylonis et. al, (2008)]. Έτσι η βιολογική δράση της φωσφορυλίωσης στη συγκεκριμένη θέση συντονίζει με τον ίδιο τρόπο τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF-1α και HIF-2α.



Εικόνα 5: Οι διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης κατά μήκος του HIF-2α που επηρεάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό του και τη μεταγραφική του δράση.

1.11.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΣΕ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟ ΕΠΙΠΕΛΟ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Επιπρόσθετα στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση συμπεριλαμβάνονται και οι αλληλεπιδράσεις του HIF-2α με πληθώρα πρωτεϊνών κυρίως στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιείται στενή ρύθμιση του HIF-2α. Πιο ειδικά κάθε πρωτεΐνη ανάλογα με τη θέση σύνδεσης της μπορεί να ελέγχει τη σταθερότητα, τη μεταγραφική δραστικότητα και στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 ως προς τα γονίδια-στόχους του.

1.11.4.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙΓ-2Α ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ USF2

Ο παράγοντας USF2 (Upstream Stimulatory Factor2) ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων των οποίων η δομή ακολουθεί τη βασική διαμόρφωση έλικας-βρόγου-έλικας εμπλουτισμένη με φερμουάρ λευκίνης. Η δομική του σύσταση του επιτρέπει να εκδηλώνει τη λειτουργική του δράση είτε ως ομοδιμερές USF2/USF2 είτε ως ετεροδιμερές με το άλλο μέλος της οικογένειας USF1/USF2. Επίσης έχει την ικανότητα να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, γεγονός που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά αποκλειστικά με τον HIF-2a εντός του πυρήνα κατά την υποξία. Υπό αυτές τις συνθήκες παρατηρείται να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τον HIF-2α, τον USF2, την πολυμεράση ΙΙ του RNA και τον CBP/p300 στους υποκινητές των γονιδίων στόγων. Λειτουργικές μελέτες έγουν δείξει ότι η παρουσία του USF2 στο σύμπλοκο ευνοεί τη στρατολόγηση του συνενεργοποιητή CBP/p300 και επιπλέον εμφανίζει την ικανότητα να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (EPO, PAI-1) του HIF-2α από μόνος του, καθώς φέρουν στοιγεία πρόσδεσης του USF2 στους υποκινητές τους. Η πρώτη και πιο σύνηθες δράση του παράγοντα USF2 είναι συνυφασμένη με τη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του HIF-2 κατά την υποξία [Pawlus et. al, (2012)].

Πειράματα όμως σε κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος Huh7 παρουσία του χλωριούχου κοβαλτίου (CoCl2), το οποίο προσομοιάζει συνθήκες υποξίας έδειξαν ότι ενώ επάγεται η έκφραση του HIF-2α και των συνενεργοποιητών δεν πραγματοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-2α. Η εμβάθυνση στα πειράματα αυτά αποκάλυψε ότι η παρουσία του χλωριούχου κοβαλτίου δεν επηρεάζει γενικά τη μεταγραφή επαγόμενη από τα HREs, αλλά αναστέλλει τη μεταγραφική δραστικότητα του HIF-2, μέσω περιορισμού της αλληλεπίδρασης του παράγοντα USF2 με την υπομονάδα HIF-2α [Befani et. al, (2013)].

1.11.4.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ELK-1

Ο παράγοντας ELK-1 αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ETS). Κατά τη μελέτη πιθανών γονιδίων-στόχων του HIF-2α διακρίθηκε μια ομάδα γονιδίων, τα οποία έφεραν στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή τους τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία HREs κοντά σε μια θέση δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας ETS [Aprelikova et. al, (2006)]. Σε συνθήκες υποξίας η μεταγραφική δράση του ELK-1 διαφοροποιείται και μάλιστα αυξάνεται μέσω φωσφορυλίωσης από το μονοπάτι MARK [Muller et. al, (2004)]. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, δηλαδή η περιοχή πρόσδεσης και τρόπος ρύθμισης του ELK-1 οδήγησαν σε μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η μεταγραφική δράση του HIF-2α με τον παράγοντα ELK-1 έπειτα από σύνδεσή τους στην υποξία [Wang et. al, (2010)]. Από την εφαρμογή διάφορων πειραματικών συνθηκών προέκυψε ότι τα γονίδια-στόχοι που ελέγχονται από την αλληλεπίδραση των δύο (2) παραγόντων διαφοροποιούνται σε δύο (2) επιμέρους ομάδες γονιδίων.

Στα γονίδια (όπως CITED2 και WISP2) στα οποία διακόπτεται πλήρως η μεταγραφή απουσία του παράγοντα ELK-1 και στα γονίδια (IGFBP3) στα οποία η μεταγραφή διενεργείται σε χαμηλότερους ρυθμούς. Εδώ να σημειωθεί ότι αντίστοιχη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του HIF-1α δεν έχει παρατηρηθεί [Aprelikova et. al (2006)]. Όλα τα παραπάνω συγκλίνουν στο γεγονός ότι η αλληλεπίδραση του παράγοντα ELK-1 με το HIF-2α βασίζεται στις ειδικές αλληλουχίες πρόσδεσης ανοδικά των γονιδίων-στόχων του με στόχο τη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών.

1.11.4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ c-MYC

Ορισμένες μελέτες αποκαλύπτουν ένα επιπλέον ρόλο του HIF-2α αυτού της συμμετοχής στην προώθηση της καρκινογενετικής διαδικασίας. Αυτός φαίνεται να αναδύεται από το γεγονός ότι η μεταγραφική στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α εστιάζει στην ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν τον TGFa, την κυκλίνη D1 και τον παράγοντα OCT4, τα οποία είναι απαραίτητα τόσο για την έναρξη όσο και για την εξέλιξη του όγκου. Αυτό το πλήθος γονιδίων σχετικά με την καρκινογένεση ρυθμιζόμενων έμμεσα από τον HIF-2α έρχεται να εμπλουτίσει η αλληλεπίδραση του με τον μεταγραφικό παράγοντα c-Myc κατά την υποξία. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας κωδικοποιείται από το πρωτο-ογκογονίδιο c-myc και έχει τη βασική δομή έλικας-βρόχου-έλικας εμπλουτισμένη με το φερμουάρ λευκίνης (LZ). Τα χαρακτηριστικά αυτά του επιτρέπουν να υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους όγκους καθώς είναι σημαντικός παράγοντας για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ειδικά ο c-Myc σχηματίζει ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με τον παράγοντα MAX (Myc-Associated-protein X), το οποίο αφού προσδεθεί σε μια συντηρημένη αλληλουγία ενισγυτή (E-box), ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη όπως είναι η κυκλίνη D2 (CCND2) και ο παράγοντας E2F1. Επιπρόσθετα όταν στο σύμπλοκο συνδεθούν και άλλοι παράγοντες τότε η δράση του τροποποιείται και προσανατολίζεται για την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες p21 και p27 [Gordan et. al, (2007)]. Σε όλη αυτή τη μεταγραφική δράση του c-Myc ο HIF-2α είναι εμπλέκεται στη δημιουργία και τη σταθεροποίηση των συμπλόκων MYC-MAX και MYC-MAX-SP1, ενισχύοντας τη μεταγραφική δράση του c-Myc, το οποίο επάγει γονίδια που διατηρούν τις συνθήκες που ευνοούν τη δράση του HIF-2α.

Έτσι ο συνολικός καταρράκτης που ελέγχει τη διαδικασία έναρξης της καρκινογένεσης μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 διαμορφώνεται μέσω του ως εξής PI3K/mTROC2/HIF-2α/c-Myc [Mu et. al, (2021)]. Βέβαια στις συνθήκες αυτές επάγεται η έκφραση και η δράση του HIF-1α, ο οποίος σύμφωνα με μελέτες ρυθμίζει αρνητικά τον μεταγραφικό παράγοντα ΜΥC με δύο (2) διαφορετικούς τρόπους. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1α ανταγωνίζεται τον MYC για τις θέσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεϊνικούς εταίρους και ταυτόχρονα επάγει τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον MAX, αναστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα MYC. Τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η αλληλεπίδραση του HIF-2α και του MYC εξαρτάται από τη λειτουργική παρουσία των HIF-1α και HIF-2α.

1.11.4.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΟΝ ΗΑΓ

Πληθώρα μελετών υποστηρίζουν ο σχηματισμός συμπαγών όγκων είναι συνυφασμένος με τη δημιουργία περιβάλλοντος μέσα στο οποίο εντοπίζονται περιογές με περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου (υποξία). Έτσι μέσα σε αυτό τα καρκινικά κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων οξυγόνου ανάλογα με τη θέση τους, γεγονός που οδηγεί στο φαινόμενο κάποιος πληθυσμός να υπόκειται σε οξεία υποξια και κάποιος σε παρατεταμένη υποξία. Για το λόγο αυτό η εξέλιξη των μεταγραφικών παραγόντων επαγόμενων από την υποξία HIF διαμορφώθηκε έτσι προκειμένου ο HIF-1α να είναι υπεύθυνος για το συντονισμό των κυτταρικών αποκρίσεων κατά την οξεία υποξία, ενώ ο HIF-2α να κατευθύνει την απόκριση στην παρατεταμένη υποξία. Σύμφωνα με έρευνες ένα παρόμοιο μοτίβο ρύθμισης της δράσης φαίνεται να παρουσιάζει και ο παράγοντας HAF, γεγονός που αναδεικνύει την άμεση σύνδεση με τους HIF, όπως δηλώνει και το όνομά του. Γενικά ο παράγοντας HAF (Hypoxia Associated Factor) μπορεί να υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους, παρόλα αυτά έχει δειχθεί ότι τα επίπεδά του μειώνονται κατά την οξεία υποξία, αλλά αυξάνονται στην παρατεταμένη υποξία. Επιπλέον έχει ταυτοποιηθεί πως γαρακτηρίζεται από δραστικότητα Ε3 λιγάσης ουβικουϊτίνης, η οποία του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF. Ύστερα από μελέτες συγκατακρίμνησης προσδιορίστηκε ότι η καρβοξυτελική επικράτεια (604-750) του HIF-2α είναι αυτή που αξιοποείται για την αλληλεπίδραση με τον παράγοντα HAF. Η στόχευση στη συγκεκριμένη επικράτεια συνεπάγεται ότι η αλληλεπίδραση σχετίζεται με την ενεργότητα του HIF-2α. Αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται να ενισχύει τη μεταγραφική δραστικότητα του HIF-2α, καθώς μπορεί να δεσμευτεί τόσο σε αλληλουχίες απόκριση στην υποξία (HRE) όσο και σε στοιχεία πρόσδεσης του HAF που εντοπίζονται ανοδικά και εντός των υποκινητών των γονιδίων-στόχων. Παράλληλα σε αυτές τις συνθήκες παρατηρείται ότι ο HAF ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1α. Σε αντίθεση με τον HIF-2α, αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του HIF-1α και ενεργοποιεί ένα ανεξάρτητο από τον παράγοντα VHL μηγανισμό αποικοδόμησης μέσω του πρωτεασώματος 26S [Koh et. al. (2011)].

1.11.4.5 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ REPTIN52

Μεταξύ των αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνονται και αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες, οι οποίες από μόνες του δε δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες παρόλα αυτά μέσω σύνδεσης με άλλους εταίρους επηρεάζουν τόσο τους ίδιους όσο και τα γονίδια που ελέγχουν αυτοί. Σε αυτή την ιδιαίτερη κατηγορία ανήκει και η Reptin52 της υπεροικογένειας AAA+, μια πολυλειτουργική ATPάση που συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες πραγματοποιούνται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [Gkontinakou et. al, (2021)]. Αυτή η δράση της αποκαλύπτει ότι ανιχνεύονται επίπεδα της πρωτεΐνης τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Αναλυτικά κατά τη νορμοξία η Reptin52 ανιχνεύεται στον πυρήνα, ενώ στην υποξία παρατηρείται να μετατοπίζει στο κυτταρόπλασμα. Φαίνεται ότι η Reptin52 ακολουθεί το μοτίβο υποκυτταρικής μετακίνησης του HIF-2α. Συνολικά η παρουσία της και ιδίως μέσω της αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α έχει συνδεθεί με σημαντικές διεργασίες που εμπλέκονται στην ογκογένεση όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η μεταγραφική ρύθμιση, λειτουργίες με αντίκτυπο στην επιδιόρθωση του DNA, στον κυτταρικό κύκλο και τη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου [Mao et. al, (2017)]. Η αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη Reptin52 προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια μελετών σγετικά με τις αλληλεπιδράσεις που επάγονται ύστερα από τη φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις κινάσες ERK1/2, οι οποίες είναι καθοριστικές για τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα σε συνθήκες υποξίας η δράση των κινασών ERK ευνοεί τη σύνδεσή τους εντός του πυρήνα, ενώ στις ίδιες συνθήκες η χημική απενεργοποίησή τους ωθεί τη σύνδεσή τους στο κυτταρόπλασμα. Μελέτες για τον προσδιορισμό του τμήματος του HIF-2α που απαιτείται για την σύνδεση με τη πρωτεΐνη Reptin52 υποδεικνύουν πως ισχυρή αλληλεπίδραση πραγματοποιείται με τμήματα του HIF-2α που περιλαμβάνουν την ενδιάμεση επικράτεια, δηλαδή το μοτίβο της οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD). Η δέσμευση στη συγκεκριμένη επικράτεια του HIF-2α αποκαλύπτει τον κύριο ρόλο της Reptin52 που αφορά τη ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-2α. Πιο ειδικά η Reptin52 αλληλεπιδρά αμφίδρομα με το μοτίβο ODD, γεγονός που πιθανόν επηρεάζει τις θέσεις υδροξυλίωσης. Κατά αυτόν τρόπο σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιείται ένα μονοπάτι αποικοδόμησης της υπομονάδας HIF-2α ανεξάρτητο από τον παράγοντα von Hippel Lindau (VHL). Έτσι προκύπτει πως η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη Reptin52 επιφέρει ελάττωση του γρόνου ημιζωής του HIF-2α χωρίς να συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου EPAS1. Αυτή επιτρέπει να εκδηλωθεί και η δευτερεύουσα έμμεση επίδραση που εστιάζει στην περιορισμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α, η οποία συνεπάγεται μείωση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του. Επιπρόσθετα υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Reptin52 αλληλεπιδρά και με τον HIF-1α τόσο σε μορφή συμπλόκου (TIP60) όσο και μεμονωμένη. Αποτελέσματα αυτής της σύνδεσης έδειξαν ότι επηρεάζουν μόνο τη μεταγραφική δραστηριότητα και όχι τη σταθερότητα του HIF-1α. Συνεπώς εμπλουτίζεται το πλήθος των μηχανισμών που εκδηλώνουν διαφορική ρύθμιση στους μεταγραφικούς παράγοντες HIF [Gkontinakou et. al, (2021)].

1.11.4.6 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10

Μια από τις ερευνητικές δραστηριότητες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής ανακάλυψε μία νέα πρωτεΐνη διευρύνοντας το πλήθος των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες και ειδικά τους ΗΙΓ. Αυτή η πρωτεΐνη ονομάζεται ΑΤΑΧΙΝ-10, η οποία κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο ΑΤΧ10 (ή αλλιώς SCA10), το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 22q13.3. Η φυσιολογικά παραγόμενη πρωτεΐνη ΑΤΑΧΙΝ-10 συντίθεται από 197 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 46 kDa [Guo and Lam, (2020)]. Ορισμένες έρευνες συγκλίνουν στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη ΑΤΑΧΙΝ-10 συσχετίζεται με την Spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10), η οποία είναι μια αυτοσωμική επικρατής νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο της αταξίας στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας του εγκεφάλου και επιληψία [Matsuura et. al,

(2000)]. Οφείλεται στη διευρυμένη επανάληψη ενός μοτίβου ολιγονουκλεοτιδίων (ATTCT) στο ιντρόνιο 9 του υπεύθυνου γονιδίου SCA10, γεγονός που δε φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση τη λειτουργία της.

Αντίθετα έχουν διαπιστωθεί διαφορές όσον αφορά τον αριθμό αυτών των πεντανουκλεοτιδικών επαναλήψεων (ATTCT) ανάμεσα στους υγιείς (10-22 επαναλήψεις) και τους ασθενείς (850-4500 επαναλήψεις) [Waragai et. al, (2006)]. Δομικές μελέτες φανέρωσαν μια πλήρη αναδίπλωση α-έλικας μέσα στην οποία διακρίνονται μοτίβα επανάληψης Armadilo. Το συγκεκριμένο μοτίβο ευνοεί της αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με διάφορους κυτταρικούς εταίρους επάγοντας λειτουργική δράση σε διαφορετικά βιολογικά πλαίσια [Marz et. al, (2004)]. Επιπλέον αποτελέσματα αυτών έδειξαν πως η ATAXIN-10 είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη, η οποία όταν βρεθεί σε διάλυμα έχει την ικανότητα να σχηματίζει ένα ομοτριμερές σύμπλοκο. Για τη δημιουργία αυτού του συμπλόκου τόσο σε ενδογενείς όσο και σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ATAXIN-10 συμμετέχουν τμήματά της που βρίσκονται κοντά στο καρβοξυτελικό της άκρο.

Μελέτες σχετικά με την υπερέκφραση και την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης ATAXIN-10 έχουν δείξει ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση και στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ισχυρή έκφραση στον εγκέφαλο. Επιπλέον μελέτες σχετικά με την λειτουργία της πρωτεΐνης ATAXIN-10 υποστηρίζουν ότι συμμετέχει στην κυτταροκίνηση, το οποίο ίσως δικαιολογεί την έκφραση σε όλους τους ιστούς [Li et, al, (2011)]. Και στις δύο (2) περιπτώσεις η δράση της εκδηλώνεται ύστερα από πρόσδεση με κάποιον παράγοντα. Πιο ειδικά για τη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών στα νευρικά κύτταρα έχει δειχθεί ότι πραγματοποιείται αλληλεπίδραση της ATAXIN-10 με τον HIF-2α [Δισερή Κατερίνα, αδημοσίευτα αποτελέσματα]. Να σημειωθεί αντίστοιχη ρύθμιση του παράγοντα HIF-1α, δηλαδή μέσω αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 δεν έχει προσδιοριστεί.

1.12 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α ΑΠΟ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Βασιζόμενοι στις αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν σχεδιαστεί ειδικοί αναστολείς που εστιάζουν στο μηχανισμό ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργοποίησης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τα διαδοχικά γεγονότα της σταθεροποίησης της α-υπομονάδας, της πυρηνικής μετατόπισης, τη δημιουργία του λειτουργικού μεταγραφικού συμπλόκου και της πρόσδεσης σε ειδικά στοιχεία του DNA του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 [Albadari et. al, (2019)]. Ανάμεσα σε αυτούς συγκαταλέγεται και ο πρόσφατα σχεδιασμένος PT2385, ο οποίος είναι ειδικός ανταγωνιστής του HIF-2α. Η δράση του στοχεύει στην αλλοστερική αναστολή της μεταγραφικής δράσης του HIF-2α και αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ικανότητας να προσδένεται σε μια μοναδική κοιλότητα στο μοτίβο PAS B που είναι γνωστό πως συμμετέχει στον ετεροδιμερισμό του παράγοντα HIF-2α με τον ARNT. Στη θέση αυτή η ειδική δέσμευση επάγει την αλλαγή της διαμόρφωσης του HIF-2α, αποτρέποντας το σχηματισμό του ενεργά μεταγραφικού διμερούς.

Αντίκτυπο αυτής της δράσης είναι η καταστολή της έκφρασης γονιδίων-στόχων του HIF-2α, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση του όγκου σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Γεγονός που υποδεικνύει την επιλεκτική δράση του αναστολέα έναντι του HIF-2α και καμία συνέπεια όσον αφορά τον ετεροδιμερισμό της υπομονάδας HIF-1α με τον ARNT [Xie et. al, (2018)]. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και έντονη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [Courtney et. al, (2018)]. Ο αναστολέας αυτός πλέον πάρει άδεια και χρησιμοποιείται ως φάρμακο στο νεφρικό καρκίνωμα. Ενώ πιο πρόσφατες μελέτες κλινικής φάσης ΙΙ δείχνουν ότι χρησιμοποιείται στη θεραπευτική αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος [Persson et. al, (2020)].



Εικόνα 6: Ο μηχανισμός δράσης του ειδικού αναστολέα PT2385 που στοχεύει στην αναστολή του σχηματισμού του ενεργά μεταγραφικά διμερούς (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο BioRender).

1.13 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙΕ-2 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η ομοιοστασία του μοριακού οξυγόνου περιγράφει την εξέλιξη της παθοφυσιολογίας συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου στα μετάζωα [Semenza, (2012)]. Το μικροπεριβάλλον της πλειοψηφίας των καρκινικών όγκων χαρακτηρίζεται από έντονη διαστρωμάτωση της διαθεσιμότητας οξυγόνου ανάλογα με τη θέση του εκάστοτε κυττάρου. Κυρίαρχες σε αυτό είναι οι υποξικές περιοχές (0.1-1%) που προκαλούνται από τους αυξημένους ρυθμούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού και το de novo σχηματισμό δομών-παρόμοιων με αγγείων, τα οποία οδηγούν στην άνιση σχέση ανάμεσα στη διαθεσιμότητα και την κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου [Semenza, (2012)]. Η υποξία πέρα του γεγονότος ότι δυσχεραίνει τις παραδοσιακές μεθόδους αντιμετώπισης (όπως χημειοθεραπεία) παράλληλα σε προχωρημένου σταδίου καρκινικούς όγκους επάγει μια σειρά μεταγραφικών, μεταβολικών και λειτουργικών προσαρμογών, οι οποίες κατευθύνονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες επαγόμενους από την υποξία HIF (HIF-1, HIF-2) [Shi et. al, (2021)]. Οι HIF ως μεταγραφικοί παράγοντες στοχεύουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίωνστόχων, τα οποία διαμορφώνουν όλες εκείνες τις συνθήκες που ευνοούν τη βιολογία του καρκίνου, η οποία μεταξύ άλλων περιλαμβάνει τον αναερόβιο μεταβολισμό της

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

γλυκόζης, τη διατήρηση της βλαστικότητας και της αθανασίας των κυττάρων την αγγείωση και τη μετάσταση. Επιπλέον πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η επαγωγή των HIF συνοδεύεται από ανάπτυξη του όγκου, ενώ η απουσία τους οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του όγκου [Semenza, (2010)]. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι επάγουν το κακοήθη φαινότυπο, ο οποίος συνδέεται με μικρό προσδόκιμο ζωής ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Μέσα σε αυτό το υποξικό περιβάλλον ο HIF-2 φαίνεται να ενεργοποιείται και μετέπειτα να καθοδηγεί το μοτίβο αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο στην παρατεταμένη υποξία και σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπου εντοπίζονται οι απαραίτητοι μεταγραφικοί παράγοντες [Koh et. al, (2011)]. Το σημείο επέμβασης του HIF-2 κατά την εξέλιξη του καρκίνου υποδηλώνει πως ο παράγοντας αυτός είναι υπεύθυνος για την κυριαρχία του όγκου και την εξάπλωσή του, γεγονός που συσχετίζει άμεσα τη δράση του HIF-2 με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου,. Πράγματι έχει αποδειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2 ρυθμίζει σε πολλά επίπεδα την κυτταρική συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, λειτουργία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και της μετάστασης σε ορισμένους τύπους καρκίνου (όπως καρκίνος του πεπτικού συστήματος) [Zhao et. al, (2015)]. Κατά γενική ομολογία έχει αποδειχθεί ότι η πλειοψηφία των διαφόρων τύπων καρκίνου φέρουν ως χαρακτηριστικό γνώρισμα τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού. Ο συγκεκριμένος συντελείται μέσω της δράσης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF και ιδιαίτερα από τον HIF-1 και εφαρμόζεται σε διαδικασίες όπως, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, των λιπιδίων και στη λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Κυρίως η δράση του HIF-1, αλλά και του HIF-2 ευνοεί την παραγωγή των δομικών λίθων για τα καρκινικά κύτταρα (φαινόμενο Warburg) σε συνδυασμό με τον περιορισμό σύνθεσης τοξικών προϊόντων (όπως ROS) [Zhu et. al, (2023)]. Γενικότερα πλήθος μεταλλάξεων που συντελούνται για την επικράτηση του καρκινικού φαινοτύπου πραγματοποιούνται σε μόρια σχετικά με το μεταβολισμό της γλυκόζης. Μία εξ' αυτών αφορά το ογκογονίδιο KRAS, η οποία σε συνδυασμό με την επαγωγή της έκφρασης των HIF-1 και HIF-2 συσχετίστηκε με το μεταβολισμό στο καρκίνο του παχέος εντέρου. Στην προκειμένη περίπτωση η δράση των HIF εστιάζει στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδιακών αλληλουχιών που κωδικοποιούν απαραίτητα ένζυμα βιοσύνθεσης της μιτοχονδριακής καρδιολιπίνης (ένα μιτοχονδριακό φωσφολιπίδιο που συνδεέται άρρηκτα με τη κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων). Κατά αυτό τον τρόπο ενισχύεται η παραγωγή ATP με παράλληλο περιορισμό της δημιουργίας ROS [Chun et. al, (2010)].

Ορισμένες μελέτες σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος, τα οποία χαρακτηρίζονται από απουσία του ογκοκατασταλτικού παράγοντα VHL προσδιορίζουν το HIF-2 ως απαραίτητο και επαρκή για την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω θετικής ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων του c-Myc και της κυκλίνης D1. Επίσης ο HIF-2 φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη του όγκου μέσω της απορρύθμισης της αποπτωτικής διαδικασίας. Μάλιστα σε καρκίνους που υπερισχύει η έκφραση και η δράση του HIF-2 διαπιστώνεται ότι ευνοείται η ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου που παράγει την πρωτεΐνη BNip3,

η οποία συμμετέχει στη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων, ενισχύοντας κατά αυτό τον τρόπο την πολλαπλασιαστική δύναμη [Raval et. al, (2005)].

Επιπλέον η ιστο-ειδική έκφραση του HIF-2 του δίνει τη δυνατότητα να επάγει την καρκινογένεση μέσω ενεργοποίησης διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το COX2/mPGES-1/PGE2 στο παχύ έντερο και το μονοπάτι EGFR, IGFR1 και ERK/Akt και σε άλλους τύπους καρκίνου [Zhao, et. al, (2015)]. Πέρα του γεγονότος ότι ο μηγανισμός ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον HIF-2 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν είτε ότι ο HIF-2 δεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του όγκου είτε ότι σε συγκεκριμένα επίπεδα οδηγεί στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει πως ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2 συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με διαφορετικό αντίκτυπο ανάλογα τον τύπο του καρκίνου. Επιπρόσθετα τελευταίες αναφορές συνδέουν την παρουσία του HIF-2 στο γλοιοβλάστωμα με την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διατήρηση της βλαστικότητας (OCT4, SOX2, NANOG) μέσω της πρόσδεσης στις ειδικές αλληλουχίες HREs που έχουν ταυτοποιηθεί στους υποκινητές των γονιδίων αυτών. Κατά αυτόν τον τρόπο διατηρούνται υψηλοί πολλαπλασιαστικοί ρυθμοί των καρκινικών κυττάρων και παράλληλα διακρίνονται αδιαφοροποίητοι δείκτες τόσο της επιφάνειας (όπως CD133) όσο και του εσωτερικού σκελετού (όπως νεστίνη) των καρκινικών κυττάρων του γλοιοβλαστώματος [Nusblat et. al, (2020)].

Ακόμη μια λειτουργία που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου είναι η αγγειογένεση. Το έναυσμα αυτής της διαδικασίας πυροδοτείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες επαγόμενους από την υποξία HIF. Μια σειρά ερευνών αποκαλύπτει ότι ο HIF-1 είναι υπεύθυνος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση κατά τα αρχικά στάδια της αγγειογένεσης, ενώ ο HIF-2 ελέγχει τη δομή και τη μορφολογία των αγγειακών δομών διαμέσου του ρόλου του στην αναδιαμόρφωση και στην ωρίμανση των αγγείων [Befani and Liakos, (2018)]. Πιο ειδικά η παρουσία του HIF-2 συνδέθηκε άμεσα με το πλήθος των αγγείων γύρω από τον όγκο και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της αγγειογένεσης [Zhao et. al, (2015)]. Πειραματικές μελέτες έχουν αναδείξει ότι ο HIF-2 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου του αγγειογόνου παράγοντα VEGF, ο οποίος θεωρείται σημαντικός καθώς συμμετέχει στην πλειοψηφία των σταδίων της αγγειογένεσης. Για την εκδήλωση της δράσης του είναι απαραίτητοι υποδοχείς του VGFR-1 και -2 των οποίων η έκφραση ελέγχεται επίσης από τον HIF-2, καθώς φέρουν τις κατάλληλες αλληλουχίες (HREs) στους υποκινητές τους [Elvert et. al, (2003)]. Σε συνθήκες υποξίας, η συμμετοχή του HIF-2 στην εκκίνηση της αγγειογένεσης αφορά τη δυνατότητα να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου του ενδοθηλίου (eNOS) σε κύτταρα HMEC-1 και HUVEC. Αυτό το γονιδιακό προϊόν επάγει την αγγειοδιαστολή, φαινόμενο που διευκολύνει τη μετακίνηση δομικών λίθων απαραίτητων για την ανάπτυξη του όγκου. Επίσης η ιστο-ειδική έκφραση στο ενδοθήλιο του δίνει τη δυνατότητα να δημιουργεί μεταγραφικά σύμπλοκα με άλλους παράγοντες όπως ο Ets-1 και να διεγείρει την έκφραση κοινών γονιδίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα όταν συντελείται ο σχηματισμός νέων αγγείων.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο HIF-2 τις σηματοδοτικές οδούς ANG και TIE, οι οποίες συμμετέχουν τόσο στην έναρξη (αποκόλληση περικυττάρων) όσο και στην ολοκλήρωση (ωρίμανση) της αγγειογένεσης. Από ξεχωριστές πειραματικές μελέτες σε μοντέλα ποντικιών αποσιώπησης του HIF-2 διαπιστώνεται πως το φαινοτυπικό αντίκτυπο όσον αφορά τη λειτουργία των αγγείων ποικίλλει, γεγονός που βασίζεται στο γενετικό υπόβαθρο [Befani and Liakos, (2018)].

Σε συνθήκες υποξίας τέταρτη κατά σειρά λειτουργία που ευνοείται είναι η εισβολή και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η ενίσχυση των κυτταρικών λειτουργιών του πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης εφοδιάζει τα καρκινικά κύτταρα με ικανότητες, οι οποίες τα καθιστούν βλαστικά καρκινικά κύτταρα CSCs. Οι ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν τους δίνουν τη δυνατότητα να είναι αυτόνομα και να μπορούν να ανασυγκροτούν αναπτυσσόμενους δευτερογενείς όγκους [Li et. all, (2007)]. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο η συμμετοχή του HIF-2 φαίνεται να επικεντρώνεται στην προώθηση της μετάστασης μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης σημαντικών γονιδίων που ελέγχουν το μεταστατικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων. Ανάμεσα στους στόχους περιλαμβάνονται γονίδια που σχετίζονται με τη μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγγυματικά όπως η Ε-καντερίνη, έπειτα σε αυτά εκφράζονται γονίδια που αναδιαμορφώνουν το γύρω εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως η μεταλλοπρωτεάση 2 (MMP-2) και μεταγραφικοί παράγοντες (TWIST) που διατηρούν το φαινόμενο. Σύμφωνα με μελέτες στον καρκίνο του πεπτικού συστήματος η έκφραση του παράγοντα HIF-2α φαίνεται να ελέγχεται και από άλλα εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το JNK (c-Jun-NH2 Kinase), το οποίο στη προκειμένη περίπτωση τη συσχετίζει με την κυτταρική διείσδυση και εισβολή [Wang et. al, (2010)]. Επίσης στον ίδιο τύπο καρκίνου διαπιστώθηκε ότι τα μεταστατικά δείγματα περιέχουν υψηλότερα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF από τα μη μεταστατικά δείγματα [Zhao et. al, (2015)].



Εικόνα 7: Οι κυτταρικές λειτουργίες που επάγονται από τη δράση του HIF-2α στο μικροπεριβάλλον του όγκου (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BioRender**).

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

1.14 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙ**F-2 ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ**

Το γλοιοβλάστωμα διακρίνεται ως ο συγνότερος από τους πρωτοπαθείς όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος και θεωρείται μεταξύ των πιο επιθετικών μορφών καρκίνου στον άνθρωπο, όπως υπογραμμίζεται από το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, αμέσως μετά τη διάγνωση, στα επιδημιολογικά δεδομένα [Gimple et. al, (2019)]. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις (3) ενδοκαρκινικοί μεταγραφικοί υπότυποι του γλοιοβλαστώματος ο προνευρικός, ο κλασικός και ο μεσεγγυματικός [Wang et al, (2017)]. Από τη μελέτη αυτών φανερώθηκε πως η ταξινόμησή του στηρίζεται στην παρουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων και ότι το γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται από έντονη κυτταρική ετερογένεια με την πλειοψηφία να καταλαμβάνουν βλαστικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος (GSCs). Ορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές κατατάσσουν επιπλέον το γλοιοβλάστωμα στις μεταβολικές νόσους εκμεταλλευόμενες το γεγονός ότι το γλουταμινικό αποτελεί απαραίτητο στοιχείο που συμβάλλει στην ανάπτυξη και στη λειτουργία των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος. Ο σχηματισμός του γλοιοβλαστώματος συνοδεύεται από φαινόμενα υποξίας, τα οποία επάγουν την προσαρμοστική εξέλιξη του όγκου μέσω της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF. Η δράση αυτών εστιάζει κυρίως στην επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν απλά δομικά στοιχεία του μεταβολισμού (μεταφορείς, ένζυμα) προκειμένου να ενισχύσουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του γλοιοβλαστώματος.

Ειδικά ο παράγοντας HIF-2 φαίνεται να συμμετέχει στον αναγωγικό μεταβολισμό της γλουταμίνης, καθώς προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου GPT2 σε κύτταρα του γλοιοβλαστώματος υπό υποξικές συνθήκες. Το γονίδιο GPT2 κωδικοποιεί ένα ογκογόνο μεταβολικό ένζυμο που ελέγχει τα κυτταρικά επίπεδα της γλουταμίνης, τα οποία είναι υψηλά στο γλοιοβλάστωμα. Ολοφάνερη γίνεται στο μεσεγγυματικό υπότυπο του γλοιοβλαστώματος ότι η μειορρύθμιση τόσο των γονιδίου GPT2 όσο και του παραγόμενου ενζύμου προκαλεί αύξηση των επιπέδων γλουταμίνης, τα οποία εμπλουτίζουν τα δομικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και επίσης χρησιμοποιούνται ως πηγή για την παραγωγή γλουταθειόνης, η οποία με τη σειρά της ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων [Franco et. al, (2021)]. Αν και έχει αναφερθεί άμεση ρύθμιση του GPT2 από τον HIF-2 υπάρχουν δεδομένα που προωθούν και στοιχεία έμμεσης ρύθμισης του GPT2 [Zhang et. al, (2022)]. Αυτοί οι δύο (2) τρόποι ρύθμισης της έκφρασης φανερώνουν ότι η GTP2 εντοπίζεται και στον πυρήνα εκτός από τα μιτοχόνδρια. Ένα παράδοξο είναι ότι αν και το GPT2 ελέγχει τα επίπεδα του α-κετογλουταρικού οξέος, η παρούσα ρύθμιση δεν επηρεάζει τη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος. Παράλληλα πειράματα αποσιώπησης του πυρηνικού GPT2 αποκαλύπτουν πως μια από τις δράσεις της αφορά την προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης [Zhang et. al, (2022)].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2 είναι συνδεδεμένος άρρηκτα με τη βιοδιαθεσιμότητα του μοριακού οξυγόνου (Ο2) εντός των κυτταρικών μεμβρανών. Πιο ειδικά ο HIF-2 συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIF), οι οποίοι ορίζονται ως οι κύριοι διαμεσολαβητές της απόκρισης μέσω συντονισμένης ενεργοποίησης σηματοδοτικών κυτταρικής μονοπατιών με απώτερο στόγο την προσαρμογή. Ο συγκεκριμένος ρόλος σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση του οξυγόνου (O2) είναι αρκετά για να δικαιολογήσουν την απαραίτητη παρουσία του τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο συμπαγής όγκος. Ο HIF-2 δρα ως ετεροδιμερές σύμπλοκο, το οποίο συντίθεται από μια οξυγόνοεξαρτώμενη α-υπομονάδα και μια ιδιοσύστατα εκφραζόμενη β-υπομονάδα (ARNT) ανεξάρτητη από μεταβολές του Ο2. Δομικές αναλύσεις του HIF-2α αποκαλύπτουν το μεγάλο ποσοστό ομολογίας ανά επικράτειες με τον εκτενώς μελετημένο HIF-1α, οι οποίες αντικατοπτρίζουν γαρακτηριστικές λειτουργικές θέσεις των HIF. Από τις ίδιες σαφώς προκύπτουν και στοιχεία που διαφοροποιούν τον HIF-2 από τον HIF-1. Τα σημαντικότερα είναι ότι η HIF-2α υπομονάδα εμφανίζει ιστοειδική έκφραση, η οποία περιορίζεται στο ήπαρ, στο ενδοθήλιο και τον εγκέφαλο. Μάλιστα στους συγκεκριμένους ιστούς υποστηρίζεται ότι επικρατεί η έκφραση του HIF-2α έναντι του HIF-1α. Επιπλέον φέρει μοναδικές περιοχές αλληλεπίδρασης με εταίρους, γεγονός που του προσδίδει διακριτές λειτουργίες, όπως η ερυθροποίηση και αντιτιθέμενους ρόλους σε σύγκριση με τον HIF-1α σε κοινές λειτουργίες. Για το λόγο αυτό θεωρούνται καταλυτικές οι μελέτες που εστιάζουν στις αναλύσεις αλληλεπίδρασης του HIF-2α με άλλους εταίρους.

Έτσι ο πρώτος στόχος αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης και της δραστικότητας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α σε νευρικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG και T98G. Επιπλέον έγινε μελέτη της ρύθμισης της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α ως προς το γονίδιο-στόχο PAI-1, παρουσία του ειδικού αναστολέα PT2385, έτσι ώστε να προκύψουν δεδομένα για τη δράση του αναστολέα στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος και πραγματοποιήθηκε μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος στις ίδιες συνθήκες, χωρίς την παρουσία του αναστολέα.

Από αδημοσίευτη βιβλιογραφία του εργαστηρίου, διαπιστώθηκε ότι η υπομονάδα του HIF-2α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ATAXIN-10. Ωστόσο ο προσδιορισμός της ακριβούς θέσης αλληλεπίδρασης δεν έχει χαρακτηρισθεί και συνεπώς η διερεύνησής της θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικά δεδομένα είτε με τη σταθερότητα του HIF-2α είτε με τη μεταγραφική δράση του σε γονίδια-στόχους του. Η εν δυνάμει αλληλεπίδραση της υπομονάδας HIF-2α με την ATAXIN-10, η οποία εκφράζεται ισχυρά στον εγκέφαλο αναδεικνύει την εμπλοκή του HIF-2 και στην καρκινογενετική διαδικασία στον εγκέφαλο και ιδιαίτερα στο γλοιοβλάστωμα. Για την επίτευξη του παρόντος στόχου πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των υπερεκφρασμένων τμημάτων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α από βακτηριακά κύτταρα BL21-RIL. Έπειτα έγινε ανάλυση της αλληλεπίδρασης των υπερεκφρασμένων του HIF-2α με την ενδογενή ATAXIN-10 και με την υπερεκφρασμένη flag-ATAXIN-10 σε κύτταρα HeLa, *in vitro*.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 YAIKA

3.1.1 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

HeLa: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά που συγκαταλέγεται στον επιθηλιακό τύπο κυττάρων και απομονώθηκε από τον τράχηλο της μήτρας. Παρουσιάζει καθολική ανευπλοειδία και στην πλειοψηφία της περιλαμβάνει κύτταρα με ένα μικρό τελοκεντρικό χρωμόσωμα. Χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης του p53 και φυσιολογικά επίπεδα του pRB, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για πειράματα διαμόλυνσης.

<u>U87MG</u>: καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από κακοήθες γλοίωμα εντοπισμένο στον εγκέφαλο του ανθρώπου (γνωστό ως γλοιοβλάστωμα). Πρόκειται για μια κυτταρική σειρά με μέσο αριθμό χρωμοσωμάτων 44, της οποίας η ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από προσκόλληση και επιθηλιακή μορφολογία. Επίσης διακρίνεται για την ικανότητα πρόκλησης όγκου.

<u>T98G</u>: ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά απομονωμένη από κακοήθη όγκο του κεντρικού νευρικού συστήματος γνωστό ως γλοιοβλάστωμα. Περιλαμβάνει κύτταρα με υπερπενταπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (128-132). Όταν τα συγκεκριμένα επωάζονται είτε σε καλλιέργεια με περιορισμένη διαθεσιμότητα ορού είτε σε καλλιέργεια με υψηλή κυτταρική πυκνότητα διαπιστώνεται πως εισέρχονται και παραμένουν στη φάση G1. Επιπλέον δεν εμφανίζει ικανότητα πρόκλησης όγκου.

3.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ BL21 RIL

Το συγκεκριμένο στέλεχος ανήκει στην οικογένεια των βακτηρίων του γένους Escherichia coli και διακρίνεται ως ξενιστής σε εφαρμογές παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα και χημικά χαρακτηρισμένων ετερόλογων πρωτεϊνικών μορίων. Η χαρακτηριστική του δράση οφείλεται στο γεγονός ότι είναι σχεδιασμένο να περιέχει επιπλέον αντίγραφα γονιδίων tRNAs μορίων αργινίνη(R), ισολευκίνη(I) και λευκίνη(L), τα οποία αν και ευνοούν τη διαδικασία της μετάφρασης είναι σπάνια στα βακτήρια. Η δράση του συμπληρώνεται και από την απουσία κωδικοποιητικής αλληλουχίας των πρωτεασών Lon και ompT αντίστοιχα στο γονιδίωμά του. Επιπρόσθετα φέρει στο γονιδίωμά του και την αλληλουχία που κωδικοποιεί για το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη (CHL) προσδίδοντας ανθεκτικότητα.

3.1.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pGEX-4T1

Ο δεδομένος πλασμιδιακός φορέας έχει μέγεθος 4,9 bp μέσα στο οποίο περιλαμβάνονται χαρακτηριστικές αλληλουχίες οι οποίες ενισχύουν τη δράση του βακτηριακού στελέχους BL21 RIL. Αναλυτικά στην περιοχή του πολυσυνδέτη (γνωστή ως MCS) φέρει την αλληλουχία-στόχος του περιοριστικού ενζύμου BamHI εντός της οποίας πραγματοποιείται η ένθεση του ετερόλογου γονιδίου για το μεταγραφικό παράγοντα HIF-2a. Κατά συνέπεια το γονίδιο ενδιαφέροντος να εντοπίζεται καθοδικά της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και ως αποτέλεσμα την παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών. Η παραπάνω διάταξη βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός tac υποκινητή, ο οποίος βρίσκεται συνδεδεμένος με το χειριστή της λακτόζης αναδεικνύοντας την άμεση σύνδεσή του με την παρουσία λακτόζης ή χημικών αναλόγων (π.χ. IPTG) για την επαγωγή της έκφρασης. Ακόμη φέρει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη (Amp) προσδίδοντας ανθεκτικότητα.



Εικόνα 8: Χαρτογράφηση του πλασμιδιακού φορέα **pGEX-4T1**

3.1.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας για την παρασκευή των διαλυμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Applichem GmbH (Germany) και Sigma (St.Louis, USA).

3.1.5 ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τα υλικά μοριακής βιολογίας που αξιοποιήθηκαν διατέθηκαν από τις εταιρίες New England BioLabs Inc., Takara και Fermentas.
3.1.6 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α

Ο αναστολέας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α που χρησιμοποιήθηκε καλείται PT2385 και προμηθεύτηκε από την εταιρία MedChemExpress.

3.1.7 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Κατά σειρά το πλήθος των αντισωμάτων που αξιοποιήθηκε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναγράφεται στον κάτωθι πίνακα:

Εταιρία	Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση
Novus Biologicals	Πολυκλωνικό	Ορό κουνελιού	1:750
	αντί-HIF-2α		
Santa Cruz	Πολυκλωνικό	Ορό κουνελιού	1:750
Biotechnology	αντί-Ataxin10		
Santa Cruz	Μονοκλωνικό	Ορό ποντικού	1:3000
Biotechnology	αντί-Ataxin10		
Amersham	Πολυκλωνικό	Ορό κουνελιού	1:15000
Biosciences	αντί-GST	και ποντικού	
Cell Signaling	Μονοκλωνικό	Ορός ποντικού	1:3000
	αντί-β Actin		

Πίνακας 1

3.1.8 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

> <u>ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</u>

Η ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό Luria-Britani (LB) Broth του οποίου η σύσταση ακολουθεί την παρακάτω αναλογία: 2x gr Peptone from Casein, x gr Yeast Peptone, x gr Sodium Chloride (NaCl) και ddH₂O για τη διαλυτοποίηση ανάλογα με τον επιθυμητό όγκο. Για ενδεικτικό όγκο V=11 το συγκεκριμένο θρεπτικό περιέχει τις ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω:

Συστατικά	Ποσότητες	
Peptone from Casein	10gr	
Yeast Peptone	5gr	
Sodium Chloride (NaCl)	5gr	
ddH ₂ O	1000ml	
Πίνακας 2		

Ακολουθεί αποστείρωση περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου RT (room temperature). Πριν τη χρήση του συμπληρώνεται με κατάλληλο αντιβιοτικό σε όγκο V που ισχύει η αραίωση 1:1000.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΒL21RIL ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
CH ₃ COOK	30mM
MnCl ₂	50mM
$CaCl_2$	10mM
KCl	100mM
Γλυκερόλη	15%
Πίνακας 3	
- Διάλυμα TFB-II	-
Συστατικά	Συγκεντρώσεις
MOPS	10mM
CaCla	
CuCl2	/SmM

- Διάλυμα TFB-I

Τα συγκεκριμένα διαλύματα επαναδιάλυσης χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, οι οποίες πέρα από τη ρύθμιση του Ph του περιβάλλοντος των κυττάρων είναι υπεύθυνες και για την τροποποίηση της

Πίνακας 4

20%

διαπερατότητας της μεμβράνης ευνοώντας το μετασχηματισμό.

<u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΛΥΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</u>

- Συστατικά Συγκεντρώσεις Tris-HCl 7.6 20Mm NaCl 137Mm MgCl₂ 5Mm Tween 20 0.1% 5% Glycerol **PMSF** 1Mm DTT 5Mm
- Lysis Buffer

Γλυκερόλη

Πίνακας 5

Το παρόν ρυθμιστικό διάλυμα με χαρακτηριστική ποιοτική και ποσοτική σύσταση διαμορφώνει τις συνθήκες που ευνοούν την παραλαβή του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα BL21 RIL για την απομόνωση καθαρών πρωτεϊνών.

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ GST

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
Tris-HCl Ph=8.5	25Mm	
Γλουταθειόνη GSH	10Mm	
Πίνακας 6		

Η επώαση της στήλης με το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα επιτρέπει τη σύνδεση των πρωτεϊνών συζευγμένων με επίτοπο GST με την ελεύθερη γλουταθειόνη και κατά συνέπεια την έκλουσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

> <u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΛΥΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</u>

- Συστατικά
 Συγκεντρώσεις

 Hepes 7.5
 25mM

 NaCl
 150mM

 MgCl2
 2mM

 Triton X-100
 1%

 PMSF
 2mM

 DTT
 5mM
- Lysis-Washing Buffer

Πίνακας 7

Ανάλογη παρουσία συστατικών του διαλύματος διαμορφώνουν ιδανικές συνθήκες για τη συλλογή του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Επιπλέον αξιοποιείται για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και ειδικά αυτών που φέρουν τον επίτοπο GST μέσω πειραμάτων in vivo συγκατακρήμνισης.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ SDS-PAGE

- Πηκτή συσσώρευσης

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
H ₂ O		
Tris-HCl pH=6.8	0.125 M	
Ακρυλαμίδιο	40%	
Υπερθεεικό αμμώνιο (APS)	0.04%	
TEMED	0.04%	

Πίνακας 8

Πηκτή διαχωρισμού

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
H ₂ O		
Tris-HCl Ph=8.8	0.375M	
Ακρυλαμίδιο	40%	
Υπερθεεικό αμμώνιο (APS)	0.04%	
TEMED	0.02%	
Πίνακας 9		

▶ <u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (RUNNING BUFFER) 10X</u>

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Tris-HCl	50mM
Γλυκίνη	1.92M
SDS	1%
	10

Πίνακας 10

Η χρήση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος διατηρεί τις κατάλληλες αποδιατακτικές συνθήκες και παράλληλα ευνοεί την αγωγή του ηλεκτρικού ρεύματος διευκολύνοντας την μετακίνηση των πρωτεϊνών στην πηκτή.

> <u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ LAEMMLI (SAMPLE BUFFER 4X)</u>

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Tris-HCl Ph=6.8	62.5Mm
Bromophenol Blue	0.05%
DTT	25Mm
SDS	2,3%
Γλυκερόλη	10%

Πίνακας 11

Η ανάμιξη του ρυθμιστικού διαλύματος με το πρωτεϊνικό δείγμα αποτελεί βήμα προετοιμασίας για ηλεκτροφόρηση, καθώς η παρουσία των αποδιατακτικών παραγόντων εξασφαλίζει την αποδιαταγμένη διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Επίσης η παρουσία της γλυκερόλης αποτρέπει τη διάχυση των δειγμάτων κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
Coomassie Brilliant Blue	0,1%	
Οξικό οξύ	10%	
Αιθανόλη	50%	
Πίνακας 12		

<u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ</u> <u>ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ (TRANSFER BUFFER) 10X</u>

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
Tris-HCl	125Mm	
DTT	0.5Mm	
SDS	0.2%	
Πίνακας 13		

Αξιοποιείται για την απαραίτητη διατήρηση της μερικής ενυδάτωσης όλων των συστατικών που απαιτούνται κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ PONCEAU

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Ponceau S	0,5%
Οξικό οξύ	1%
Πίνακας 14	

<u>ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ</u>

- Phosphate Buffered Saline (PBS)

Συστατικά	Συγκεντρώσεις	
NaCl	138mM	
KCl	2.67mM	
KH ₂ PO ₄	8.1mM	
Na ₂ HPO ₄	1.47mM	
Π' 15		

Πίνακας 15

- Tris Buffered Saline (TBS)

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Tris	150mM
Sodium Chloride (NaCl)	198mM
Πίνακας 16	

Τα συγκεκριμένα διαλύματα αξιοποιούνται για την έκπλυση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης χωρίς να επηρεάζουν τα αντιγόνα που έχουν καθηλωθεί σε αυτή.

3.2 МЕӨОЛОІ

3.2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.2.1.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το εναρκτήριο βήμα αφορούσε τον εμπλουτισμό του μικρού όγκου θρεπτικού υλικού Luria-Britani (LB) Broth V=3ml $\mu\epsilon$ τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη (Amp) χλωραμφαινικόλη (CHL). Στο συμπληρωμένο με κατάλληλα αντιβιοτικά θρεπτικό υλικό LB μεταφέρθηκαν βακτηριακά στελέχη BL21-RIL, βυθίζοντας το tip από το διάλυμα αποθήκευσης γλυκερόλης που διατηρούνταν στους -80°C στην κωνική φιάλη V=100ml. Αφού τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 14-16 ώρες. Σε παρόμοιο περιβάλλον μεταφέρθηκε με πιπεταδόρο και γυάλινο σιφώνιο V=10ml φρέσκο θρεπτικό υλικό LB V=50ml σε κωνική φιάλη V=250ml, η οποία εμπλουτίστηκε με V=250μl της αρχικής καλλιέργειας, επιτυγγάνοντας αραίωση 1:200. Παράλληλα απομονώθηκαν V=2ml θρεπτικό υλικό LB σε δύο (2) κυψελίδες (από V=1ml), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλά δείγματα κατά τη φωτομέτρηση. Ύστερα η φιάλη τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 37°C για τέσσερα (4) διαφορετικά χρονικά διαστήματα μέχρι να αναπτυχθεί η μεγάλη καλλιέργεια. Ανάμεσα σε αυτούς τους χρόνους επώασης κρατήθηκαν δείγματα V=1ml σε κυψελίδα για τον έλεγγο της ανάπτυξης με τη διαδικασία της φωτομέτρησης στα 600nm. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε μόλις η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έφτασε την τιμή OD~0.35.

Στη συνέχεια αποχύνω κατευθείαν την υγρή καλλιέργεια σε falcon V=50ml, μέσω του οποίου υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 7 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 3000rpm για το διαγωρισμό των βακτηριακών κυττάρων από το θρεπτικό υλικό. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο αναποδογυρίζοντας το falcon, το οποίο μεταφέρθηκε άμεσα στον πάγο για τη διατήρηση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων. Ενόσω βρισκόταν στον πάγο προστέθηκε V=1ml διαλύματος TFB-I για την επαναιώρηση του ιζήματος εκτελώντας up-down με τη βοήθεια μικρής πλαστικής πιπέτας Pasteur. Έπειτα το επαναιώρημα συμπληρώθηκε με επιπλέον V=24ml διαλύματος TFB-I, ώστε να αντιπροσωπεύει το μισό όγκο V της αρχικής καλλιέργειας και αφέθηκε στον πάγο να επωαστεί για 10 λεπτά. Μια δεύτερη διαδικασία φυγοκέντρησης με παρόμοιες παραμέτρους αποσκοπούσε στο διαχωρισμό των βακτηριακών κυττάρων από το διάλυμα TFB-I και τη μετέπειτα επαναδιάλυση του ιζήματος με V=2ml διαλύματος TFB-II (δηλαδή αραίωση 1:25 αρχικής καλλιέργειας). Ακολούθησε επώαση 60 λεπτών στο πάγο και στη συνέγεια αποθηκεύτηκαν σε eppendorfs στους -80°C.

3.2.1.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε αποστειρωμένο περιβάλλον βυθίστηκε tip σε eppendorf με V=50μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων BL21 RIL για τη μεταφορά V=2μl πλασμιδιακού DNA συγκεκριμένης επικράτειας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a για μετασχηματισμό. Αμέσως μετά την προσθήκη πραγματοποιήθηκε επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε το χρονικό διάστημα υποβλήθηκαν σε μια διεργασία εναλλαγής θερμοκρασίας ενός κύκλου των 5 λεπτών. Αναλυτικά μεταφέρθηκαν σε thermoblot στους 42°C για 2 λεπτά και κατόπιν έμειναν στον πάγο για 3 λεπτά. Διατηρώντας τις στείρες συνθήκες το eppendorf με τα μετασχηματισμένα βακτήρια συμπληρώθηκε με θρεπτικό υλικό Luria-Britani (LB) Broth V=700μl και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέγεια υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση με παραμέτρους ευνοϊκές για το διαχωρισμό των αδιάλυτων μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων από το διαλυτό κλάσμα. Παράλληλα σε ήδη επιστρωμένο με αντιβιοτικά τριβλύο προστέθηκαν σε ίσο όγκο V=20μl τα 'φρέσκα' αντιβιοτικά αμπικιλλίνη (Amp) και χλωραμφαινικόλη (CHL), τα οποία απλώθηκαν σε όλη την επιφάνεια του τριβλύου με την εφαρμογή της γυάλινης πιπέτας Pasteur. Μετά το αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκαν V=600μl από το υπερκείμενο, ενώ τα εναπομείναντα V=100μl αξιοποιήθηκαν για την επαναιώρηση του ιζήματος κάνοντας κινήσεις up-down με την πιπέτα. Έπειτα ο συγκεκριμένος όγκος εμβολιάστηκε στο τρυβλίο και τα κύτταρα κατέλαβαν την επιφάνεια του κατά αντίστοιχο τρόπο με τα αντιβιοτικά. Για την ανάπτυξη αποικιών τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 14-16 ώρες.

3.2.1.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υπό τη λειτουργία της λυχνίας Bunsen για να διατηρείται αποστειρωμένο το γύρω περιβάλλον μεταφέρθηκε με πιπεταδόρο και γυάλινο σιφώνιο V=10ml (αφού αποστειρωθεί το άκρο περνώντας πάνω από τη φλόγα) θρεπτικό υλικό Luria-Britani (LB) Broth V=20ml σε καθαρή και αποστειρωμένη κωνική φιάλη των V=100ml. Εφόσον το παραπάνω βρισκόταν σε κατάλληλη θερμοκρασία εμπλουτίστηκε με V=20μl με τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη (Amp) και χλωραμφαινικόλη (CHL). Στο πλήρες πλέον θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκαν περίπου V=20μl μετασχηματισμένων βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να παράγουν μια συγκεκριμένη επικράτεια του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a συζευγμένη με τον επίτοπο GST. Ακολούθησε η επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 14-16 ώρες.

3.2.1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υπό ασηπτικές συνθήκες σε μια κωνική φιάλη γεμάτη με θρεπτικό υλικό Luria-Britani (LB) Broth V=500ml προστέθηκε ίσος όγκος V=500μl από τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη (Amp) και χλωραμφαινικόλη (CHL). Πριν συνεχιστεί η διαδικασία ανάπτυξης κρατήθηκαν V=2ml εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό σε δύο (2) eppendorfs (από V=1ml), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλά προκειμένου να αξιολογηθεί κατά πόσο μεγάλωσαν τα βακτηριακά κύτταρα.

Στη συνέχεια μεταφέρθηκε με πιπεταδόρο και γυάλινο σιφώνιο V=10ml όγκος μικρής καλλιέργειας (V=5ml) στη μεγάλη κωνική φιάλη τέτοιος ώστε να ισχύει η αραίωση 1:100. Ύστερα τοποθετήθηκε σε ειδική θέση στον επωαστήρα στους 37°C για περίπου 3 ώρες, αλλά ανά διαστήματα κρατιόταν δείγμα (V=1ml) σε κυψελίδα και πραγματοποιούνταν έλεγχος της ανάπτυξης με τη διαδικασία της φωτομέτρησης στα 600nm. Η διαδικασία ανάπτυξης ολοκληρώθηκε όταν η τιμή της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας έφτασε OD~0.5 και η κωνική φιάλη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου RT μέχρι τη χρήση της.

3.2.1.5 ΕΠΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΙΡΤG

Από την προηγούμενη διεργασία το περιεχόμενο της μεγάλης καλλιέργειας περιλαμβάνει μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα με πλασμίδια, τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί με τον υποκινητή και την επιθυμητή κωδικοποιητική αλληλουχία για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης και μάλιστα σε περιοχή συνδεδεμένη με το οπερόνιο της λακτόζης. Αυτή η συνθήκη επιτρέπει με τη χρήση τόσο της λακτόζης όσο και χημικών ανάλογων αυτής (όπως το isopropyl β-D-thiogalactopyranoside IPTG) να προκαλείται ενεργοποίηση του γονιδίου και κατ' επέκταση επαγωγή παραγωγής της πρωτεΐνης. Η ιδιαιτερότητα της χρήσης IPTG έγκειται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση της διατηρείται σταθερή, διότι δεν αποτελεί τμήμα μεταβολικού μονοπατιού.

Μετά την ανάπτυξη της μεγάλης καλλιέργειας προστέθηκε το χημικό ανάλογο IPTG (1Μ) V=50μl. Ακολούθως η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε ειδική θέση στο υδατόλουτρο και έγινε επώαση στους 18°C για 3,5 ώρες υπό ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της επαγωγής ο όγκος της κωνικής φιάλης ισομοιράστηκε σε τρεις (3) σωλήνες φυγοκέντρησης, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους: i) χρόνος λειτουργίας 40 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 4000rpm. Το αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης ήταν ο διαχωρισμός των βακτηριακών κυττάρων ως ίζημα. Για τη μετέπειτα συλλογή τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και διατηρήθηκε στον πάγο με επαφή στον ατμοσφαιρικό αέρα για να στεγνώσει το ίζημα. Ενόσω παραμένουν στον πάγο μέσα στους σωλήνες φυγοκέντρησης διανεμήθηκε ισόποσα μίγμα V=20ml απιονισμένου νερού (ddH₂O) και αναστολέων πρωτεάσης PMSF για την επαναδιάλυση του ιζήματος, με τη βοήθεια μικρής πλαστικής πιπέτας Pasteur. Το αποτέλεσμα της επαναδιάλυσης μεταφέρθηκε σε ένα (1) falcon V=50ml, μέσα στο οποίο υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους: i)χρόνος λειτουργίας 10 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 4500rpm. Αφού ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C).

3.2.1.6 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά την επαγωγή στα falcons V=50ml με τα ιζήματα των κυττάρων από κάθε συνθήκη (επικράτεια) μεταφέρθηκε με πιπεταδόρο και γυάλινο σιφώνιο V=10ml διάλυμα λύσης ενισχυμένο με κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών (PMSF) V=5ml.

Στο συγκεκριμένο βήμα εκτελέστηκε up-down για την επαναδιάλυση του ιζήματος μέχρι ομογενοποίησης και διατηρήθηκε στον πάγο. Στη συνέχεια για τη λύση των κυττάρων εφαρμόστηκαν υπέρηχοι συγκεκριμένης έντασης και διάρκειας στα επαναιωρήματα. Ακολούθως υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 1 ώρα και ii)ταχύτητα περιστροφής 11000rpm για το διαχωρισμό των προϊόντων της λύσης σε διαλυτό και αδιάλυμα λύσης V=8ml με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur. Σε αυτά τα τρία (3) βήματα κρατήθηκαν αντίστοιχα δείγματα V=50μl (εκχύλισμα υπερήχων, διαλυτό και αδιάλυτο προϊόν) για τον έλεγχο της διαδικασίας απομόνωσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a με επίτοπο GST και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C).

3.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

3.2.2.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟ GST (ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ)

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στις ισχυρές χημικές αλληλεπιδράσεις μορίων όπως ενζύμου-υποστρώματος. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή της αξιοποιήθηκε η γλουταθειόνη, η οποία βρισκόταν προσδεδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης αντιπροσωπεύοντας τη στατική φάση και αποτελεί το υπόστρωμα. Στο ετερογενές μίγμα προς ανάλυση οι χιμαιρικές επικράτειες του HIF-2a έφεραν ως επίτοπο το ένζυμο GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) ύστερα από κλωνοποίηση της αντίστοιχης γονιαδιακής αλληλουχίας στη θέση του πολυσυνδέτη σε πλασμίδια. Αυτή προσέδωσε τη χαρακτηριστική ιδιότητα να δεσμεύονται στα GSH-σφαιρίδια. Η διαδικασία περιλαμβάνει τέσσερα (4) στάδια, τα οποία εκτελούνται στους 4°C.

<u>1° Στάδιο <<Προετοιμασία GSH-σφαιριδίωv>> :</u> Σε τέσσερα falcons V=50ml, τα οποία αντιστοιχούν σε μια επικράτεια του HIF-2a προστέθηκαν V=200μl GSH-σφαιρίδια (αφού είχε κοπεί στην άκρη το ρύγχος για την καλύτερη άντληση του όγκου). Αμέσως μετά τα σφαιρίδια ενυδατώθηκαν με V=8ml διαλύματος λύσης. Ύστερα ακολούθησε επώαση στο cold room στους 4°C υπό μικρή περιστροφική ανάδευση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 2000rpm για την καταβύθιση των αδιάλυτων σφαιριδίων. Έπειτα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια ανανεώθηκαν με V=8ml διάλυμα λύσης. Το παραπάνω μοτίβο διεργασίας επαναλήφθηκε συνολικά τρεις (3) φορές.

<u>2º Στάδιο <<Flow-Through>> :</u> Μετά την τελευταία επανάληψη εξισορρόπησης των σφαιριδίων απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν V=20ml διαλυτού βακτηριακού εκχυλίσματος από κάθε επικράτεια του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a στα αντίστοιχα falcons, τα οποία σφραγίστηκαν με πάραφιλμ γύρω γύρω από το καπάκι.

Ακολούθησε επώαση στο cold room 4°C υπό μικρή περιστροφική ανάδευση για περίπου 2 ώρες. Μόλις ολοκληρώθηκε το χρονικό διάστημα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 2000rpm για τη διαφορική κατανομή ανάμεσα σε πρωτεϊνικά συστατικά του διαλυτού κλάσματος. Στο υπερκείμενο βρισκόταν το Flow-Through, δηλαδή πρωτεΐνες που παρέμειναν αδέσμευτες εξαιτίας της απουσίας της χαρακτηριστικής χημικής ομάδας, ενώ στο ίζημα εντοπίζονταν τα σφαιρίδια συνδεδεμένα με πρωτεΐνες λόγω της αλληλεπίδρασης GSH-GST συμπεριλαμβανομένου και των επικρατειών του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a.

<u>3° Στάδιο <<Πλύσεις στήλης>>:</u> Αφού απομονώθηκε το ίζημα σε κάθε συνθήκη ενυδατώθηκε με διάλυμα λύσης V=10ml για την έκπλυση της στήλης. Έπειτα μεταφέρθηκε στο cold room στους 4°C υπό ελαφριά περιστροφική κίνηση για 10 λεπτά. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις προηγούμενες παραμέτρους για την απομάκρυνση οποιοδήποτε άλλων διαλυτών συστατικών. Ακολούθως αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η στήλη ενυδατώθηκε άμεσα με νέο διάλυμα λύσης V=10ml. Η πλύση της στήλης εκτελέστηκε τρεις (3) φορές.

4° Στάδιο << Εκλουση επικρατειών HIF-2α>>: Η έκλουση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στα σφαιρίδια επίσης στηρίχτηκε στη χαρακτηριστική ιδιότητα τους. Για το λόγο αυτό μετά την τελευταία πλύση της στήλης αφαιρέθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και έπειτα προστέθηκε διάλυμα V=250μl φρέσκιας ελεύθερης γλουταθειόνης. Αμέσως μετά σε χρονικό διάστημα 5 λεπτών υποβλήθηκαν σε εναλλαγές 1 λεπτού ανάμεσα σε έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση σε RT. Ύστερα εκτελέστηκε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 2000rpm. Η παρουσία της στο συγκεκριμένο όγκο στη στήλη προσέλκυσε πρωτεϊνικά συστατικά με ασθενή σύνδεση με τα σφαιρίδια της στήλης. Στη συνέχεια η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και με την προσθήκη διαλύματος V=500μl φρέσκιας γλουταθειόνης. Με αυτό τον όγκο πραγματοποιήθηκε η αποδέσμευση όλων των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια της στήλης και κατ' επέκταση η έκλουσή τους.

Κατά τη διεργασία κάθε σταδίου του καθαρισμού κρατήθηκαν αντίστοιχα δείγματα V=50μl για κάθε επικράτεια του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας και φυλάχτηκαν στην κατάψυξη (-20°C).



Εικόνα 9: Στάδια καθαρισμού των υπερεκφρασμένων τμημάτων του HIF-2α με επίτοπο GST (χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BioRender**)

3.2.2.2 ΙΝ VITRO ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HeLa (PULL DOWN ASSAY)

Η μέθοδος στηρίζεται στην *in vitro* ανίχνευση φυσικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεϊνικά μόρια, ένα εκ των οποίων είναι εκφρασμένο ως χιμαιρική GST πρωτεΐνη σε βακτηριακά κύτταρα E.coli. Η ακινητοποίησή τους σε σφαιρίδια δημιουργεί ένα ικρίωμα, το οποίο επιτρέπει την άμεση πρόσδεση πρωτεϊνών.

Αρχικά σε πέντε (5) eppendorfs (4 χιμαιρικές επικράτειες HIF-2a και GST ως control) κατανεμήθηκε ίσος όγκος V=30μl σφαιριδίων σεφαρόζης με προσδεδεμένη γλουταθειόνη. Ακολούθησε η πλύση-ενυδάτωση των σφαιριδίων με την προσθήκη V=600μl Lysis-Washing Buffer. Έπειτα μεταφέρθηκαν στο cold room στους 4°C υπό μικρή κυκλική ανάδευση για 10 λεπτά.

Αμέσως μετά υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 800rcf για το διαχωρισμό σφαιριδίων από το υπερκείμενο. Αυτό βοήθησε στην απομάκρυνση του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθούν τα σφαιρίδια και στην άμεση επανυδάτωση τους με V=600μl Pull Down Buffer. Η συγκεκριμένη σειρά βημάτων εκτελέστηκε τρεις (3) φορές και διατηρήθηκαν στον πάγο μέχρι τη χρήση τους.

Ενόσω γινόταν η παραπάνω διαδικασία ταυτόχρονα πραγματοποιούνταν η σταδιακή απόψυξη των χιμαιρικών επικρατειών του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2a στον πάγο. Μόλις ξεπάγωσαν υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 5 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 700 rcf με σκοπό την καταβύθιση τυχόν σφαιριδίων και τον μετέπειτα διαχωρισμό τους.

Αξιοποιώντας το Western Blot που διενεργήθηκε κατά το στάδιο καθαρισμού και τη λειτουργία του ImageJ πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των επικρατειών του HIF-2a. Αυτή διευκόλυνε τον υπολογισμό του όγκου που απαιτείται από κάθε επικράτεια, ώστε σε αυτό να περιέχονται 15μg πρωτεΐνης για την αντίδραση.

Οι συγκεκριμένες ποσότητες χιμαιρικών πεπτιδίων αραιώθηκαν με Lysis-Washing Buffer σε τελικό όγκο V=700μl. Μετά τη δημιουργία των συγκεκριμένων αραιώσεων ο συνολικός όγκος κάθε επικράτειας μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα eppendorfs με τα σφαιρίδια, τα οποία σφραγίστηκαν με πάραφιλμ γύρω από το καπάκι. Αμέσως μετά μεταφέρθηκαν στο cold room για επώαση υπό ήπια ανάδευση κυκλικής τροχιάς για περίπου 2 ώρες και 30 λεπτά. Μόλις ολοκληρώθηκε η επώαση τα eppendorfs υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις γνωστές παραμέτρους για το διαχωρισμό των σφαιριδίων με τις επικράτειες του HIF-2a από το υπερκείμενο. Μετά απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και συμπληρώθηκαν με διάλυμα Lysis-Washing Buffer V=600μl για πλύση. Έπειτα μεταφέρθηκαν στο cold room υπό μικρή ανάδευση κυκλικής τροχιάς για 10 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της πλύσης πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση με παρόμοιες παραμέτρους με τον ίδιο στόχο και ακολούθησε ανανέωση του Lysis-Washing Buffer. Η διαδικασία της πλύσης επαναλήφθηκε τρεις (3) φορές.

Προς την ολοκλήρωση της επώασης των χιμαιρικών επικρατειών του HIF-2a με τα σφαιρίδια ξεκίνησε η μεταχείριση της κυτταρικής σειράς HeLa SP που καλλιεργούνταν σε δέκα (10) μεγάλα τρυβλία (10cm²). Αφού ελέγχθηκε ότι η πυκνότητα των κυττάρων είναι ικανοποιητική αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και αμέσως πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS (1X) για την απομάκρυνση οποιοδήποτε κυτταρικών υπολειμμάτων. Μετά την απομάκρυνση της πλύσης προστέθηκε στα τρυβλία διάλυμα Lysis-Washing Buffer V=150µl, το οποίο βοήθησε στην απόξυση των κυττάρων ασκώντας μηχανική πίεση. Ύστερα η συνολική ποσότητα που συλλέχθηκε διαμοιράστηκε σε τρία (3) eppendorfs, τα οποία τοποθετήθηκαν κατευθείαν στον πάγο για 30 λεπτά.

Κατά την επώαση ανά τακτά χρονικά διαστήματα εκτελέστηκαν έντονες αναδεύσεις (vortex). Ακολούθως τα eppendorfs με τα κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa SP υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i)χρόνος λειτουργίας 30 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 13.300rpm για το διαχωρισμό των διαλυτών από τα αδιάλυτα συστατικά του κυτταρικού εκχυλίσματος. Το σύνολο του υπερκειμένου από τα eppendorfs μαζεύτηκε σε ένα falcon V=15ml. Στη συνέχεια ορισμένος όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος αξιοποιήθηκε για να εκτελεστεί η φωτομετρική διαδικασία Bradford. Με την τιμή της απορρόφησης στα A₅₉₅nm και την αξιοποίηση της γραμμικής εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης προσδιορίστηκε η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης. Η ποσοτικοποίηση βοήθησε στον υπολογισμό του όγκου του κυτταρικού εκχυλίσματος HeLa SP που έπρεπε να κρατηθεί ως input και κατ' επέκταση του όγκου που έπρεπε να κατανεμηθεί ισόποσα στα πέντε (5) eppendorfs με τα προσδεδεμένα με τις επικράτειες του HIF-2a σφαιρίδια. Ύστερα σφραγίστηκαν και επωάστηκαν στο cold room υπό μικρή περιστροφική ανάδευση για 14-16 ώρες (O/N). Μόλις συμπληρώθηκε το χρονικό διάστημα επώασης των σφαιριδίων με το κυτταρικό εκχύλισμα HeLa SP πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii)ταχύτητα περιστροφής 800 rcf. Αυτή διευκόλυνε την απομάκρυνση του υπερκείμενου χωρίς να διαταραχθούν τα σφαιρίδια με συνδεδεμένες πρωτεΐνες.

Αμέσως μετά εμπλουτίστηκαν με ανανεωμένο διάλυμα Lysis-Washing Buffer και μεταφέρθηκαν στο cold room υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς για 10 λεπτά για την πλύση των σφαιριδίων. Με την επακόλουθη φυγοκέντρηση ολοκληρώθηκε η πλύση. Η διαδοχή των βημάτων πλύσης έγινε τρεις (3) φορές. Στην τελευταία αφαιρέθηκε πλήρως το υπερκείμενο Buffer προκειμένου να προστεθεί ορισμένος όγκος SDS (2X), χωρίς να αραιωθεί. Κατά την κατεργασία με SDS σε χρονικό διάστημα 5 λεπτών υποβλήθηκαν σε εναλλαγές 1 λεπτού ανάμεσα σε έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση σε RT για την έκλουση των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με τα σφαιρίδια. Άμεσα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 13300rpm για το διαχωρισμό των σφαιριδίων και των πρωτεϊνικών συστατικών που έχουν χάσει τη δέσμευση με τα προηγούμενα. Γεγονός που βοήθησε στη μεταφορά αυτών των πρωτεϊνικών συστατικών συστατικών σε νέα eppendorfs με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για Western Blot ανάλυση.

3.2.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΥΨΗΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (ΜΑΧΙ PREPARATION)

Σε ασηπτικές συνθήκες μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη V=500ml συμπληρώθηκε με V=250ml θρεπτικό υλικό Luria-Britani (LB) Broth, το οποίο αμέσως μετά εμπλουτίστηκε με V=250μl του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη (Amp). Ακολούθως βουτώντας το tip από το διάλυμα αποθήκευσης γλυκερόλης στο θρεπτικό υλικό (LB) πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός μικρής ποσότητας μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων TOP10 (περιέχουν πλασμίδιο με περιοχή flag-Ataxin10). Αφού στεγανοποιήθηκε η κωνική φιάλη, ύστερα τοποθετήθηκε σε ειδική θέση στον επωαστήρα για να γίνει επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό διαρκή ανάδευση για 12-16 ώρες. Μετά την ολονύχτια επώαση μεταφέρθηκε V=1ml καλλιέργειας από την κωνική φιάλη σε κυψελίδα και σε συνδυασμό με την απομόνωση V=2ml από το stock του απλού θρεπτικού υλικού και το διαμοιρασμό σε δύο (2) κυψελίδες που αντικατοπτρίζουν τα τυφλά δείγματα πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ανάπτυξης της καλλιέργειας μέσω της διαδικασίας της φωτομέτρησης στα 600nm.

Αφού διαπιστώθηκε η απαιτούμενη ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων ο όγκος V της καλλιέργειας ισομοιράστηκε σε δύο (2) σωλήνες φυγοκέντρησης, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 10 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 5000 για τη διάκριση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων ως ίζημα και του θρεπτικού υλικού ως υπερκείμενο. Αυτή διευκόλυνε την απομάκρυνση του υπερκειμένου αναποδογυρίζοντας τους σωλήνες φυγοκέντρησης. Τα εναπομείναντα ιζήματα μεταφέρθηκαν στον πάγο για να διατηρηθούν μέχρι την επόμενη μεταχείρισή τους.

Ενόσω βρίσκονταν στον πάγο προστέθηκε με τον πιπεταδόρο και το γυάλινο σιφώνιο V=10ml Resuspension Buffer (RES + RNase A) V=4ml και με τα ίδια εκτελέστηκε updown για την επαναιώρηση του ιζήματος. Έπειτα τα επαναιωρήματα ενοποιήθηκαν σε ένα falcon V=50ml για την ευκολότερη διαχείρισή τους προς την απομόνωση πλασμιδίου. Αμέσως μετά στο falcon προστέθηκε ίσος όγκος V=8ml του Cell lysis Buffer και εκτελέστηκε ήπια ανάδευση με το χέρι για την ομογενοποίηση του διαλύματος και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Με αυτό τον τρόπο η εφαρμογή των αλκαλικών συνθηκών ευνόησε τη διατάραξη της μεμβράνης χωρίς την επιμόλυνση του εναιωρήματος . Ταυτόχρονα περιχύθηκε περιμετρικά με τον πιπεταδόρο και το γυάλινο σιφώνιο V=10ml σταδιακά Equilibration Buffer V=12ml (V=6ml τη φορά) για την ενυδάτωση και την εξισορρόπηση της στήλης. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος προστέθηκαν V=8ml Neutralization Buffer το οποίο βοήθησε την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και του χρωμοσωμικού DNA μέσω ήπιας ανάδευσης. Το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με το σταδιακό αποχρωματισμό του μπλε διαλύματος. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 10 λεπτά και ii) ταχύτητα περιστροφής 5000g για το διαχωρισμό των δύο (2) φάσεων. Το συνολικό περιεχόμενο του falcon φορτώθηκε στη στήλη. Αφού πέρασε η υγρή φάση από τη στήλη προστέθηκαν περιμετρικά V=5ml Equilibration Buffer για την πλύση της εναπομένουσας στατικής φάσης στο φίλτρο. Έπειτα αφαιρέθηκε το φίλτρο και πραγματοποιήθηκε εκ νέο πλύση με την εισαγωγή V=8ml Wash Buffer στη στήλη. Μετά τις πλύσεις η στήλη συμπληρώθηκε με V=5ml Elution Buffer για την έκλουση του πλασμιδιακού DNA σε falcon V=15ml, το οποίο είχε προσαρμοστεί κατάλληλα κάτω από τη στήλη. Στη συνέχεια ο συνολικός όγκος V του Elution Buffer μαζί με το πλασμίδιο κατανεμήθηκε ισόποσα σε eppendorfs, τα οποία τοποθετήθηκαν στον πάγο. Αφού σε αυτά ισομοιράστηκαν V=3,5ml ισοπροπανόλης ακολούθησε έντονη ανάδευση με Vortex και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 30 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 15000g για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA και το μετέπειτα διαχωρισμό απομακρύνοντας το υπερκείμενο. Η συνεπαγόμενη ανασύσταση του ιζήματος έγινε με το διαμοιρασμό V=2ml 70% αιθανόλης και κάνοντας up-down στα eppendorfs. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση με παρόμοιες παραμέτρους για την απομάκρυνση της αιθανόλης προκειμένου να στεγνώσει το ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η τελευταία επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένο H₂O V=500μl για να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Nanodrop 2000.



Εικόνα 10: Διαδικασία απομόνωσης του πλασμιδίου που παράγει την υπερεκφρασμένη ΑΤΑΧΙΝ-10 με επίτοπο Flag

3.2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕΣΩ BRADFORD

Αμέσως μετά την παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος υποβάλλεται στη χρωματομετρική μέθοδο Bradford προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη. Στηρίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue-R250 από κόκκινο σε μπλε κατά τη συμπλοκοποίησή της με πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες. Η συγκεκριμένη ιδιότητα της επιτρέπει να φτάνει το φάσμα απορρόφησης της χρωστικής ως τα 595nm. Για τη διαδικασία της μέτρησης σε σωλήνα τύπου eppendorf (V=1.5ml) προστέθηκε κατά σειρά μικρός όγκος του δείγματος. Έπειτα ο συγκεκριμένος όγκος αραιώθηκε σε V=100 μl απιονισμένο νερό (ddH2O). Τελευταίο κατά σειρά ενσωματώθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Μόλις ολοκληρώθηκε η σύσταση του προς μέτρηση δείγματος ακολούθησε επώαση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Αφού συμπληρώθηκε το απαιτούμενο χρονικό διάστημα μεταφέρεται το διάλυμα σε κατάλληλη πλαστική κυψελίδα ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση στα 595nm. Να σημειωθεί ότι η οπτική παρατήρηση των προς μέτρηση δειγμάτων μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα του πρωτεϊνικού φορτίου. Εφόσον η τιμή της απορρόφησης βρίσκεται εντός των ορίων που ορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), τότε αξιοποιείται η εξίσωση που την περιγράφει προκειμένου να αναγθεί η απορρόφηση σε συγκέντρωση πρωτεΐνης

3.2.2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε μέσο ακρυλαμιδίου κατατάσσεται στις μεθόδους διαχωρισμού πρωτεϊνικών συστατικών ενός μίγματος χρησιμοποιώντας ως μέτρο το μοριακό βάρος τους. Η αρχή της μεθόδου είναι ότι φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια μετακινούνται με διαφορετικό ρυθμό μέσα από τους πόρους της πηκτής με τη βοήθεια ενός διαλύτη και την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η κινητικότητα ενός μορίου μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες: i) την ένταση του πεδίου, ii) το καθαρό φορτίο του μορίου, την ιοντική ισχύ και τις ιδιότητες του μέσου. Το μέσο που αξιοποιείται στη συγκεκριμένη μορφή ηλεκτροφόρησης είναι διασυνδεδεμένες αλυσίδες πολυμερών ακρυλαμιδίου, το οποίο συμπεριφέρεται σαν μοριακό κόσκινο η σύσταση του οποίου εξαρτάται από το μήκος και το βαθμό διασύνδεσης των αλυσίδων. Κατά τη μετακίνησή τους τα πρωτεϊνικά μόρια διέρχονται από δύο (2) πηκτές ίδιας ποιοτικής αλλά διαφορετικής ποσοτικής σύστασης και ως εκ τούτου τιμής pH, την πηκτή συσσώρευσης (stacking) και την πηκτή διαχωρισμού (separation).

Όπως δηλώνουν και το ονόματα τους η πρώτη είναι επιφορτισμένη για τη συσσώρευση όλων των συστατικών του δείγματος σε μια στοιβάδα με σκοπό το κοινό σημείο έναρξης, ενώ η δεύτερη επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ζώνες ανάλογα με το μέγεθός τους. Η παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων εξασφαλίζεται μέσω του διαλύματος προετοιμασίας των πρωτεϊνών για ηλεκτροφόρηση. Σε αυτούς ανήκει το αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), το οποίο αλληλεπιδρά χημικά με όλες τις περιοχές των πρωτεϊνών.

Κατά αυτό τον τρόπο καταργώντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αποδιατάσει τις πρωτεΐνες και παράλληλα προσδίδει καθαρό αρνητικό φορτίο, με συνέπεια όλες οι πρωτεΐνες να έχουν την ίδια αναλογία φορτίου προς μάζα. Έτσι επιτρέπεται να πραγματοποιείται μονόδρομη μετανάστευση των πρωτεΐνικών συστατικών ενός μίγματος από το αρνητικά στο θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο βασιζόμενη αποκλειστικά στο μοριακό βάρος τους. Άλλωστε μετακινούνται διαμέσου της πηκτής διαχωρισμού έως ότου το μέγεθός τους δεν επιτρέπει να διαπεράσουν τους πόρους του πλέγματος της πηκτής. Έτσι προκύπτει ότι η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου, είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού του βάρους. Συνεπώς μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο. Απαραίτητη είναι η παρουσία ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Για τη σύνθεση των πηκτών της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αξιοποιήθηκαν οι συσκευές προετοιμασίας των εταιριών Biorad και Hoeffeur. Η ηλεκτροφόρηση εκτελέστηκε σε 120V και σταθερά mAmber.

3.2.2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών συστατικών που έχουν διαχωριστεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε επώαση της πηκτής με διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 για 15 λεπτά υπό ανάδευση. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η μονιμοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων στην πηκτή καθώς έγιναν αδιάλυτα λόγω του οξικού οξέος. Ακολούθησε έκπλυση υπό ανάδευση της πηκτής με διάλυμα οξικού οξέος-μεθανόλης για 30 λεπτά για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής που δεν προσδέθηκε στις πρωτεϊνες. Τέλος η πηκτή διατηρήθηκε σε H₂O.

3.2.2.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT

Συμπεριλαμβάνεται στις τεχνικές ανοσοπροσδιορισμού κατά τις οποίες αξιοποιούνται ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση ποσοτήτων συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα που έχουν αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE. Επειδή όμως τα αντισώματα είναι πολύ μεγάλα για να διαπεράσουν την πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι απαραίτητο οι αποδιαταγμένες πρωτεϊνες της πηκτής να μεταφερθούν στην επιφάνεια ενός φύλλου πολυμερούς όπου και θα καθηλωθούν σε αυτό εξαιτίας υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Αναλυτικά αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE απομονώνεται η πηκτή με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες και διατηρείται ενυδατωμένη με την άμεση επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών Transfer Buffer 1X μέχρι τη χρήση της. Παράλληλα η κατάλληλη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

Έπειτα στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) τοποθετούνται κατά σειρά μια στοιβάδα με τρία (3) διηθητικά χαρτιά Whatman, τα οποία έχουν επίσης εμβαπτιστεί στο διάλυμα μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πάνω στην οποία εφαρμόζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακόμη μια στοιβάδα με τρία (3) ενυδατωμένα διηθητικά χαρτιά Whatman έτσι ώστε η μεμβράνη να είναι προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στο αρνητικό. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών εκτελέστηκε σε 80 mAm και σταθερά Volt για 75 λεπτά.

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα Ponceau S, το οποίο αποκαλύπτει τις κόκκινες ζωνώσεις των πρωτεϊνών. Αμέσως μετά ακολούθησε μια γρήγορη πλύση με απιονισμένο νερό (ddH2O) για την απομάκρυνση της χρωστικής. Ύστερα η μεμβράνη εμβαπτίστηκε με 5% γάλα αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-0,1%Tween 20 για 1 ώρα υπό ανάδευση προκειμένου να συμπληρωθούν οι θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις αντίστοιχες του γάλατος και έτσι να μπλοκαριστούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Μόλις ολοκληρώθηκε το χρονικό διάστημα η μεμβράνη υποβλήθηκε σε πλύση με το ρυθμιστικό διάλυμα TBS-0,1%Tween 20 υπό ανάδευση για 5 λεπτά και έπειτα ανανεώθηκε με το ίδιο διάλυμα. Η διαδικασία συνολικά επαναλήφθηκε τρεις (3) φορές για την πλήρη απομάκρυνση του γάλατος. Κατά την τελευταία πλύση αφαιρέθηκε πλήρως το ρυθμιστικό διάλυμα και προστέθηκε το πρώτο (1°) αντίσωμα έναντι του αντιγόνου σε συγκεκριμένη αραίωση 5% γάλατος με σκοπό να αντικαταστήσει μόνο τις ειδικές θέσεις σύνδεσης. Μετά την εφαρμογή του η μεμβράνη απομονώθηκε από τον ατμοσφαιρικό αέρα και πραγματοποιήθηκε ολονύχτια επώαση στους 4οC υπό μικρή διαρκή ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της επώασης αφαιρέθηκε η περίσσεια του πρώτου (1°) αντισώματος και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με TBS-01% Tween 20 κατά τον ίδιο τρόπο για την απομάκρυνση οποιαδήποτε ποσότητας συνδέθηκε μη ειδικά πάνω στη μεμβράνη. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στη μεμβράνη μπορεί να ανιχνευθεί με ένα δεύτερο (2°) αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Για το λόγο αυτό, μετά τις πλύσεις, προστέθηκε το δεύτερο (2°) αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση 5% γάλατος στη μεμβράνη και έγινε επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση στους 25°C. Ακολούθησαν οι πλύσεις της μεμβράνης με το ίδιον τρόπο και τον ίδιο στόχο.

Για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών αξιοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Για τη διεκπεραίωση αυτής προηγήθηκε η επώαση της μεμβράνης σε V~10ml διαλύματος εμφάνισης για 1 λεπτό σε σκοτεινό μέρος. Με αυτό τον τρόπο η λουμινόλη προσδένεται στις πρωτεΐνες και με την παρουσία των κατάλληλων υποστρωμάτων εκπέμπει φως. Για την ανίχνευση της χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System.

3.3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.3.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Η μελέτη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa, U87MG και T98G πραγματοποιήθηκε με την καλλιέργειά τους σε αποστειρωμένα πιάτα καλλιέργειας (διαφόρων διαστάσεων) με την παρουσία θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Biosera συμπληρωμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) και μίγμα αντιβιοτικών που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Η ανάπτυξη των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες έγινε στον επωαστήρα Heal Force HF 90 σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και σε 5% CO₂. Περαιτέρω μεταχείριση των κυτταροκαλλιεργειών διενεργήθηκε εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό στείρες συνθήκες.

3.3.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΙF-2α

Για τη διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α μέσα στα κύτταρα, οι νευρωνικές κυτταρικές σειρές U87MG και T98G υποβλήθηκαν σε συνθήκες υποξίας με την επώαση τους σε δύο (2) χρονικά διαστήματα (24 h και 48 h) σε 1%O₂, 94%N2 και 5%CO₂ στον ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO₂ 200 (Baker Ruskinn, Sanford, Maine, USA). Παράλληλα και με την εφαρμογή του αναστολέα PT2385 στα κύτταρα μελετήθηκε η έκφραση και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α.

3.3.3.3 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη μεταφορά του πιάτου καλλιέργειας από τον επωαστήρα μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής για να εκτελεστεί η διαδικασία σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Σε αυτόν διενεργήθηκε η απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια αντλίας. Ακολούθησε πλύση με V=5ml διαλύματος PBS 1X, η οποία αφαιρέθηκε άμεσα, απομακρύνοντας με αυτό τον τρόπο παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και υπολείμματα του θρεπτικού. Έπειτα προστέθηκαν V=400μl θρυψίνης και πραγματοποιήθηκε επώαση για 5 λεπτά στον επωαστήρα στους 37°C. Η παρουσία της θρυψίνης ευνοεί τη διάσπαση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνών προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας και του πιάτου καλλιέργειας. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος ρίχτηκαν V=2ml θρεπτικού υλικού για την αδρανοποίηση της πρωτεάσης σε αραίωση 1:4. Παράλληλα ένα αντίστοιχο πιάτο καλλιέργειας συμπληρώθηκε με V=3.5ml θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια στο πιάτο με τα κύτταρα εκτελέστηκε up-down σε όλη την επιφάνεια του για την πλήρη αποκόλληση όλων των κυττάρων. Μετά τη διαδικασία αυτή μεταφέρθηκαν V=500μl κυττάρων στο νέο πιάτο, το οποίο ανακινήθηκε ομαλά και τοποθετήθηκε στον επωαστήρα. Η ανακαλλιέργεια εξαρτάται από την πυκνότητα των κυττάρων (70-80% confluency) συνεπώς επαναλαμβάνεται ανά 2-3 μέρες.

3.3.3.4 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο εργασίας απορρίφθηκε το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS 1X. Μετά την απομάκρυνση της πλύσης προστέθηκε με χαμηλό ρυθμό με πιπεταδόρο και πλαστικό σιφώνιο V=10ml φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM V=3ml στα τοιχώματα του πιάτου καλλιέργειας προκειμένου να μη διαταραχθεί η σύνδεση των προσκολλημένων κυττάρων στο πιάτο καλλιέργειας.

3.3.3.5 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ-ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Αφού έχει εξασφαλιστεί ότι όλα τα διαλύματα βρίσκονται κοντά στη θερμοκρασία επώασης τα πιάτα καλλιέργειας μεταφέρθηκαν μέσα στο θάλαμο. Ακολούθησαν τη συγκεκριμένη κατεργασία για την απομάκρυνση του θρεπτικού και την προσεκτική εισαγωγή του διαλύματος PBS 1X V=2-4ml για την πλύση των κυττάρων. Η συνεπακόλουθη άμεση αφαίρεση όλου του όγκου PBS 1X αποσκοπούσε να μην αραιωθεί η θρυψίνη. Έτσι διευκολύνθηκε η διαδικασία της θρυψινοποίησης για την αποκόλληση των κυττάρων. Αφού επιβεβαιώθηκε αυτή με το μικροσκόπιο για την αναστολή της δράσης του ενζύμου συμπληρώθηκε το πιάτο καλλιέργειας με ορισμένο όγκο θρεπτικού υλικού DMEM. Για την πλήρη συλλογή των κυττάρων εκτελέστηκε up-down σε όλη την επιφάνεια του πιάτου. Στη συνέχεια με την πιπέτα μαζεύτηκε το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα eppendorf V=1.5ml μέσω του οποίου υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 5 λεπτά στους 25°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 1900rpm για να πέσουν τα κύτταρα και να διαχωριστούν από το ένζυμο. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απορροφήθηκε σχεδόν όλο το υπερκείμενο και ύστερα πραγματοποιήθηκε ανασύσταση με V=800μl DMSO διαλυμένο σε ορό. Έπειτα ο συνολικός όγκος μεταφέρθηκε σε ένα cryo-vial, το οποίο αρχικά αποθηκεύτηκε στους -80°C για 1-2 μέρες ώστε να πραγματοποιηθεί σταδιακή ψύξη των κυττάρων και μετά μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο (-196°C) για συντήρηση.

Για την επανέναρξη της καλλιέργειας τα κύτταρα ξεπάγωσαν σταδιακά βυθίζοντας τα 2/3 του cryo-vial στο υδατόλουτρο στους 37°C. Αφού μεταφέρθηκαν στο θάλαμο αποχύθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με V=7ml πλήρους θρεπτικού υλικού και για την ανάπτυξή τους τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 37°C.

3.3.3.6 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ HeLa

Μετά την ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού DNA το επόμενο βήμα ήταν η προετοιμασία του διαλύματος διαμόλυνσης. Για το σκοπό αυτό έγινε αναγωγή στο μέγεθος της μάζας του πλασμιδίου που απαιτείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων HeLa που καλλιεργούνται σε πιάτο διαστάσεων 10cm².

Κατά αυτό τον τρόπο εκτιμήθηκε ο όγκος V (μl) που χρειάζεται να απομονωθεί από το σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml με το απομονωμένο πλασμίδιο. Με βάση τη γενική αναλογία DNA προς μέσο διαμόλυνσης 1:2 υπολογίστηκε ο αντίστοιχος όγκος V (μl) παρουσίας του δεύτερου. Τα δύο (2) παραπάνω συστατικά μαζί ήταν διαλυμένα σε συγκεκριμένο όγκο V θρεπτικού υλικού απουσία εμβρυϊκού βόειου ορού (FBS) και αντιβιοτικών. Έτσι σύμφωνα με τον παραπάνω συλλογισμό σε ένα σωλήνα τύπου falcon V=15ml προστέθηκε κατά σειρά το θρεπτικό υλικό, το πλασμιδιακό DNA και το PEI (Polyethylamine), το οποίο έγει την ικανότητα να δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA διευκολύνοντας την προσέγγιση του στην κυτταρική επιφάνεια και μετέπειτα την ενσωμάτωσή του στα κύτταρα. Άμεσα ομογενοποιήθηκε με ήπια ανάδευση και ακολούθησε επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Παράλληλα σε ένα σωλήνα τύπου falcon V=50ml προστέθηκε ίσος όγκος V=25ml DMEM -/- και πλήρους θρεπτικού υλικού με ορό και αντιβιοτικά για τη δημιουργία θρεπτικού υλικού με 5% FBS. Με την ολοκλήρωση της επώασης τα πιάτα καλλιέργειας με ικανοποιητική κάλυψη από τα κύτταρα HeLa βγήκαν από τον επωαστήρα και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο για επεξεργασία. Αναλυτικά αντλήθηκε η περίσσεια ποσότητας του θρεπτικού υλικού. Μετά κατευθείαν με τον πιπεταδόρο και το πλαστικό σιφώνιο V=10ml συμπληρώθηκαν τα πιάτα με V=5ml θρεπτικό υλικό 5% FBS στο τοίχωμα τους για να μην αποκολληθούν τα κύτταρα. Έπειτα ρίχτηκε V=1ml του μίγματος διαμόλυνσης στο πιάτο καλλιέργειας. Για τη διάδοσή του σε όλη την έκταση του πιάτου εκτελέστηκαν ήπιες κυκλικές κινήσεις. Ύστερα τα πιάτα τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα και παρέμειναν για 3,5 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε το χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού και μάλιστα με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού με τον τρόπο που περιγράφεται στην ενότητα ανανέωση θρεπτικού υλικού. Τέλος τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα για την ανάπτυξή τους για χρονικό διάστημα που καθορίζεται ανάλογα με την πειραματική διαγείριση.

3.3.3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WST

Η μέθοδος WST-1 ανήκει στις δοκιμασίες μέτρησης του πολλαπλασιασμού ή/και της βιωσιμότητας των κυττάρων, οι οποίες αξιοποιούν ως μέτρο τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, χαρακτηριστικό που τις καθιστά ευμετάβλητες σε οξειδοαναγωγικούς μεταβολίτες. Ειδικότερα στηρίζεται σε ένα άλας τετραζολίου WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium], το οποίο όταν εισέρχεται στο εσωτερικό ζωντανών κυττάρων ανάγεται λόγω της παραγωγής ενζύμων αφυδρογονασών (όπως NADH) από τα μιτοχόνδρια. Από τη συγκεκριμένη αντίδραση συντίθεται μια ένωση που ονομάζεται formazan, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί χρωματομετρικά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η αναλογική σχέση χρωματισμού και δράση ενζύμου συνεπάγεται πως η μεγαλύτερη ένταση της χρωστικής συνοδεύει την υψηλή ενεργότητα του ενζύμου και κατ' επέκταση αναδεικνύει τον υψηλό αριθμό βιώσιμων κυττάρων. Μάλιστα η συγκεκριμένη δοκιμασία παράγει μια υδατοδιαλυτή μορφή της ένωσης formazan καθιστώντας τη μέτρηση άμεση και επαναλήψιμη.

1^η μέρα << Προετοιμασία για επίστρωση κυττάρων σε 96 well >>: Αναλυτικά δύο (2) πιάτα καλλιέργειας (με διαστάσεις 60mm) με τι κυτταρικές σειρές U87MG και T98G εξήλθαν από τον επωαστήρα και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής για τη μεταχείρισή τους υπό στείρες συνθήκες. Η πρώτη κατεργασία αφορούσε την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πιάτα καλλιέργειας με τη βοήθεια της αντλίας. Αμέσως μετά με τον πιπεταδόρο και το κατάλληλο πλαστικό σιφώνιο V=10ml προστέθηκε PBS 1X για την απομάκρυνση παραπροϊόντων κυττάρων και υπολειμμάτων θρεπτικού. Κατά παρόμοιο τρόπο αφαιρέθηκε άμεσα η πλύση με PBS 1X και ακολούθησε η επώαση με V=7ml θρυψίνης για 3-5 λεπτά στον επωαστήρα στους 37°C με στόχο την αποκόλληση των κυττάρων. Μετά το πέρας της επώασης μεταφέρθηκαν V=14ml θρεπτικού υλικού για την αδρανοποίηση της πρωτεάσης. Στη συνέγεια κάθε κυτταρική σειρά συλλέχθηκε σε ένα falcon V=50ml, το οποίο υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 5 λεπτά σε RT και ii) ταχύτητα περιστροφής 1900rpm για την ιζηματοποίηση και διαχωρισμό των ευκαρυωτικών κυττάρων από το μίγμα θρεπτικού με θρυψίνη. Αυτός διευκόλυνε την απομάκρυνση του υπερκειμένου. Άμεσα τα κύτταρα συμπληρώθηκαν με V=10ml πλήρες θρεπτικό υλικό για την ανασύσταση του ιζήματος εκτελώντας up-down. Κατευθείαν μεταγγίστηκαν V=20μl σε ένα (1) σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml, στο οποίο προστέθηκε ίσος όγκος V χρωστικής Trypan Blue για να ισχύει η αραίωση 1:2. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε μικρός όγκος V πάνω στο αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer) για την μέτρηση των κυττάρων. Μετά την καταμέτρηση πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί προκειμένου να βρεθεί ο όγκος V κυττάρων που πρέπει να προστεθεί ώστε κάθε 96 well να περιέγει 5000 κύτταρα. Τα 96 well πέρα από τα κύτταρα εμπλουτίστηκαν και με V=100μl πλήρες θρεπτικό για την ανάπτυξή τους.

2^η μέρα <<Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας σε 96 well>>: Διατήρηση καλλιέργειας στον επωαστήρα στους 37°C για ανάπτυξη.

3^η μέρα «Μέτρηση πολλαπλασιασμού κυττάρων με WST-1»: Αρχικά σε ένα (1) σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5 ml παρασκευάστηκε το μίγμα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αποτελούμενο από το αντιδραστήριο WST-1 αραιωμένο σε θρεπτικό DMEM -/- σε όγκο που καθορίζεται από τον αριθμό των wells. Αφού επιβεβαιώθηκε πως τα κύτταρα έφτασαν τον επιθυμητό βαθμό ανάπτυξης εξήλθαν από τον επωαστήρα και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο για να πραγματοποιηθεί η κατάλληλη κατεργασία. Αναλυτικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό με απορρόφηση με την αντλία. Αμέσως μετά προστέθηκε συγκεκριμένος όγκος V από το μίγμα του πολλαπλασιασμού και έγινε ανακίνηση έτσι ώστε το αντιδραστήριο να εισέλθει στα κύτταρα. Παράλληλα σε ένα (1) 96 well προστίθεται το μίγμα πολλαπλασιασμού χωρίς κύτταρα που αξιοποιείται ως τυφλό. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στους αντίστοιχους θαλάμους για να επωαστούν 1 ώρα σε φυσιολογικές και υποξικές συνθήκες. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος εκτελέστηκε απευθείας φωτομέτρηση στο μήκος κύματος 440nm κατά το οποίο μετρήθηκε ο βαθμός αναγωγής του άλατος τετραζολίου που αντικατοπτρίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με την ολοκλήρωση της φωτομέτρησης τα κύτταρα επωάστηκαν στις αντίστοιχες συνθήκες για τις επόμενες μετρήσεις κατά τον ίδιο τρόπο στις 24h και 48h.

3.3.3.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

Όταν η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών U87MG και T98G κάλυψε περίπου το 70-80% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας, τα τελευταία μεταφέρθηκαν στο θάλαμο για να απομονωθούν τα κύτταρα. Αρχικά αντλήθηκε η περίσσεια του θρεπτικού υλικού και αμέσως μετά με τον πιπεταδόρο και το πλαστικό σιφώνιο V=10ml ρίχτηκε διάλυμα PBS 1X για την πλύση και την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού και προϊόντων μεταβολισμού των κυττάρων. Αφού αφαιρέθηκε η πλύση με τη βοήθεια της αντλίας κατά τον ίδιο τρόπο προστέθηκε V=1ml διάλυμα PBS 1X, το οποίο διευκόλυνε την εφαρμογή της μηχανικής πίεσης για την απόξυση των κυττάρων από όλη την επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας. Ύστερα ο συγκεκριμένος όγκος κυτταρικού εναιωρήματος συλλέχθηκε σε ένα eppendorf, το οποίο άμεσα τοποθετήθηκε στον πάγο για τη διατήρηση των κυττάρων. Τα 2/3 του όγκου (V=750μl) του κυτταρικού εναιωρήματος διαχωρίστηκαν σε ένα νέο σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml για την κατεργασία με σκοπό την απομόνωση του RNA. Ενώ ο εναπομένον όγκος (V=250μl) επεξεργάστηκε για την απόκτηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος.

3.3.3.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΜΑΖΑΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Όσον αφορά το σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml που περιέχει τα V=250µl κυτταρικού εναιωρήματος υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 5 λεπτά και ii) ταχύτητα περιστροφής 13300rpm με σκοπό τον διαχωρισμό των αδιάλυτων κυττάρων από τα διαλυτά συστατικά του εναιωρήματος. Αυτός διευκόλυνε πρώτα την απόρριψη του υπερκειμένου και μετέπειτα την προσθήκη V=40µl ανανεωμένου διαλύματος λύσης στο ίζημα για την παραλαβή του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό ύστερα από την επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης εκτελούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα έντονη ανάδευση με το Vortex. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας έγινε φυγοκέντρηση βασιζόμενη στις παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 10 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 13300g για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στο διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα.

3.3.3.10 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

Ο άλλος σωλήνας τύπου eppendorf V=1.5ml με τα V=750μl κυτταρικού εναιωρήματος υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση με υψηλή ταχύτητα περιστροφής για λίγα λεπτά (spin) για να διακριθούν τα κύτταρα ως ίζημα, με συνέπια την εύκολη απομάκρυνση του υπερκειμένου (διάλυμα PBS 1X). Αμέσως μετά με την εφαρμογή V=300μl φαινολικού αντιδραστηρίου NucleoZOL πραγματοποιήθηκε επανασύσταση του ιζήματος, κάνοντας up-down. Με την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης προστέθηκαν V=160μl H₂O απουσία ριβονουκλεασών και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου RT.

Με την ολοκλήρωση της επώασης έγινε φυγοκέντρηση σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 15 λεπτά στους 4°C και ii) ταχύτητα περιστροφής 12000g με στόχο τη διατήρηση του RNA στην υδατική φάση και την ιζηματοποίηση του DNA και διαφόρων πρωτεϊνών. Έπειτα από τον όγκο της υδατικής φάσης απομονώθηκαν V=500μl σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml, το οποίο συμπληρώθηκε με ίσο όγκο V 100% ισοπροπανόλης (αναλογία 1:1) για να κατακρημνιστεί το RNA. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επώαση για 10 λεπτά σε RT και ακολούθησε φυγοκέντρηση με παρόμοιες παραμέτρους, λαμβάνοντας κατά αυτό τον τρόπο ένα άσπρο pellet στη βάση του eppendorf που αντικατοπτρίζει το RNA. Ύστερα προσεκτικά αφαιρέθηκε το υπερκείμενο έτσι ώστε το ίζημα να είναι διαθέσιμό να υποστεί πλύσεις με την προσθήκη V=500μl 75% αιθανόλης και την εκτέλεση φυγοκέντρησης βασιζόμενη στις παρακάτω παραμέτρους i) χρόνος λειτουργίας 3 λεπτά στους 4°C και ii) ταγύτητα περιστροφής 8000g για να απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη από το RNA. Η διαδικασία πλύσης επαναλήφθηκε συνολικά δύο (2) φορές. Κατά την τελευταία πλύση αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και αφέθηκε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου RT και επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα για λίγα λεπτά. Στη συνέγεια πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του ιζήματος με V=40μl H2O απουσία ριβονουκλεασών, κάνοντας up-down κατά την προσθήκη και μετέπειτα ανάδευση μέσω Vortex. Τέλος ο σωλήνας τύπου eppendorf V=1.5ml με τα V=40μl RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C.

3.3.3.11 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME, RT-PCR)

Η μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων DNA σε ένα βιολογικό δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συμμετοχή θερμοανθεκτικών ενζύμων πολυμεράσης του DNA, τα οποία έχουν την ικανότητα να συνθέτουν νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική προς την αλληλουγία-στόγος. Το ιδιαίτερο DNA χαρακτηριστικό της πολυμεράσης του να προσδένει ένα (1)δέοξυριβονουκλεοτίδιο τη φορά σε προϋπάρχουσα ελεύθερη ομάδα 3'-OH αναδεικνύει την απαραίτητη παρουσία συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), τα οποία μπορούν να αποτελέσουν τη μήτρα για την έναρξη σύνθεσης. Κατά αυτό τον τρόπο οριοθετείται το προϊόν που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες ύστερα από επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Οι πραγματικού χρόνου (Real Time) και αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription) PCR αποτελούν παραλλαγές της κλασσικής PCR. Και οι δύο (2) παρέγουν πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σε διαφορετικά επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης. Όσον αφορά την τελευταία παραλλαγή η διαφοροποίηση οφείλεται στο γεγονός ότι το αρχικό υπόστρωμα της αντίδρασης δεν αφορά γονιδιωματικό ή πλασμιδιακό δίκλωνο DNA, αλλά μονόκλωνο ώριμο mRNA από τα οποίο παράγονται αντίγραφα cDNA.

ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει την αξιοποίηση του RNA ως υπόστρωμα για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), η οποία καταλύεται από τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription, RT). Τα συγκεκριμένα ένζυμα συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές δραστηριότητες εξαιτίας της κύριας δραστικότητας πολυμεράσης του DNA εξαρτώμενη από το RNA και τη δραστικότητα της ριβονουκλεάσης Η (RNAase H). Αναλυτικά η αντίστροφη μεταγραφάση (RT) εκκινεί την αντίδραση σύνθεσης cDNA μέσω πρόσδεσης της στο εκμαγείο RNA με την παρουσία τυχαίων εξαμερών DNA (εκκινητές) που υβριδίζουν τυχαία σε πολλαπλές θέσεις του μεταγράφου και συνθέτει τμηματικά ενσωματώνοντας συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Αποτέλεσμα αυτής είναι η κατασκευή ενός υβριδικού δίκλωνου μορίου cDNA-RNA. Έπειτα συντελείται η διάσπαση της αλυσίδας RNA του υβριδίου, η οποία διαμεσολαβείται από της δραστικότητα RNAase Η της αντίστροφής. Στη συνέχεια με υπόστρωμα το cDNA και την παρουσία των ενζύμων πολυμεράσης του DNA και λιγάσης πραγματοποιείται η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA, με αποτέλεσμα να προκύπτει δίκλωνο DNA.

Αρχικά ο σωλήνας τύπου eppendorf V=1.5ml με V=40μl RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα επωάστηκε σε ξηρό πάγο για το σταδιακό ξεπάγωμα. Μόλις ξεπάγωσε πλήρως πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στο Nanodrop 2000. Έπειτα με την εφαρμογή κατάλληλου τύπου προσδιορίστηκε όγκος V του RNA που πρέπει να αραιωθεί σε απιονισμένο H₂O ώστε να έχει τελική συγκέντρωση C=1 μ g/10 μ l σύμφωνα με το πρωτόκολλο High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). Για την αντίδραση κατά σειρά προστέθηκαν τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα.

Συστατικά	Ογκοι V (μl)
H ₂ O	4.2
RT Buffer (10X)	2
dNTPS	0.8
RT Random Primers (10X)	2
RNA	10
Reverse Transcriptase	1
ΣΥΝΟΛΟ	20

Πίνακας 17

Παράλληλα προετοιμάστηκαν και δείγματα που αξιοποιούνται ως μάρτυρες αρνητικού ελέγχου που αφορούν

- i. δείγματα από τα οποία απουσιάζει το υπόστρωμα RNA (NTC) με σκοπό τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων
- ii. δείγματα χωρίς την προσθήκη του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (noRT) με σκοπό να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ενίσχυσης γονιδιωματικού DNA.

Μόλις τοποθετήθηκαν όλα τα αντιδραστήρια στον ειδικό σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml υποβλήθηκαν σε spin down για 10 δεύτερα για να συσσωρευτεί όλος ο όγκος V στη βάση του σωλήνα.

Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

- 10 λεπτά στους 25°C (υβριδοποίηση εκκινητών)
- 120 λεπτά στους 37°C (αντίστροφη μεταγραφή)
- 5 λεπτά στους 85°C (απενεργοποίηση του ενζύμου)
- 4°C ψύξη

Μετά το τέλος της αντίδρασης σύνθεσης οι σωλήνες τύπου eppendorf V=1.5ml με το cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

- ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ Η ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΡCR

Η συγκεκριμένη παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδραση της πολυμεράσης PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε πραγματικό χρόνο συσχετίζοντας την με το φαινόμενο του φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα στηρίζεται στην ιδιότητα της φθορίζουσας γρωστικής SYBRGREEN να διακρίνει τη δέσμευση σε ισχυρή και ασθενής ανάλογα με το μόριο DNA (δίκλωνο ή μονόκλωνο) πάνω στο οποίο προσδένεται και μετά να εκπέμπει την αντίστοιχο μήκος κύματος ακτινοβολίας. Έτσι προκύπτει ότι η ανίχνευση του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται αντιληπτή με τη μη ειδική σύνδεση της φθορίζουσας ουσίας και την ανίχνευσης στο πράσινο φάσμα με τη βοήθεια του laser προσαρμοσμένο σε κατάλληλο μήκος κύματος και ανιχνευτή στο θερμοκυκλοποιητή. Στην PCR σε πραγματικό χρόνο η εκπεμπόμενη ακτινοβολία φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο με τα κλασικά στάδια αποδιάταξης των δύο (2) κλώνων, της υβριδοποίησης των εκιννητών στη μήτρα DNA και τη επιμήκυνσης των τμημάτων. Οι συνεχόμενες μετρήσεις επιτρέπουν την κατασκευή μια καμπύλης ενίσχυσης στην οποία η ένταση του φθορίζοντος σήματος αντικατοπτρίζει τη στιγμιαία ποσοτική σύσταση του δείγματος όσον αφορά το ενισχυόμενο τμήμα, παρακολουθώντας κατά αυτό τον τρόπο την πορείας της αντίδρασης. Κατά την εφαρμογή των πρώτων κύκλων αντίδρασης η ενίσχυση της αλληλουχίας DNA έχει πραγματοποιηθεί σε μικρό βαθμό, συνεπώς ο φθορισμός βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης.

Ωστόσο το σημείο στο οποίο η ένταση του φθορισμού αυξάνεται πάνω από το υπόβαθρο αντιστοιχεί αναλογικά στον αρχικό αριθμό μορίων στο δείγμα. Όσο προχωράει η διαδικασία της αντίδρασης τόσα περισσότερα δίκλωνα μόρια συντίθενται με συνεπαγόμενη αύξηση του φθορισμού.

Η εναλλακτική ονομασία της Real Time PCR ως ποσοτική PCR φανερώνει την ικανότητά της να παρέχει ημιποσοτικά αποτελέσματα των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη προσέγγιση περιλαμβάνει την απόδοση του αριθμού των αντιγράφων του αρχικού δείγματος αξιοποιώντας τα δεδομένα κατά την καμπύλη ενίσχυση. Ενώ κατά το σχετικό υπολογισμό τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζονται ως υψηλότερα ή χαμηλότερα πολλαπλάσια σε σχέση το αντικείμενο ελέγχου. Η τελευταία αξιοποιείται σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης καθώς συσχετίζει το ρυθμό έκφρασης με την παραγωγή mRNA στο κύτταρο. Έτσι αναδεικνύεται ότι η διαδοχή των φάσεων της καμπύλης ενίσχυσης (φάση υστέρησης, εκθετική, γραμμική και φάση επιπέδωσης) διαμορφώνει την αποτελεσματικότητα της PCR, η οποία καθορίζει την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού του DNA. Οι σχετικές μετρήσεις που αφορούν την ποσοτικοποίηση λαμβάνονται κατά το τέλος της εκθετικής φάσης της αντίδρασης. Για τον υπολογισμό του λόγου αξιοποιείται η τιμή Ct που αντικατοπτρίζει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού, δηλαδή της παρουσίας δίκλωνων μορίων DNA να φτάνει ένα συγκεκριμένο όριο. Οπότε όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αργικού υποστρώματος.

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού αναλύθηκαν γονιδιακοί στόχοι της μεταγραφικής ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α όπως το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), αλλά και του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α όπως το γονίδιο της κινάσης του φωσφογλυκερινικού 1 (PGK1) και του ιδιοσύστατου γονιδίου της ριβοσωμικής υπομονάδας 18S που αξιοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Πρώτα οι σωλήνες τύπου eppendorf V=1.5ml με το cDNA για κάθε κυτταρική σειρά U87MG και T98G και οι μάρτυρες αρνητικού ελέγχου μεταφέρθηκαν στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν σταδιακά. Αφότου επανήλθε η υγρή φάση απομονώθηκε ένας μικρός όγκος V από κάθε συνθήκη και αραιώθηκε σε H2O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες σε νέους σωλήνες τύπου eppendorf V=1.5ml (αραίωση 1:10), τα οποία διατηρήθηκαν στον πάγο μέχρι τη μεταχείρισή τους. Έπειτα συντέθηκε εν μέρει το διάλυμα Master Mix με την ανάμιξη συγκεκριμένου όγκου V H2O και ζεύγος εκκινητών που καλύπτει όλες τι συνθήκες για κάθε γονιδιακό στόχο. Ακολούθως όλοι οι παραπάνω σωλήνες υποβλήθηκαν σε ήπια ανάδευση (vortex) και spin down για 1 λεπτό. Αμέσως μετά ξεκίνησε το γέμισμα των μικρών σωλήνων τύπου eppendorf κατάλληλων για PCR με το υπόστρωμα (cDNA) της αντίδρασης. Στη συνέχεια το διάλυμα του Master Mix συμπληρώθηκε με κατάλληλο όγκος V της φθορίζουσα χρωστικής SYBRGREEN. Ύστερα ισομοιράστηκε σε όλες τις συνθήκες. Έπειτα οι εναπομοινάντες όγκοι του Master Mix κάθε γονιδίου αναμίχθηκαν σε ένα κοινό σωλήνα τύπου eppendorf V=1.5ml από το οποίο μεταφέρθηκε όγκος στους μάρτυρες αρνητικού ελέγχου. Πριν την έναρξη της αντίδρασης υποβλήθηκαν σε spin down για 20 δεύτερα.

Κατά την αντίδραση πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι ενίσχυσης σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

- ❖ 2 λεπτά στους 50°C → ενεργοποίηση του ενζύμου πολυμεράσης του DNA
- ★ 10 λεπτά στους 94°C → αποδιάταξη δίκλωνου DNA υποστρώματος
- ✤ 15 δεύτερα στους 95°C → πλήρης αποδιάταξη
- ♦ 1 λεπτό στους 60°C → υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ U87MG ΚΑΙ T98G ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ATAXIN-10, η οποία διαφαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-2α, είναι μια πρωτεΐνη με σημαντική έκφραση σε νευρικά κύτταρα και θέλοντας να χρησιμοποιήσουμε τα κύτταρα αυτά περαιτέρω ακολούθησε καλλιέργεια και μελέτη του πολλαπλασιασμού τους σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου και σε υποξικές συνθήκες..

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές T98G και U87MG, που ανήκουν σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος και είναι απομονωμένες από ιστό εγκεφάλου, στον οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα η ATAXIN-10. Άμεσος σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν να προσδιοριστεί αν και κατά πόσο εκφράζουν τον HIF-2α και εάν η παρουσία του HIF-2α επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών.

Για το σκοπό αυτό ακολούθησε η καλλιέργεια των κυττάρων T98G, U87MG παρουσία ορού και απουσία ορού (-FBS) τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο WST-1 και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0h, 24h και 48h. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Διάγραμμα 1) δείχνουν ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, όσον αφορά την κυτταρική σειρά T98G, αυξάνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πυκνότητα με σταθερό ρυθμό κατά τη διάρκεια επώασης, φτάνοντας στο μέγιστο στις 48 ώρες. Στη κυτταρική σειρά U87MG, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο, αλλά με μεγαλύτερο σταθερό ρυθμό (αύξηση περίπου κατά 0,4). Επιπλέον στην ίδια κυτταρική σειρά σε καλλιέργεια με στέρηση ορού (U87MG -FBS) φαίνεται να διατηρείται αυτή η έντονη πολλαπλασιαστική δύναμη με την πάροδο του χρόνου.



Διάγραμμα 1: Σύγκριση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας ανάμεσα σε τρία (3) διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0h, 24h και 48h) υπό φυσιολογική συγκέντρωση οζυγόνου (O₂) στις κυτταρικές σειρές I) T98G, II) U87MG και III) U87MG απουσία FBS. Τα σχετικά αποτελέσματα έχουν προκύψει από δύο (2) βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Διάγραμμα 2) σε συνθήκες υποξίας δείχνουν ότι στην κυτταρική σειρά T98G ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αυξάνεται κατά τρεις (3) φορές μέσα στις 24 ώρες επώασης, όπου και προσεγγίζει το μέγιστο αριθμό του. Ωστόσο στις 48 ώρες φαίνεται ο πολλαπλασιασμός να μειώνεται και μάλιστα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πολλαπλασιασμός αποκτά τη μικρότερη τιμή του. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά U87MG φαίνεται να ενισχύεται ο κυτταρικός πληθυσμός αλλά σε μικρότερο βαθμό στις πρώτες 24 ώρες σε σύγκριση με την άλλη κυτταρική σειρά. Κατά το δεύτερο 24ωρο επώασης διακρίνεται πτώση (κατά 50% από τη μέγιστη τιμή) του αριθμού των κυττάρων, ο οποίος μάλιστα είναι μικρότερος και από τον αντίστοιχο στις 0 ώρες. Στο τελευταίο πεδίο με την ίδια κυτταρική σειρά σε σύγκριση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε μικρότερη έκταση από τις προηγούμενες συνθήκες κατά την 24ωρη επώαση. Ενώ αντίθετα παρατηρείται μεγαλύτερη πτώση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την επώαση στις 48 ώρες από τις υπόλοιπες καλλιέργειες.



Διάγραμμα 2: Σύγκριση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας ανάμεσα σε τρία (3) διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0h, 24h και 48h) σε συνθήκες υποζίας στις κυτταρικές σειρές Ι) T98G, II) U87MG και III) U87MG απουσία FBS. Τα σχετικά αποτελέσματα έχουν προκύψει από δύο (2) βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη.

4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385 ΣΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ U87MG KAI T98G

Με στόχο να ελεγχθεί η δράση του ειδικού αναστολέα PT2385 στην έκφραση και στη μεταγραφική δραστικότητα του HIF-2α στις νευρικές κυτταρικές σειρές U87MG και T98G πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών και RNA σε τρείς συνθήκες (νορμοξία, υποξία και υποξία παρουσία του αναστολέα PT2385) σε 24 ώρες επώασης.

4.2.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ U87MG ΚΑΙ Τ98G

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η παρουσία του αναστολέα **PT2385** επηρεάζεται την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α λήφθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων U87MG και T98G για κάθε συνθήκη, (νορμοξία, υποξία και υποξία παρουσία του αναστολέα PT2385) και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση κατάλληλου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-2α.

Τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 11) έδειξαν ότι όσον αφορά την κυτταρική σειρά U87MG σε νορμοξία (NU) δεν εκφράζεται ο HIF-2α, όπως αναμενόταν. Σε συνθήκες υποξίας (HU) ανιχνεύεται ένα έντονο σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (120 kDa) για τον HIF-2α, γεγονός που υποδηλώνει την επαγωγή της έκφρασής του. Στην ίδια διαδρομή διακρίνεται και ένα ισχνό σήμα σε μικρότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο, το οποίο πιθανόν αντιστοιχεί σε κάποια μη ειδική σύνδεση του αντισώματος. Ένα παρόμοιο μοτίβο λαμβάνεται και στη διαδρομή για την υποξία παρουσία του αναστολέα (PTU), δηλαδή ένα ασθενές μη ειδικό σήμα και ένα έντονο σήμα (ελαφρώς ισχυρότερο από την προηγούμενη συνθήκη) στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για τον HIF-2α, το οποίο υποδεικνύει ότι διατηρείται η έκφραση του HIF-2α. Τα αποτελέσματα στην κυτταρική σειρά T98G δείχνουν ότι σε συνθήκες νορμοξίας (NT), δε παρατηρείται έκφραση του HIF-2α. Σε συνθήκες υποξίας (HT) ανιχνεύεται ένα σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (120 kDa) για τον HIF-2α σε μικρότερο βαθμό από την αντίστοιχη συνθήκη στην κυτταρική σειρά U87MG, παρόλα αυτά ικανό για να δηλώσει την έκφραση του HIF-2α. Επίσης διακρίνεται κάτι σαν σκιά σε μικρότερο μοριακό βάρος, η οποία αντιστοιχεί σε μη ειδικό σήμα του αντισώματος. Σε συνθήκες υποξίας παρουσία του αναστολέα PT2385 (HPT) διακρίνεται ένα σήμα, ανάλογης έντασης με την προηγούμενη συνθήκη, στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για τον HIF-2α. Επίσης κατά αντιστοιχία λαμβάνεται και αυτή η μη ειδική σύνδεση σε μικρότερο μοριακό βάρος.



Αντίσωμα HIF-2α(rabbit)

Εικόνα 11: Ταυτοποίηση της παρουσίας του ΗΙF-2α και αζιολόγηση της δράσης του αναστολέα PT2385 μέσω της ανάλυσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάθε συνθήκης με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του HIF-2α. Το κόκκινο βέλος προσδιορίζει το μοριακό βάρος (120 kDa) στο οποίο εμφανίζεται η ειδική σύνδεση του αντισώματος σε όλες τις συνθήκες.

Έπειτα η μεμβράνη επωάστηκε με κατάλληλο αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης, παραγόμενη από ένα ιδιοσύστατο γονίδιο, το οποίο αποτελεί κριτήριο για την ισόποση φόρτωση όλων των συνθηκών και την ανάλυση της ποσοτικοποίησης βάσει αυτού.

Τα αποτελέσματα (Εικόνα 12) όσον αφορά την κυτταρική σειρά U87MG δείχνουν ότι στη διαδρομή για τη νορμοξία (NU) και την υποξία (HU) έχουν ίδια ένταση σήματος ενώ στη διαδρομή για την υποξία παρουσία του αναστολέα (PTU) παρατηρείται ότι το σήμα που λαμβάνεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για τη β-ακτίνη είναι ασθενέστερο, συγκρίνοντάς το με τις άλλες συνθήκες. Τα αποτελέσματα σχετικά με την κυτταρική σειρά T98G δείχνουν ότι σε όλες τις διαδρομές ανιχνεύεται σήμα ίδιας έντασης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για τη β-ακτίνη, που υποδηλώνει ισοφόρτωση των δειγμάτων.



Εικόνα 12: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του ΗΙΓ-2α στις συνθήκες υποζίας, όπου και εκφράζεται, με δεύτερη επώαση του τμήματος της μεμβράνης που περιέχει τα μοριακά βάρη 34-72 kDa με αντίσωμα έναντι της ιδιοσύστατα εκφραζόμενης β-ακτίνης. Το κόκκινο βέλος προσδιορίζει το μοριακό βάρος (43 kDa) στο οποίο εμφανίζεται η ειδική σύνδεση του αντισώματος σε όλες τις συνθήκες.

4.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΣΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του ειδικού αναστολέα PT2385 στη μεταγραφική δράση του HIF-2α στα νευρικά κύτταρα U87MG και T98G πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI-1, ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-2 μετά από απομόνωση του δείγματος RNA σε συνθήκες νορμοξίας, υποξίας και υποξίας παρουσία του αναστολέα PT2385.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης όσον αφορά την κυτταρική σειρά U87MG για το γονίδιο-στόχος PAI-1 του HIF-2α δείχνουν ότι σε συνθήκες υποξίας παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου PAI-1 από τον HIF-2α περίπου 2 φορές. Στη συνθήκη της υποξίας παρουσία του αναστολέα διαπιστώνεται μείωση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου PAI-1 που επάγονται από τον HIF-2α, τα οποία φαίνεται να τείνουν στα αντίστοιχα της νορμοξίας.



■Normoxia ■Hypoxia ■Hypoxia + PT2385

Διάγραμμα 3: Σύγκριση της επαγόμενης από τη δράση του HIF-2α μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου-στόχου PAI-1 στις συνθήκες (νορμοζία, υποζία και υποζία παρουσία του αναστολές PT2385) στην κυτταρική σειρά U87MG. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση το ιδιοσύστατο γονίδιο 18S. Τα σχετικά αποτελέσματα έχουν προκύψει

Τα αποτελέσματα (όσον αφορά την κυτταρική σειρά T98G για το γονίδιο-στόχος PAI-1) του HIF-2α φανερώνουν ότι σε συνθήκες νορμοξίας παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Σε συνθήκες υποξίας, επάγεται η έκφραση του γονιδίου PAI-1 από τον HIF-2α περίπου κατά 10 φορές σε σχέση με τη συνθήκη της νορμοξίας. Ενώ στη συνθήκη της υποξίας παρουσία του αναστολέα αναστέλλεται η επαγωγή του mRNA, υποδηλώνοντας τη δράση του αναστολέα (Διάγραμμα 4).



■Normoxia ■Hypoxia ■Hypoxia + PT2385

Διάγραμμα 4: Σύγκριση της επαγόμενης από τη δράση του HIF-2α μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου-στόχου PAI-1 σε τρεις (3) διαφορετικές συνθήκες (νορμοζία, υποζία και υποζία παρουσία του αναστολές PT2385) στην κυτταρική σειρά T98G. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση το ιδιοσύστατο γονίδιο 18S. Τα σχετικά αποτελέσματα έχουν προκύψει από δύο (2) βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη.

4.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ HIF-2α.

Για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό των τμημάτων του HIF-2α από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα BL21-RIL εκτελέστηκε μια σειρά βημάτων που συνιστούν τη διαδικασία του καθαρισμού, η οποία έχει σχεδιαστεί με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνικών τμημάτων. Από όλα τα στάδια του καθαρισμού κρατήθηκαν δείγματα, τα οποία αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE και μετέπειτα χρώση της γέλης με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250.

Από την διαδικασία του καθαρισμού παρατηρείται ότι στα εκλούσματα παραλαμβάνονται τα διάφορα τμήματα του HIF-2α στα αναμενόμενα μοριακά βάρη, αλλά δε χαρακτηρίζονται από τον ίδιο βαθμό καθαρότητας. Όσον αφορά τον πλήρες μεγέθους HIF-2α (full length) διαπιστώνεται ότι η απομόνωσή του συνοδεύεται από έντονη πρωτεόλυση. Ωστόσο στα υπόλοιπα τμήματα το φαινόμενο αυτό φαίνεται να περιορίζεται και ιδιαίτερα στο τμήμα HIF-2α 1-560, το οποίο φαίνεται να εκλούεται σταθερό.



Εικόνα 13: Οπτικοποίηση της υπερέκφρασης και της απομόνωσης των ανασυνδυασμένων επικρατειών GST-HIF-2α FL, GST-HIF-2α 1-560, GST-HIF-2α 366-679 και GST-HIF-2α 542-870 από βακτηριακά κύτταρα BL21-RIL με ανάλυση των δειγμάτων του εκάστοτε σταδίου του καθαρισμού με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) SDS-PAGE και χρώση της γέλης με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Με κόκκινα βέλη τονίζεται το αναμενόμενο μοριακό βάρος κάθε τμήματος, στο οποίο η παρουσία σήματος υποδεικνύει την ύπαρζη του τμήματος στο συγκεκριμένο στάδιο του καθαρισμού. Με κόκκινο πλαίσιο τονίζονται τα εκλούσματα στους δύο (2) όγκους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly 20/05/2024 15:27:34 EEST - 18.119.248.159

4.3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ GST-HIF-2α FL, GST-HIF-2α 1-560, GST-HIF-2α 366-679 KAI GST-HIF-2α 542-870

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα χιμαιρικά τμήματα που απομονώθηκαν αποτελούν τμήματα του HIF-2α διενεργήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του HIF-2α, το οποίο έχει σχεδιαστεί ώστε να στοχεύει την καρβοζυτελική του επικράτεια και πιο ειδικά τα κατάλοιπα που εντοπίζονται γύρω από την αλανίνη 758.

Τα αποτελέσματα (Εικόνα 14) δείχνουν ότι στη πρώτη διαδρομή για τον πλήρες HIF-2α δε λαμβάνεται κάποιο σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος του HIF-2α, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως δεν πραγματοποιήθηκε απομόνωση. Στην επόμενη διαδρομή που αφορά την επανάληψη του πλήρους μεγέθους HIF-2α ανιχνεύεται ένα πλήθος σημάτων. Ανάμεσα σε αυτά εμφανίζεται και το ειδικό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (124 kDa) για τον πλήρες HIF-2α. Επίσης στα μεγαλύτερα μοριακά βάρη παρατηρούνται μη ειδικές συνδέσεις του αντισώματος με επιτόπους, ενώ στα μικρότερα μοριακά βάρη διακρίνονται σήματα που αντιστοιχούν σε πρωτεολυμένα τμήματα GST-HIF-2α. Στη διαδρομή για το τμήμα 1-560 ανιχνεύεται ένα ασθενές σήμα μακριά από το αναμενόμενο μοριακό βάρος (90 kDa) για το συγκεκριμένο τμήμα. Η απουσία ειδικού σήματος στο συγκεκριμένο τμήμα πιθανόν να οφείλεται στην απουσία αμινοξέων που εντοπίζονται στη γύρω περιογή στόγευσης του αντισώματος. Στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 παρατηρείται ασθενές σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (62 kDa), καθώς περιέχει ορισμένα αμινοξέα κοντά στην περιοχή στόχευσης. Στη διαδρομή για το τμήμα 542-870 διακρίνεται ένα έντονο σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (64 kDa) για το συγκεκριμένο τμήμα, καθώς περίπου κατά το ήμισυ απαρτίζει την περιοχή στόχευσης του αντισώματος. Επιπλέον παρατηρείται ότι αυτό συνοδεύεται και από σήματα μικρότερου μοριακού βάρους, τα οποία υποδεικνύουν την πρωτεόλυση του τμήματος.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της GST. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 14) δείχνουν ότι ανιχνεύεται στη διαδρομή GST ένα σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (28 kDa). Μια ανάλογη παρατήρηση γίνεται και στη διαδρομή 1-560, δηλαδή ανιχνεύεται ένα μοναδικό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (αντίκτυπο και του βαθμού καθαρότητας του δείγματος). Ενώ στις διαδρομές του πλήρους μεγέθους HIF-2α και των τμημάτων 366-679 και 542-870 πέρα από τα σήματα στα αντίστοιχα αναμενόμενα μοριακά βάρη ανιχνεύονται και άλλα σήματα σε μικρότερα μοριακά βάρη που υποδεικνύουν την πρωτεόλυση των τμημάτων. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του καθαρισμού των τμημάτων θα μπορούσε να σημειωθεί ότι τα τμήματα στην παρούσα μεμβράνη ακολουθούν το ίδιο μοτίβο που διαμορφώνεται στη γέλη καθαρισμού του εκάστοτε τμήματος.

Με το συνδυασμό των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι έγινε επιτυχής απομόνωση και καθαρισμός των υπερεκφρασμένων τμημάτων του HIF-2α με επίτοπο GST



Αντίσωμα HIF-2a(rabbit)

Αντίσωμα GST(mouse)

Εικόνα 14: Ταυτοποίηση της απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με ανάλυση τους με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του HIF-2α και της GST. Τα κόκκινα βέλη αντικατοπτρίζουν την ειδική σύνδεση του αντισώματος σε κάθε τμήμα του HIF-2α.

4.3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ HIF-2a ME GST

Στην συνέχεια για τη μελέτη της in vitro συγκατακρήμνισης των υπερεκφρασμένων GST-HIF-2α τμημάτων με την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10 από κύτταρα HeLa πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω του Imager/UVband των χιμαιρικών πεπτιδίων, τα οποία έχουν αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση και οπτικοποιηθεί πάνω στη γέλη ύστερα από κατεργασία με τη χρωστική Coomassie. Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης στη γέλη δείχνουν ότι σε όλες τις διαδρομές για τα τμήματα του HIF-2α διαμορφώνεται το ίδιο μοτίβο σημάτων με την ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του αντισώματος της GST. Ενώ στη διαδρομή για τη GST λαμβάνεται ένα μοναδικό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος. Αλλά στην προκειμένη περίπτωση η εμφάνιση των σημάτων στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της γρωστικής με τα πρωτεϊνικά συστατικά είτε μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με προτονιωμένα βασικά αμινοξέα (λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη) είτε μέσω υδροφοβικών συνδέσεων με αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη). Το σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για κάθε τμήμα του HIF-2α αξιοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ποσοτήτων χρησιμοποιώντας ως αναφορά το σήμα της GST.

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της γέλης με τα αντίστοιχα του πίνακα διαπιστώνεται ότι αν και το ειδικό σήμα στη διαδρομή για το τμήμα 1-560 του HIF-2α είναι το πιο ασθενές από τα υπόλοιπα, το συγκεκριμένο τμήμα είναι αυτό που απομονώθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα. Ενώ στις διαδρομές για τα τμήματα full length και 366-679 του HIF-2α που εμφανίζεται έντονο ειδικό σήμα, αυτά συνοδεύτηκαν από μικρότερη ποσότητα. Επίσης το τμήμα 542-870 του HIF-2α είχε τη δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρά την έντονη πρωτεόλυσή του.



Εικόνα 15: Ποσοτικοποίηση των υπερεκφρασμένων τμημάτων του HIF-2α και της πρωτεΐνης αναφοράς GST μετα από ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) και με χρώση της γέλης με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν το ειδικό σήμα σε κάθε τμήμα του HIF-2α και στη GST βάση του οποίου συντελείται η ποσοτικοποίηση.

4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΘΕΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙΓ-2α ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

Για να ταυτοποιηθεί η πιθανή θέση αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον HIF-2α και την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10, τα δείγματα της συγκατακρήμνισης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και στη συνέχεια διενεργήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ATAXIN-10. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 16) δείχνουν πως στη διαδρομή για το συνολικό ευκαρυωτικό εκχύλισμα των κυττάρων HeLa (INPUT), ανιχνεύεται ένα μοναδικό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (46 kDa) για την ATAXIN-10. Στη διαδρομή για τη GST, η οποία χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς (control) δεν παρατηρήθηκε κάποιο σήμα το σποίο είναι αναμενόμενο. Στη διαδρομή για το τμήμα 1-560 του HIF-2α, επίσης, δεν παρατηρείται κάποιο σήμα. Στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 του HIF-2α ανιχνεύεται ένα πολύ έντονο σήμα μακριά όμως από το αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ATAXIN-10, άρα πιθανόν αποτελεί κάποια μη ειδική σύνδεση του αντισώματος.
Στη διαδρομή του τμήματος 542-870 του HIF-2α ανιχνεύεται ένα ασθενές σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ATAXIN-10, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή θέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με το συγκεκριμένο τμήμα. Ωστόσο δεν παρατηρείται κάποιο σήμα στη διαδρομή του πλήρους μεγέθους HIF-2α (HIF-2α full length). Συνεπώς τα αποτελέσματά μας δεν μας επιτρέπουν να επιβεβαιωθεί η άμεση αλληλεπίδραση HIF-2α/ATAXIN-10.



Εικόνα 16: Μελέτη της ταυτοποίηση της πιθανής αλληλεπίδρασης του HIF-2α και την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10 μετά από ανάλυση των δειγμάτων συγκατακρήμνισης με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ATAXIN-10. Το κόκκινο βέλος στη διαδρομή input δείχνει το σήμα που αντιστοιχεί στην ATAXIN-10, ενώ το αντίστοιχο στη διαδρομή 542-870 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση του τμήματος με την πρωτεΐνη ATAXIN-10.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το έντονο μη ειδικό σήμα μπορεί να επηρεάζει την εμφάνιση άλλων σημάτων στη μεμβράνη ακολούθησε αποκοπή της μεμβράνης στη ζώνη των 72 kDa και επανάληψη της επώασης με το ίδιο αντίσωμα έναντι της ATAXIN-10. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 17) δείχνουν ότι στη διαδρομή input λαμβάνεται ένα μοναδικό σήμα, πιο έντονο αυτή τη φορά, στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ATAXIN-10. Στις διαδρομές για τη GST, το τμήμα 1-560 του HIF-2α και στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 του HIF-2α δεν λαμβάνεται κάποιο σήμα που να αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της ATAXIN-10Στη διαδρομή για το τμήμα 542-870 λαμβάνεται ένα πλήθος σημάτων στα οποία εμφανίζεται και ένα σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ATAXIN-10, το οποίο ωστόσο δεν ανιχνεύεται στη διαδρομή για τον πλήρες HIF-2α.



Εικόνα 17: Επανάληψη ελέγχου ταυτοποίησης της πιθανής θέσης αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10, ύστερα από την αποκοπή της μεμβράνης από τη ζώνη των 72 kDa και πάνω που περιέχει το έντονο μη ειδικό σήμα, με επανάληψη της επώασης της μεμβράνης με το ίδιο αντίσωμα έναντι της ATAXIN-10.

Υποθέτοντας ότι το μη ειδικό σήμα που λαμβάνουμε σχετίζεται με τη χρήση του ATAXIN-10 επαναλάβαμε πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ΑΤΑΧΙΝ-10. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 18) δείχνουν ότι στη διαδρομή input εμφανίζεται ένα αγνό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ΑΤΑΧΙΝ-10. Στη διαδρομή για τη GST δεν παρατηρείται κάποιο σήμα, όπως αναμενόταν. Στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 του HIF-2α παρατηρείται ξανά το μη ειδικό σήμα σχεδόν στο ίδιο μοριακό βάρος με τις προηγούμενες προσεγγίσεις. Στη διαδρομή για το τμήμα 542-870 του HIF-2α επαληθεύεται η ανίχνευση του σήματος στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ΑΤΑΧΙΝ-10 και ταυτόγρονα παρατηρείται ένα έντονο πλήθος σημάτων, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στο αντίσωμα. Όσον αφορά τη διαδρομή για τον πλήρους μεγέθους HIF-2α ανιχνεύεται ένα ασθενές σήμα λίγο πιο πάνω από το αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ΑΤΑΧΙΝ-10, το οποίο βέβαια συνοδεύεται και από άλλα μη ειδικά σήματα.. Έτσι, φαίνεται μια πιθανή θέση αλληλεπίδρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης ΑΤΑΧΙΝ-10 με το τμήμα 542-870 του HIF- 2α

Από τα δεδομένα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας τέθηκε το ερώτημα μήπως η ποσότητα των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαμηλή με αποτέλεσμα το σήμα της αλληλεπίδρασης ATAXIN-10 και HIF-2α να είναι ασθενές. Για το λόγο αυτό κατά τη διαδικασία της συγκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος αριθμός πιάτων καλλιεργημένων κυττάρων HeLa προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητας της πρωτεΐνης ATAXIN-10. Ωστόσο παρόλο που αυξήθηκε η ποσότητα τα νέα αποτελέσματα ήταν παρόμοια χωρίς νέα πληροφορία σχετικά με την πιθανή θέση αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10.



Εικόνα 18: Έλεγχος ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον ΗΙF-2α με την ενδογενή ΑΤΑΧΙΝ-10 μετά από ανάλυση των δειγμάτων συγκατακρήμνισης με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ΑΤΑΧΙΝ-10. Το κόκκινο βέλος στη διαδρομή για το input δείχνει το σήμα που αντιστοιχεί στην ΑΤΑΧΙΝ-10, ενώ το αντίστοιχο στη διαδρομή 542-870 υποδηλώνει την πιθανή θέση αλληλεπίδρασης του τμήματος με την πρωτεΐνη ΑΤΑΧΙΝ-10.

4.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

Προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο της χαμηλής έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης ATAXIN-10 στα κύτταρα HeLa ακολούθησε μελέτη της αλληλεπίδρασης μετά από υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης flag-ATAXIN-10 σε κύτταρα HeLa.

Για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη flag-ATAXIN-10, κύτταρα Hela διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει την flag-ATAXIN-10. Πραγματοποιήθηκε πείραμα συγκατακρήμνισης με τα χιμαιρικά τμήματα του HIF-2α και τα εκλούσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ATAXIN-10. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 19) δείχνουν ότι στη διαδρομή που περιέχει το συνολικό ευκαρυωτικό εκχύλισμα ανιχνεύονται δύο σήματα στα αναμενόμενα μοριακά βάρη για την ενδογενή και την υπερεκφρασμένη ΑΤΑΧΙΝ-10. Να σημειωθεί ότι η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη flag-ATAXIN-10 εντοπίζεται σε ελαφρώς μεγαλύτερο μοριακό βάρος εξαιτίας του επιτόπου flag. Στη διαδρομή για τη GST δεν παρατηρείται κάποιο σήμα για το τμήμα 1-560 ανιχνεύεται πολύ ασθενές σήμα στα αναμενόμενα μοριακά βάρη για τις δύο (2) μορφές της πρωτεΐνης παρόλα αυτά πιθανόν αντιστοιχούν σε κάποια μη ειδική σύνδεση ιδιαίτερα αυτό της ενδογενούς πρωτεΐνης ΑTAXIN-10, καθώς δεν παρατηρήθηκε στις προηγούμενες περιπτώσεις.

Στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 του HIF-2α διακρίνεται και πάλι το έντονο μη ειδικό σήμα στο ίδιο μοριακό βάρος με τις προγενέστερες αναλύσεις. Όμως το σημαντικό στα νέα αποτελέσματα είναι ότι ανιχνεύονται σήματα στα αναμενόμενα μοριακά βάρη και για τις δύο μορφές της πρωτεΐνης ATAXIN-10, τα οποία υποδεικνύουν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση και με τον πλήρες HIF-2α και με το τμήμα του 542-870 του HIF-2α.

Όμως το σημαντικό στα νέα αποτελέσματα είναι ότι στη μεμβράνη ανιχνεύονται σήματα στα αναμενόμενα μοριακά βάρη και για τις δύο (2) μορφές της πρωτεΐνης ATAXIN-10, τα οποία υποδεικνύουν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση και με το τμήμα του Full Length του HIF-2α και με το τμήμα του 542-870 του HIF-2α.



Αντίσωμα Ataxin-10(rabbit)

Εικόνα 19: Μελέτη της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την υπερεκφρασμένη ATAXIN-10 μετά από ανάλυση των εκλουσμάτων από την συγκατακρήμνιση με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (πυκνότητας 10%) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ATAXIN-10. Τα κόκκινα βέλη στη διαδρομή για το input δείχνουν τα σήματα, τα οποία αντιστοιχούν στις δύο (2) μορφές της πρωτεΐνης ATAXIN-10, ενώ τα αντίστοιχα στις διαδρομές με τα τμήματα του HIF-2α υποδηλώνει την αλληλεπίδραση του τμήματος με τις δύο (2) μορφές της πρωτεΐνης ATAXIN-10. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συγκατακρήμνιση των χιμαιρικών τμημάτων του HIF-2α πραγματοποιήθηκε επώαση της ίδιας μεμβράνης με τη χρήση αντισώματος έναντι της GST. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 20) δείχνουν ότι στη διαδρομή input ανιχνεύονται δύο σήματα που οφείλεται στην προηγούμενη επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα έναντι της ATAXIN-10. Στη διαδρομή για τη GST λαμβάνεται ένα μοναδικό σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για τη GST. Στη διαδρομή για το Full Length του HIF-2α εμφανίζεται ένα σήμα στα 130 kDa που αντιστοιχεί στον HIF-2α. Επίσης στη διαδρομή για το τμήμα 366-679 του HIF-2α όπως και σε αυτές για το τμήμα 1-560 του HIF-2α και για το τμήμα 542-870 του HIF-2α ανιχνεύεται σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος. Επιπρόσθετα παρατηρείται σε όλες τις διαδρομές κάτω από το ειδικό σήμα, συνδυασμός μη ειδικών σημάτων πρωτεόλυσης.



Αντίσωμα GST(rabbit)



Το σύνολο των πειραμάτων συγκλίνουν στο γεγονός ότι η υπερεκφρασμένη ATAXIN-10 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον πλήρες HIF-2α και το τμήμα 542-870 του HIF-2α.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιβίωση των αερόβιων οργανισμών βασίζεται στη διαρκή και όσο πιο σταθερή παρογή οξυγόνου (Ο2 σε κάθε κύτταρο των ιστών του οργανισμού με σκοπό τη συντονισμένη δράση των κυτταρικών λειτουργιών για την κάλυψη των μεταβολικών τους απαιτήσεων. Απλές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) και πρωτεϊνών απαιτούν την παρουσία ATP, η οποία παράγεται κυρίως μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που συντελείται στα μιτοχόνδρια. Κατά γενική ομολογία προκύπτει ότι η ζωή είναι μια διαδικασία που απαιτεί υψηλά ενεργειακά κόστη. Σε μεγάλο βαθμό αυτά ικανοποιούνται από την παρουσία του μοριακού οξυγόνου. Όμως το σύστημα μεταφοράς του οξυγόνου (Ο2) εξαιτίας της σύνδεσης του με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες κατά την εξέλιξη των οργανισμών διαταράσσεται εύκολα με συνεπακόλουθο τα κύτταρα να έρχονται αντιμέτωπα με καταστάσεις περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας Ο2, γνωστό ως το φαινόμενο της υποξίας, η οποία εμφανίζεται σε εύρος από 0.1-1% Ο2. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το φαινόμενο της υποξία είναι συνυφασμένο με λειτουργικές αλλαγές των κυττάρων, γαρακτηριστικό το οποίο δικαιολογεί και την κυριαρχία της υποξίας σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο σχηματισμός συμπαγών όγκων. Σε απόκριση στις συγκεκριμένες συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιούν μηγανισμούς, οι οποίοι στογεύουν στην αυξορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται σε διαδικασίες υπεύθυνες για τον επαναπρογραμματισμό της κυτταρικής λειτουργίας με στόχο τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού. Αυτό το συγκεκριμένο μοτίβο αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνει τόσο γονίδια που εκφράζονται σε όλους τους ιστούς όσο και γονίδια που εκφράζονται ιστοειδικά και στις δύο περιπτώσεις συντονίζεται μέσω της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF. Η δράση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να ελέγχεται από ένα μηγανισμό αίσθησης του οξυγόνου και να πυροδοτείται από σηματοδοτικούς καταρράκτες. Επίσης είναι ευρέως αποδεκτό ότι στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου κυρίαργες είναι υποξικές περιογές, οι οποίες διαμορφώνονται από τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σχηματισμός νέων αγγειακών δομών, οι οποίες προκαλούν την άνιση σχέση ανάμεσα στη διαθεσιμότητα και την κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου. Όλα τα παραπάνω προκαλούν την ενεργοποίηση ενός προσαρμοστικού μηγανισμού όπου κύριοι ρυθμιστές του είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF.

Οι ΗΙΓ ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι όταν σταθεροποιηθούν δρουν ως ετεροδιμερή σύμπλοκα των οποίων η δομή ακολουθεί τη βασική διαμόρφωση έλικας-βρόχου-έλικας με χαρακτηριστικά μοτίβα. Ο ΗΙΓ-2 αποτελεί την μεγαλύτερη και λιγότερο μελετημένη ισομορφή στην οικογένεια των ΗΙΓ λόγω της ιστοειδικής του έκφρασης, η οποία περιορίζεται στους νεφρούς, του πνεύμονες, το ήπαρ, το ενδοθήλιο και τον εγκέφαλο. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (O₂), η ΗΙΓ-2α υπομονάδα σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας μετά το σχηματισμό ενεργού μεταγραφικά ετεροδιμερούς με την σταθερά εκφραζόμενη β-υπομονάδα (ΗΙΓ-β ή ARNT).

Η σταθερότητα και η μεταγραφική δράση του HIF-2α ρυθμίζονται και από ανεξάρτητες του οξυγόνου τροποποιήσεις. Σημαντικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς έχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεϊνικούς εταίρους. Επιπλέον, ο HIF-2 αποτελεί αντικείμενο σχεδιασμού θεραπευτικών στρατηγικών κατά κύριο λόγο μέσω της ανάπτυξης εξειδικευμένων αναστολέων της δράσης του, όπως παρατηρείται στο νεφρικό καρκίνωμα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης και της μεταγραφικής δράσης της υπομονάδας HIF-2α παρουσία του ειδικού αναστολέα PT2385 στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG και T98G, όπου η πρωτεΐνη ATAXIN-10 εκφράζεται ισχυρά καθώς και η διερεύνηση της νέας πιθανής θέσης αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 σε κύτταρα HeLa, *in vitro*.

5.1 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΗΙΓ-2Α ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΡΤ2385 ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ U87MG KAI T98G

Για τη μελέτη του στόχου αυτού ακολούθησε η καλλιέργεια των κυττάρων γλοιοβλαστώματος T98G, U87MG παρουσία ορού και απουσία ορού (-FBS) τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας αλλά και απουσία ή παρουσία του ειδικού αναστολέα του HIF-2α, PT2385.

Τα σχετικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες υποξίας (1%) τα κύτταρα T98G και U87MG επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης της HIF-2α υπομονάδας. Επιπλέον ο ειδικός αναστολέας PT2385 δε φαίνεται να μεταβάλλει σημαντικά έως καθόλου την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις βιβλιογραφικές αναφορές περί του τρόπου στόχευσης του στον HIF-2α.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α απουσία ή παρουσία του αναστολέα PT2385 σε συνθήκες υποξίας όσον αφορά το γονίδιο-στόχο του HIF-2α τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), τα αποτελέσματα της μελέτης με RT-PCR έδειξαν όσον αφορά την κυτταρική σειρά T98G σε συνθήκες υποξίας ότι τα επίπεδα των mRNA του γονιδίου-στόχου PAI-1 αυξήθηκαν περίπου 10 φορές σε σύγκριση με τη νορμοξία, όπου ο HIF-2α φυσιολογικά αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Ενώ κατά την υποξία συνοδευόμενη από τη δράση του αναστολέα PT2385 διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των mRNA του γονιδίου-στόχου PAI-1 αυξήθηκαν περίπου 10 φορές σε σύγκριση με τη νορμοξία, όπου ο HIF-2α φυσιολογικά αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Ενώ κατά την υποξία συνοδευόμενη από τη δράση του αναστολέα PT2385 διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των mRNA του γονιδίου PAI-1 ελαττώθηκαν σχεδόν κατά το ήμισυ. Στην κυτταρική σειρά U87MG Ta αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια μοτίβα μεταβολής, αλλά σε μικρότερο βαθμό όσον αφορά την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου PAI-1 στην υποξία από τον HIF-2α. ενώ ο συνδυασμός της υποξίας παρουσία του αναστολέα PT2385 προκάλεσε την κατά το ήμισυ μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1, όπως στην κυτταρική σειρά T98G, γεγονός που αποκαλύπτει τον ίδιο βαθμό δράσης και στις δύο (2) κυτταρικές σειρές.

Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι ο ειδικός αναστολέας PT2385 αναστέλλει σημαντικά την μεταγραφική ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων-στόχων του HIF-2α, και ο μηχανισμός αυτός αναστολής προκαλεί και στις δυο κυτταρικές σειρές την μείωση της δραστικότητας του HIF-2α με σταθερό μοτίβο ελάττωσης κατά το ήμισυ.

Επίσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με το αντιδραστήριο WST-1 σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε συνθήκες υποξίας (0,1-1%) σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0h. 24h και 48h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά την εφαρμογή των φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου διακρίνεται μια σταθερή αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού ανάμεσα στα τρία χρονικά διαστήματα και στους τρεις (3) κυτταρικούς πληθυσμούς. Μάλιστα όσον αφορά την κυτταρική σειρά U87MG αυτή η σταδιακή αύξηση φαίνεται να είναι πιο ισχυρή. Τα αποτελέσματα σχετικά με την επώαση σε υποξικές συνθήκες έδειξαν ότι η πολλαπλασιαστική ικανότητα είναι ανυψωμένη τις πρώτες 24 ώρες σε σχέση με τη νορμοξία, χρονικό διάστημα στο οποίο οι κυτταρικοί πληθυσμού πλησιάζουν το μέγιστο αριθμό τους. Έπειτα φαίνεται να αντιστρέφεται αυτό το φαινόμενο και να σημειώνεται πτώση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στους τρεις (3) κυτταρικού

5.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΘΕΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΙF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΤΑΧΙΝ-10

Για τη διερεύνηση της νέας πιθανής θέσης αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 δημιουργήθηκαν συγκεκριμένα τμήματα του HIF-2α που φέρουν τουλάχιστον μια λειτουργική επικράτεια, έτσι ώστε η σύνδεση τους να προσφέρει στοιχεία σχετικά με τις επιδράσεις της αλληλεπίδρασης στη σταθερότητα ή στη μεταγραφική δράση του HIF-2α.

Κατά συνέπεια, τα τμήματα που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν ήταν ο πλήρης HIF-2α, το αμινοτελικό τμήμα 1-560 του HIF-2α, το ενδιάμεσο τμήμα 366-679 του HIF-2α και το καρβοξυτελικό τμήμα 542-870 του HIF-2α. Το πρώτο βήμα αφορούσε την υπερέκφραση των τμημάτων και την επακόλουθη απομόνωση τους από βακτηριακά κύτταρα BL21-RIL. Κατά την οπτικοποίηση της διαδικασίας προέκυψε ότι τόσο στα ενδιάμεσα στάδια όσο και στα τελικά εκλούσματα λαμβάνονταν σήματα στα αναμενόμενα μοριακά βάρη ενδεικτικά της παρουσίας των τμημάτων. Το πιο καθαρό απομονωμένο τμήμα είναι το 1-560, το οποίο φέρει μικρή περιοχή της καρβοξυτελικής επικράτειας ενώ τα άλλα δύο τμήματα συνοδεύονται και από στοιχεία πρωτεόλυσης σε άλλα μοριακά βάρη, τα οποία μειώνουν το βαθμό καθαρότητάς τους. Επίσης τα απομονωμένα τμήματα ελέγχθηκαν με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι του HIF-2 και της GST και επιβεβαιώθηκε ότι η απομόνωση των χιμαιρικών τμημάτων του HIF-2α πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.

Στη συνέχεια, έχοντας στη διάθεση μας τα απομονωμένα χιμαιρικά πεπτίδια του HIF-2α, παράλληλα καλλιεργήθηκαν κύτταρα HeLa και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες τους ώστε να μελετηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση του HIF-2α με την ενδογενή πρωτεΐνη ATAXIN-10. Το πρώτο πείραμα της ανάλυσης των εκλουσμάτων συγκατακρήμνισης έδειξε μια πιθανή αλληλεπίδραση με το καρβοξυτελικό τμήμα 542-870 του HIF-2α. Ωστόσο, λόγω του ότι στη διαδρομή με τον πλήρες HIF-2α, που αποτελεί και το θετικό μας σήμα ελέγχου, δεν παρατηρήθηκε σήμα αλληλεπίδρασης, μας που οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης πως είτε υπήρξε τεχνικό λάθος είτε πιθανώς η έκφραση της ATAXIN-10 να είναι χαμηλή και πιθανόν γι 'αυτό άλλοτε να παρατηρείται η αλληλεπίδραση και άλλοτε όχι.

Ετσι στο δεύτερο πείραμα αυξήσαμε τον αριθμό των αναπτυσσόμενων κυττάρων HeLa που χρησιμοποιήθηκε, πιο συγκεκριμένα αυξήθηκε ο αριθμός των πιάτων καλλιέργειας ανά πείραμα. Τα αποτελέσματα της δεύτερης προσέγγισης έδειξε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με το πρώτο με μόνη διαφορά την αύξηση της έντασης του σήματος στο αναμενόμενο μοριακό βάρος στη διαδρομή για το τμήμα 542-870 του HIF-2α, χωρίς όμως να επαληθεύεται από αντίστοιχο σήμα στο πλήρες τμήμα του HIF-2α. Η επόμενη προσέγγιση ήταν η αλληλεπίδραση με τον HIF-2α να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας υπερέκφραση της πρωτεΐνης ATAXIN-10 στα κύτταρα Hela. Τα αποτελέσματα αυτής έδειξαν θετικό αποτέλεσμα στην αλληλεπίδραση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης HIF-2α και του καρβοζυτελικού τμήματος 542-870 με την πρωτεΐνη ATAXIN-10. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με επώαση της ίδιας μεμβράνης με το αντίσωμα έναντι της GST. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όντως η αλληλεπίδραση πραγματοποιήθηκε με αυτά τα τμήματα.

Συνεπώς από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι παρατηρείται σήμα στο πλήρες τμήμα του HIF-2α και αντίστοιχο στο καρβοξυτελικό τμήμα 542-870 και όχι στο τμήμα 1-560 και 366-679 του HIF-2α, οπότε δια της ατόπου απαγωγής για πρώτη φορά δείχθηκε ότι η πιθανή θέση αλληλεπίδραση τους εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α και ιδιαίτερα στην περιοχή των αμινοξέων που εκτείνεται από το 679-870. Κατά συνέπεια η πιθανή θέση αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την πρωτεΐνη ATAXIN-10 θα έχει αντίκτυπο στη μεταγραφική δράση του HIF-2α, χωρίς να διακρίνεται το πρόσημο αυτής της επίδρασης. Η παρούσα διπλωματική προσφέρει νέα δεδομένα σχετικά με την πιθανή θέση της νέας αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την πρωτεΐνη ATAXIN-10.



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής θέσης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ΑΤΑΧΙΝ-10 με το καρβοζυτελικό άκρο και ιδιαίτερα το τμήμα 679-870 του ΗΙΓ-2α μέσω του σταδιακού αποκλεισμού βασιζόμενου στα αποτελέσματα συγκατακρήμνισης.

Η συγκεκριμένη συνοχή των πειραματικών αποτελεσμάτων διαμορφώνει την αλληλουγία των μελλοντικών πειραματικών σγεδιασμών. Στα πλαίσια του πρώτου στόχου θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί ο συσχετισμός της μεταγραφικής δράσης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και παρουσία του αναστολέα τόσο με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και με την επιβίωση των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος. Ακόμη, περαιτέρω διερεύνηση της δράσης του HIF-2α και σε άλλες γαρακτηριστικές λειτουργίες των κυττάρων νευροβλαστώματος, όπως η διατήρηση της βλαστικότητας. Όσον αφορά τη δράση του ειδικού αναστολέα PT2385 στη δράση του HIF-2α στη διατήρηση της βλαστικότητας μπορούν να πραγματοποιηθούν πειράματα σε μεγάλους χρόνους (>= 48 ώρες) και επίσης μπορεί να μελετηθεί και σε επίπεδο RNA χαρακτηριστικών γονιδίων. Όσον αφορά το δεύτερο στόχο, πιο συγκεκριμένα, η βελτιστοποίηση της διαδικασίας της συγκατακρήμνισης θα αποτελέσει τη βάση για την καλύτερη οπτικοποίηση της θέσης αλληλεπίδρασης, η οποία με τη σειρά της θα προσφέρει πληροφορίες σχετικά με το αντίκτυπο αυτής στη μεταγραφική δράση του HIF-2α. Επίσης μπορεί να μελετηθεί πως η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση επιδρά στις κυτταρικές λειτουργίες των κυτταρικών σειρών του γλοιοβλαστώματος, οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης ΑΤΑΧΙΝ-10. Επιπλέον είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν η αλληλεπίδραση στη συγκεκριμένη θέση επηρεάζει την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνικών εταίρων στον HIF-2α.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1. Sánchez-Baracaldo, P., & Cardona, T. (2020). On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *The New phytologist*, *225*(4), 1440–1446. https://doi.org/10.1111/nph.16249
- Choudhry, H., & Harris, A. L. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell metabolism*, 27(2), 281–298. <u>https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005</u>
- Zepeda, A. B., Pessoa, A., Jr, Castillo, R. L., Figueroa, C. A., Pulgar, V. M., & Farías, J. G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell biochemistry and function*, *31*(6), 451–459. <u>https://doi.org/10.1002/cbf.2985</u>
- Mendoza, S. V., Genetos, D. C., & Yellowley, C. E. (2023). Hypoxia-Inducible Factor-2α Signaling in the Skeletal System. *JBMR plus*, 7(4), e10733. <u>https://doi.org/10.1002/jbm4.10733</u>
- Bogdanova, A., Petrushanko, I. Y., Hernansanz-Agustín, P., & Martínez-Ruiz, A. (2016). "Oxygen Sensing" by Na,K-ATPase: These Miraculous Thiols. *Frontiers in physiology*, 7, 314. <u>https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00314</u>
- 6. Semenza G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, *148*(3), 399–408. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021</u>
- Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell death and differentiation*, 15(4), 628– 634. <u>https://doi.org/10.1038/cdd.2008.17</u>
- Mylonis, I., Simos, G., & Paraskeva, E. (2019). Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*, 8(3), 214. <u>https://doi.org/10.3390/cells8030214</u>
- Ruan, K., Song, G., & Ouyang, G. (2009). Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 107(6), 1053–1062. <u>https://doi.org/10.1002/jcb.22214</u>
- Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science* (*New York, N.Y.*), 352(6282), 175–180. <u>https://doi.org/10.1126/science.aaf4405</u>
- Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F., & Xu, B. (2015). The role of hypoxiainducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell death & disease*, 6(1), e1600. <u>https://doi.org/10.1038/cddis.2014.565</u>

- Gkotinakou, I. M., Befani, C., Simos, G., & Liakos, P. (2019). ERK1/2 phosphorylates HIF-2α and regulates its activity by controlling its CRM1dependent nuclear shuttling. *Journal of cell science*, *132*(7), jcs225698. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.225698</u>
- Wu, W., Hu, Z., Zhao, Q., Zhang, X., Zhang, H., Wang, H., Xue, W., Yu, L., & Duan, G. (2020). Down-Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1α and Downstream Glucose Transporter Protein-1 Gene by β-elemene Enhancing the Radiosensitivity of Lung Adenocarcinoma Transplanted Tumor. *OncoTargets* and therapy, 13, 11627–11635. <u>https://doi.org/10.2147/OTT.S275956</u>
- 14. Yeo E. J. (2019). Hypoxia and aging. *Experimental & molecular medicine*, 51(6), 1–15. <u>https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3</u>
- Webb, J. D., Coleman, M. L., & Pugh, C. W. (2009). Hypoxia, hypoxiainducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(22), 3539–3554. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-009-0147-7</u>
- Befani, C., & Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233(12), 9087–9098. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.26805</u>
- 17. Semenza G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews*. *Cancer*, *3*(10), 721–732. <u>https://doi.org/10.1038/nrc1187</u>
- Soni, S., & Padwad, Y. S. (2017). HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 56(4), 503–515. <u>https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1301680</u>
- 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. <u>https://doi.org/10.3390/ijms22115703</u>
- 20. 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. <u>https://doi.org/10.1038/emm.2004.1</u>
- 21. Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology*, 23(24), 9361–9374. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003</u>

- 22. Wiesener, M. S., Jürgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Hörstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H., & Eckardt, K. U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(2), 271–273. https://doi.org/10.1096/fj.02-0445fje
- 23. Luo, J. C., & Shibuya, M. (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene*, 20(12), 1435–1444. <u>https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204228</u>
- 24. Gu, X. X., Tang, Z. Z., He, Y. L., Zeng, Z. N., Shi, W. X., Qiao, Y. C., & Wei, Y. S. (2021). A Functional Polymorphism in HIF-3α Is Related to an Increased Risk of Ischemic Stroke. *Journal of molecular neuroscience :* MN, 71(5), 1061–1069. <u>https://doi.org/10.1007/s12031-020-01728-z</u>
- 25. Yang, S. L., Wu, C., Xiong, Z. F., & Fang, X. (2015). Progress on hypoxiainducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Molecular medicine reports*, 12(2), 2411–2416. <u>https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3689</u>
- 26. Duan C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *American journal of physiology. Cell physiology*, *310*(4), C260–C269. <u>https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015</u>
- 27. Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2011). Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(23), 3885–3901. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-011-0679-5</u>
- Kim, S. H., Hwang, D., Park, H., Yang, E. G., Chung, H. S., & Kim, S. Y. (2015). The action of HIF-3α variants on HIF-2α-HIF-1β heterodimer formation is directly probed in live cells. *Experimental cell research*, 336(2), 329–337. <u>https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.017</u>
- 29. Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P. J., & Duan, C. (2014). Hypoxiainducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell reports*, 6(6), 1110–1121. <u>https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.011</u>
- 30. Mandl, M., & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1β): is it a rare exception?. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 20(1), 215–220.

https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00032

- Rahman, M. S., & Thomas, P. (2019). Molecular cloning and characterization of two ARNT (ARNT-1 and ARNT-2) genes in Atlantic croaker and their expression during coexposure to hypoxia and PCB77. *Environmental toxicology*, 34(2), 160–171. <u>https://doi.org/10.1002/tox.22670</u>
- 32. Qing, G., & Simon, M. C. (2009). Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Current opinion in genetics & development*, 19(1), 60–66. <u>https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.12.001</u>
- 33. Chowdhury, R., McDonough, M. A., Mecinović, J., Loenarz, C., Flashman, E., Hewitson, K. S., Domene, C., & Schofield, C. J. (2009). Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases. *Structure (London, England : 1993)*, 17(7), 981–989. <u>https://doi.org/10.1016/j.str.2009.06.002</u>
- 34. 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. <u>https://doi.org/10.3390/ijms22010268</u>
- 35. Shen, C., & Kaelin, W. G., Jr (2013). The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Seminars in cancer biology*, 23(1), 18–25. <u>https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.001</u>
- 36. Linke, S., Stojkoski, C., Kewley, R. J., Booker, G. W., Whitelaw, M. L., & Peet, D. J. (2004). Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting hypoxia-inducible factor. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), 14391–14397. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M313614200</u>
- Nakayama, K., & Kataoka, N. (2019). Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3278. <u>https://doi.org/10.3390/ijms20133278</u>
- 38. Abe, H., Semba, H., & Takeda, N. (2017). The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 24(9), 884–894. <u>https://doi.org/10.5551/jat.RV17009</u>
- Takeda, N., O'Dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M. C., Hoffmann, A., & Johnson, R. S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF-{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes & development*, 24(5), 491–501. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1881410</u>

- 40. Moniz, S., Bandarra, D., Biddlestone, J., Campbell, K. J., Komander, D., Bremm, A., & Rocha, S. (2015). Cezanne regulates E2F1-dependent HIF2α expression. *Journal of cell science*, *128*(16), 3082–3093. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.168864</u>
- 41. Cui, J., Duan, B., Zhao, X., Chen, Y., Sun, S., Deng, W., Zhang, Y., Du, J., Chen, Y., & Gu, L. (2016). MBD3 mediates epigenetic regulation on EPAS1 promoter in cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society* for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 37(10), 13455–13467. <u>https://doi.org/10.1007/s13277-016-5237-1</u>
- Nakazawa, M. S., Eisinger-Mathason, T. S., Sadri, N., Ochocki, J. D., Gade, T. P., Amin, R. K., & Simon, M. C. (2016). Epigenetic re-expression of HIF-2α suppresses soft tissue sarcoma growth. *Nature communications*, 7, 10539. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms10539</u>
- 43. Biddlestone, J., Batie, M., Bandarra, D., Munoz, I., & Rocha, S. (2018). SINHCAF/FAM60A and SIN3A specifically repress HIF-2α expression. *The Biochemical journal*, 475(12), 2073–2090. https://doi.org/10.1042/BCJ20170945
- 44. Saint-Martin, A., Morquecho-León, M. A., Castañeda-Patlán, M. C., & Robles-Flores, M. (2022). Hypoxia-inducible factors, mTOR, and astrin constitute an integrative regulatory network in colon cancer cells. *Biochemistry and biophysics reports*, 32, 101336. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101336</u>
- 45. Yoon, H., Shin, S. H., Shin, D. H., Chun, Y. S., & Park, J. W. (2014). Differential roles of Sirt1 in HIF-1α and HIF-2α mediated hypoxic responses. *Biochemical and biophysical research communications*, 444(1), 36–43. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.001</u>
- 46. Chen, R., Xu, M., Hogg, R. T., Li, J., Little, B., Gerard, R. D., & Garcia, J. A. (2012). The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *The Journal of biological chemistry*, 287(36), 30800–30811. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244780</u>
- 47. Dioum, E. M., Chen, R., Alexander, M. S., Zhang, Q., Hogg, R. T., Gerard, R. D., & Garcia, J. A. (2009). Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5932), 1289–1293. <u>https://doi.org/10.1126/science.1169956</u>
- 48. Filippopoulou, C., Simos, G., & Chachami, G. (2020). The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells*, 9(11), 2359. <u>https://doi.org/10.3390/cells9112359</u>

- 49. van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S., & Vertegaal, A. C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic acids research*, 38(6), 1922–1931. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkp1157</u>
- 50. To, K. K., Sedelnikova, O. A., Samons, M., Bonner, W. M., & Huang, L. E. (2006). The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *The EMBO journal*, 25(20), 4784–4794. <u>https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601369</u>
- Pangou, E., Befani, C., Mylonis, I., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G., & Liakos, P. (2016). HIF-2α phosphorylation by CK1δ promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *Journal of cell science*, *129*(22), 4213–4226. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.191395</u>
- 52. 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. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.068122</u>
- 53. Kourti, M., Ikonomou, G., Giakoumakis, N. N., Rapsomaniki, M. A., Landegren, U., Siniossoglou, S., Lygerou, Z., Simos, G., & Mylonis, I. (2015). CK1δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1α/ARNT complex formation. *Cellular signalling*, 27(6), 1129–1140. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.017
- 54. Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y., & Sogawa, K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *The Journal of biological chemistry*, 277(26), 23508–23514. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M201307200</u>
- 55. Mottet, D., Ruys, S. P., Demazy, C., Raes, M., & Michiels, C. (2005). Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *International journal of cancer*, 117(5), 764–774. <u>https://doi.org/10.1002/ijc.21268</u>
- 56. Kietzmann, T., Mennerich, D., & Dimova, E. Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIF) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 11. <u>https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00011</u>
- 57. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxiainducible factor-1alpha by MAPK. *The Journal of biological chemistry*, 283(41), 27620–27627. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M803081200</u>

- 58. Pawlus, M. R., Wang, L., Ware, K., & Hu, C. J. (2012). Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2α (HIF2α) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Molecular and cellular biology*, 32(22), 4595–4610. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.00724-12</u>
- 59. Befani, C., Mylonis, I., Gkotinakou, I. M., Georgoulias, P., Hu, C. J., Simos, G., & Liakos, P. (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), 2359–2368. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.07.025
- 60. Aprelikova, O., Wood, M., Tackett, S., Chandramouli, G. V., & Barrett, J. C. (2006). Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer research*, 66(11), 5641–5647. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3345</u>
- 61. Müller, J. M., Cahill, M. A., Rupec, R. A., Baeuerle, P. A., & Nordheim, A. (1997). Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *European journal of biochemistry*, 244(1), 45–52. <u>https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00045.x</u>
- 62. Wang, V., Davis, D. A., Veeranna, R. P., Haque, M., & Yarchoan, R. (2010). Characterization of the activation of protein tyrosine phosphatase, receptortype, Z polypeptide 1 (PTPRZ1) by hypoxia inducible factor-2 alpha. *PloS* one, 5(3), e9641. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009641</u>
- 63. Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A., & Simon, M. C. (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*, 11(4), 335–347. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.006</u>
- 64. Mu, H., Yu, G., Li, H., Wang, M., Cui, Y., Zhang, T., Song, T., & Liu, C. (2021). Mild chronic hypoxia-induced HIF-2α interacts with c-MYC through competition with HIF-1α to induce hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 44(5), 1151–1166. https://doi.org/10.1007/s13402-021-00625-w
- 65. Koh, M. Y., Lemos, R., Jr, Liu, X., & Powis, G. (2011). The hypoxiaassociated factor switches cells from HIF-1α- to HIF-2α-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer research*, 71(11), 4015–4027. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4142</u>

- 66. Gkotinakou, I. M., Befani, C., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Liakos, P. (2021). Novel HIF-2α interaction with Reptin52 impairs HIF-2 transcriptional activity and EPO secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, 557, 143–150. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.176</u>
- 67. Mao, Y. Q., & Houry, W. A. (2017). The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. *Frontiers in molecular biosciences*, 4, 58. <u>https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00058</u>
- Guo, P., & Lam, S. L. (2020). Minidumbbell structures formed by ATTCT pentanucleotide repeats in spinocerebellar ataxia type 10. *Nucleic acids research*, 48(13), 7557–7568. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkaa495</u>
- 69. Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D. L., Rasmussen, A., Grewal, R. P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A. E., Davis, C. F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S. M., Alonso, E., Noebels, J. L., Nelson, D. L., Zoghbi, H. Y., & Ashizawa, T. (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature genetics*, *26*(2), 191–194. <u>https://doi.org/10.1038/79911</u>
- 70. Waragai, M., Nagamitsu, S., Xu, W., Li, Y. J., Lin, X., & Ashizawa, T. (2006). Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit. *Journal of neuroscience research*, 83(7), 1170–1178. <u>https://doi.org/10.1002/jnr.20807</u>
- 71. März, P., Probst, A., Lang, S., Schwager, M., Rose-John, S., Otten, U., & Ozbek, S. (2004). ATAXIN-10, the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein, is essential for survival of cerebellar neurons. *The Journal of biological chemistry*, 279(34), 35542–35550. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M405865200</u>
- 72. Li, J., Wang, J., Hou, W., Jing, Z., Tian, C., Han, Y., Liao, J., Dong, M. Q., & Xu, X. (2011). Phosphorylation of ATAXIN-10 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(17), 2946–2958. <u>https://doi.org/10.4161/cc.10.17.15922</u>
- 73. 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. <u>https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613370</u>
- 74. Xie, C., Gao, X., Sun, D., Zhang, Y., Krausz, K. W., Qin, X., & Gonzalez, F. J. (2018). Metabolic Profiling of the Novel Hypoxia-Inducible Factor 2α Inhibitor PT2385 In Vivo and In Vitro. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 46(4), 336–345. https://doi.org/10.1124/dmd.117.079723

- 75. Courtney, K. D., Infante, J. R., Lam, E. T., Figlin, R. A., Rini, B. I., Brugarolas, J., Zojwalla, N. J., Lowe, A. M., Wang, K., Wallace, E. M., Josey, J. A., & Choueiri, T. K. (2018). Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(9), 867–874. <u>https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.2627</u>
- 76. Persson, C. U., von Stedingk, K., Fredlund, E., Bexell, D., Påhlman, S., Wigerup, C., & Mohlin, S. (2020). ARNT-dependent HIF-2 transcriptional activity is not sufficient to regulate downstream target genes in neuroblastoma. *Experimental cell research*, 388(2), 111845. <u>https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111845</u>
- 77. Semenza G. L. (2012). Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends in molecular medicine*, 18(9), 534–543. <u>https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.08.001</u>
- Shi, R., Liao, C., & Zhang, Q. (2021). Hypoxia-Driven Effects in Cancer: Characterization, Mechanisms, and Therapeutic Implications. *Cells*, 10(3), 678. <u>https://doi.org/10.3390/cells10030678</u>
- 79. Semenza G. L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29(5), 625–634. <u>https://doi.org/10.1038/onc.2009.441</u>
- 80. Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F., & Xu, B. (2015). The role of hypoxiainducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell death & disease*, 6(1), e1600. <u>https://doi.org/10.1038/cddis.2014.565</u>
- 81. Zhu, H., Wang, X., Lu, S., & Ou, K. (2023). Metabolic reprogramming of clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1195500. <u>https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1195500</u>
- Chun, S. Y., Johnson, C., Washburn, J. G., Cruz-Correa, M. R., Dang, D. T., & Dang, L. H. (2010). Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1α and HIF-2α target genes. *Molecular cancer*, *9*, 293. <u>https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-293</u>
- 83. Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology*, 25(13), 5675–5686. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005</u>

- 84. Nusblat, L. M., Tanna, S., & Roth, C. M. (2020). Gene silencing of HIF-2α disrupts glioblastoma stem cell phenotype. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 3(2), 199–208. <u>https://doi.org/10.20517/cdr.2019.96</u>
- 85. Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., & Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *The Journal of biological chemistry*, 278(9), 7520–7530. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M211298200</u>
- 86. Li, F., Tiede, B., Massagué, J., & Kang, Y. (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell research*, 17(1), 3–14. <u>https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310118</u>
- 87. Wang, Y., Li, Z., Zhang, H., Jin, H., Sun, L., Dong, H., Xu, M., Zhao, P., Zhang, B., Wang, J., Pan, Y., & Liu, L. (2010). HIF-1α and HIF-2α correlate with migration and invasion in gastric cancer. *Cancer biology & therapy*, 10(4), 376–382. <u>https://doi.org/10.4161/cbt.10.4.12441</u>
- 88. Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D., & Rich, J. N. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & development*, 33(11-12), 591–609. <u>https://doi.org/10.1101/gad.324301.119</u>
- 89. Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y. H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauvé, C. G., Olar, A., Lan, Z. D., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer cell*, 32(1), 42–56.e6. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003</u>
- 90. Moreira Franco, Y. E., Alves, M. J., Uno, M., Moretti, I. F., Trombetta-Lima, M., de Siqueira Santos, S., Dos Santos, A. F., Arini, G. S., Baptista, M. S., Lerario, A. M., Oba-Shinjo, S. M., & Marie, S. K. N. (2021). Glutaminolysis dynamics during astrocytoma progression correlates with tumor aggressiveness. *Cancer & metabolism*, 9(1), 18. https://doi.org/10.1186/s40170-021-00255-8
- 91. Zhang, B., Chen, Y., Bao, L., & Luo, W. (2022). GPT2 Is Induced by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-2 and Promotes Glioblastoma Growth. *Cells*, 11(16), 2597. <u>https://doi.org/10.3390/cells11162597</u>
- 92. Hela CCL-2 | ATCC. (n.d.). https://www.atcc.org/products/ccl-2

- 93. U-87 Mg HTB-14 | ATCC. (n.d.-b). https://www.atcc.org/products/htb-14
- 94. T98G [T98-G] CRL-1690 | ATCC. (n.d.-b). https://www.atcc.org/products/crl-1690
- 95. Jeong, H., Kim, H. J., & Lee, S. J. (2015). Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. Genome announcements, 3(2), e00134-15. <u>https://doi.org/10.1128/genomeA.00134-15</u>
- 96. MERCK. (n.d.-a). PGEX vectors. <u>https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-</u> <u>documents/protocol/genomics/cloning-and-expression/pgex-vectors</u>
- 97. LLC, G. B. (n.d.). PGEX-4T-1 sequence and map. SnapGene. <u>https://www.snapgene.com/plasmids/pgex_vectors_(ge_healthcare)/pGEX-4T-1</u>
- 98. WST-1 assay reagent cell proliferation (ready to use) (AB155902). Abcam. (2023, September 21). <u>https://www.abcam.com/products/assay-kits/wst-1-assay-reagent-cell-proliferation-ready-to-use-ab155902.html</u>
- 99. Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Frontiers in microbiology, 8, 108. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108</u>