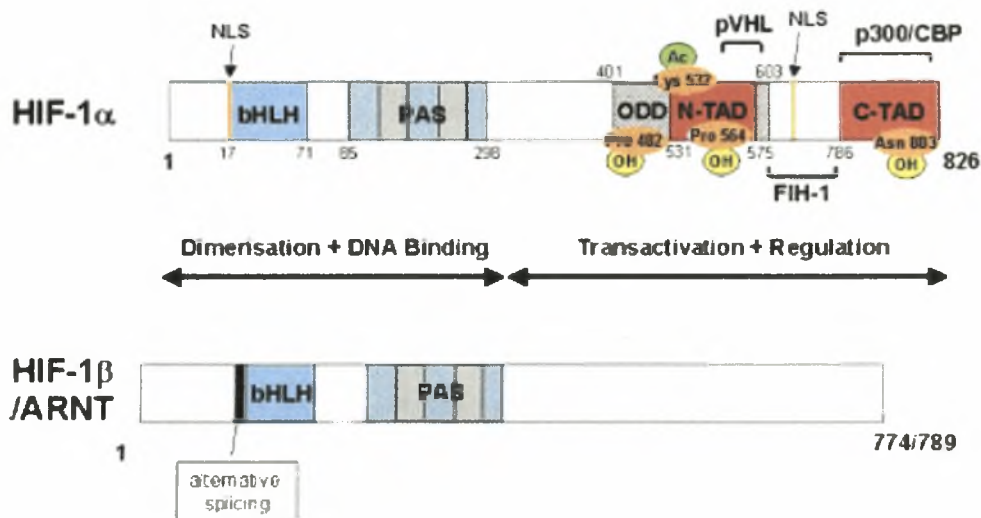


**Μοριακή απόκριση στην υποξία: εύρεση καινούργιων
μοριακών αλληλεπιδράσεων του επαγόμενου από την υποξία
παράγοντα 1α (HIF-1α)**



ΚΑΒΒΑΔΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μοριακή απόκριση στην υποξία: εύρεση καινούργιων
μοριακών αλληλεπιδράσεων του επαγόμενου από την υποξία
παράγοντα 1α (HIF-1α)**

Υπεύθυνος καθηγητής:

- ❖ Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- ❖ Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας

**Εκπόνηση: Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας**

ΚΑΒΒΑΔΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4665/1
Ημερ. Εισ.: 16-03-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΚΑΒ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087828

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το διάστημα Φεβρουάριος 2005 – Σεπτέμβριος 2005 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στην προσπάθεια αυτή είχα τη βοήθεια πολλών ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ την κ. Ε. Γεωργιάτσου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Τον κ. Κ. Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας και τον κ. Γ. Σίμο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής. Την κ. Α. Λυμπεροπούλου, υποψήφια διδάκτωρ του εργαστηρίου Βιοχημείας, που με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων επιδεικνύοντας ανεξάντλητη επιμονή. Όλους τους εργαζόμενους στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής για την πολύτιμη βοήθεια και την άψογη συνεργασία όλους αυτούς τους μήνες και τέλος τη φίλη μου και επίσης εργαζόμενη στο ίδιο εργαστήριο, Α. Καλούση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ
Θεωρητικό μέρος	3
Περίληψη	4
Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract)	5
Εισαγωγή	6
• Υποξία	6
• Δομή HIF-1	7
• Λειτουργία HIF-1	8
• Ρύθμιση HIF-1	8
• Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α	11
• Σύστημα των δύο υβριδίων	12
Σκοπός	14
Πρακτικό Μέρος	15
Υλικά και Μέθοδοι	16
• Υλικά	16
- Τμήματα HIF-1α	16
- Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης	16
- Στελέχη βακτηριακών κυττάρων	20
- Θρεπτικά μέσα	20
- Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα θρεπτικά μέσα	21
• Μέθοδοι	22
- Κατακρήνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη	22
- Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με εκγυλίσεις με διάλυμα φαινόλης	22
- - γλωροφορμίου	22
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%	22
- Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αгарόζης (Gel Extraction Kit Protocol της QIAGEN)	23
- Αποφωσφορλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την	
- Αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	23
- Αντίδραση δημιουργίας τυφλών άκρων σε προϊόντα πέψης (Klenow)	23
- Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)	24
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	24
- Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (E. coli) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	25
- Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (E. coli)	25
- Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα	26
- Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων με τη χρήση μικροφυγόκεντρου Nucleotide Kit Removal της QIAGEN	26

- Υβριδισμός πλασμιδιακού DNA με ραδιενεργά σημασμένο ανιγενετή	27
- Ταυτοποίηση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε πλασμιδιακό DNA (Sequencing)	28
Αποτελέσματα	29
• Διαχωρισμός πλασμιδίων “δολωμάτων” και πλασμιδίων “λειών”	29
• Διαχωρισμός πλασμιδίων βάσει αυξοτροφίας	29
• Μετασηματισμός κυττάρων E.coli με τα πλασμιδιακά ζεύγη	29
• Μεταφορά αποικιών σε τρυβλία M9	30
• Αποτελέσματα	30
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με την ενδονουκλεάση NotI	30
• Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA και έλεγχος φαινοτύπου	32
• Διαχωρισμός πλασμιδίων με τη χρήση ραδιοσημασμένου ανιγενετή	33
• Μετασηματισμός κυττάρων E.coli με τα πλασμιδιακά ζεύγη	33
• Υβριδισμός πλασμιδιακού DNA αποικιών με ραδιοσημασμένο ανιγενετή	34
• Έλεγχος αποτελεσμάτων υβριδισμού	35
• Πέψη πλασμιδιακού DNA υποψήφιων λειών	35
• Έλεγχος φαινοτύπου	37
• Εύρεση των αλληλουχιών των ενθεμάτων που κωδικοποιούν τις υποψήφιες πρωτεΐνες λείες	37
• Έλεγχος αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης MgcRacGAP με τον HIF-1α	41
• Εξαγωγή της GAP140 από τον πλασμιδιακό φορέα pVP16	41
• Απομόνωση και καθαρισμός της GAP140	42
• Πέψη του φορέα pBEVY-GU και αποφωσφορυλίωση των άκρων του	42
• Ποσοτικοποίηση και αντίδραση σύνδεσης μεταξύ φορέα και ενθέματος	43
• Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA	44
• Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος	44
Συζήτηση	45
Βιβλιογραφία	48

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 κατέχει κεντρικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων σε κατάσταση υποξίας αφού ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που επιτρέπουν την επιβίωση των κυττάρων. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την ερυθροποίηση, την αγγειογένεση και τον αναερόβιο μεταβολισμό. Ο HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες, την επαγόμενη HIF-1α και την σταθερά εκφραζόμενη HIF-1β (ARNT). Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την έκφραση και τη λειτουργία του.

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α. Έχοντας χρησιμοποιήσει τη μέθοδο των δύο υβριδίων σε προγενέστερα στάδια, αντικειμενικός στόχος ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ απομονωθέντων πλασμιδίων "λειών" και πλασμιδίων "δολωμάτων" καθώς και η ταυτοποίηση των ενθεμάτων των πλασμιδίων "λειών". Για την πραγματοποίηση του διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: η πρώτη βασίζεται στις διαφορετικές αυξοτροφίες μεταξύ πλασμιδίων "λειών" και "δολωμάτων" ενώ η μέθοδος περιελάμβανε τον υβριδισμό "λειών" και "δολωμάτων" με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια να ελεγχθεί το κατά πόσο η ανθρώπινη πρωτεΐνη Male germ cell Rac GTPase Activity Protein (MgcRacGAP) που έχει προκύψει ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1 με το σύστημα των δύο υβριδίων (Λυμπεροπούλου 2003), επηρεάζει τη λειτουργία του HIF-1 σε ένα απλό *in vitro* σύστημα. Για να καταστεί δυνατός ο έλεγχος θα έπρεπε αρχικά η MgcRacGAP να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Η κλωνοποίηση δεν ολοκληρώθηκε με επιτυχία και αναμένεται να ξαναεπιχειρηθεί μελλοντικά.

ABSTRACT

Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) has a central role in oxygen homeostasis in animals since, under hypoxic conditions, it regulates cell proliferation, cell death and angiogenesis. HIF-1 consists of two subunits: the inducible HIF-1 α and the constitutively expressed HIF-1 β (ARNT). HIF-1 α interacts with a large number of proteins that regulate its expression and function.

The major aim of this study was the identification of proteins that interact with HIF-1 α . Having used the two hybrid system in earlier stages, the objective was to separate plasmids containing HIF-1 α (“bait” plasmids) from plasmids containing cDNAs (“prey” plasmids) that encode proteins that may interact with HIF-1 α . Two different methods were used for this separation. The first was based on the fact that different plasmids give cells the ability to grow in different culture media and the second on hybridization of plasmid DNA with a radio labeled probe.

Moreover, we tried to examine whether the human Male germ cell Rac GTPase Activating Protein (MgcRacGAP) protein, that was found to interact with HIF-1 α by use of the two hybrid system, affects HIF-1 α function *in vivo*. To do so, MgcRacGAP had to be cloned into a proper plasmid vector. The cloning was not successful and it is going to be repeated in the future.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΥΠΟΞΙΑ

Στα θηλαστικά, η ανάπτυξη του καρδιαγγειακού, του αιμοποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μηχανισμού πρόσληψης οξυγόνου από το περιβάλλον και κατανομής του σε κάθε κύτταρο του σώματος για τη χρησιμοποίησή του στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και σε άλλες βιοχημικές αντιδράσεις. Η μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου –υποξία- μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παραγωγής ATP με αποτέλεσμα να μην μπορούν να καλυφθούν οι βασικές ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων, τα οποία πεθαίνουν. Αντίθετα, υπερεπάρκεια οξυγόνου –υπεροξία- οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που προκαλούν σοβαρές βλάβες στις μεμβράνες και το DNA. Για τους λόγους αυτούς, όλοι οι οργανισμοί, από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο, διαθέτουν μηχανισμούς ομοιοστασίας για το οξυγόνο οι οποίοι είναι σημαντικοί για την επιβίωση.

Τα κύτταρα των θηλαστικών αποκρίνονται στην υποξία με διάφορους μηχανισμούς όπως αύξηση του αναερόβιου μεταβολισμού, ερυθροποίηση, αγγειογένεση κ.λ. (*Semenza 1999, Wenger 2001*). Κεντρικό ρόλο στην επαγωγή όλων αυτών των αποκρίσεων παίζει ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1), που επάγεται από την υποξία και ενεργοποιεί τη μεταγραφή πάνω από 60 γονιδίων (βλέπε πίνακα 1). Ο αριθμός των γονιδίων των οποίων η μεταγραφή βρίσκεται να επηρεάζεται από τον HIF-1α (άμεσα ή έμμεσα) αυξάνει ταχύτατα όπως δείχνουν έρευνες που έχουν γίνει με μικροσυστοιχίες DNA (*Manalo et al, 2005*).

Λειτουργία	Γονιδιακό προϊόν
Μεταφορά οξυγόνου και μεταβολισμός σιδήρου	Ερυθροποιητίνη, Τρανσφερίνη, Υποδοχέας της Τρανσφερίνης, Σερουλοπλασμίνη, ελαφριά αλυσίδα της Φερίτινης, Οξυγενάση της Αίμης
Αγγειογένεση	Αδρενομεδουλίνη, Αγγειοποιητίνη-2, Κυκλοοξυγενάση-2, Ενδοθηλίνη 1 και 2, Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών-3, Ηπατοκυτταρικός Αυξητικός Παράγοντας, Αφακετυλάση των Ιστονών, Συνθάση του νιτρικού οξέως, Αγγειακός Ενδοθηλιακός Παράγοντας (VEGF), Υποδοχέας του VEGF
Γλυκόλυση και πρόσληψη γλυκόζης	Αλδολάση-A, Ενολάση-1, Μεταφορείς γλυκόζης 1, 3 (GLUT 1, 3), Εξοκινάση 1, 2, Γαλακτική Δεϋδρογονάση, Φωσφοφρουκτοκινάση C, L, Κινάση του φωσφογλυκερικού, Πυρουβική κινάση-M, Δεϋδρογονάση της 3-P Γλυκεραλδεϋδης
Μεταβολισμός, pH, Νευροδιαβιβαστές	Αδενυλική Κυκλάση-3, Αμινοπεπτιδάση-A, Καρβονική Ανυδράση-9, Υδροξυλάση της τυροσίνης, α- αδρενεργικός

	υποδοχέας
Αυξητικοί Παράγοντες/ Κυτοκίνες	Ινσουλινομορφος Αυξητικός Παράγοντας (IGF), Ιντερλευκίνη-6, Αυξητικός Παράγοντας αιμοπεταλίων (PDGF),

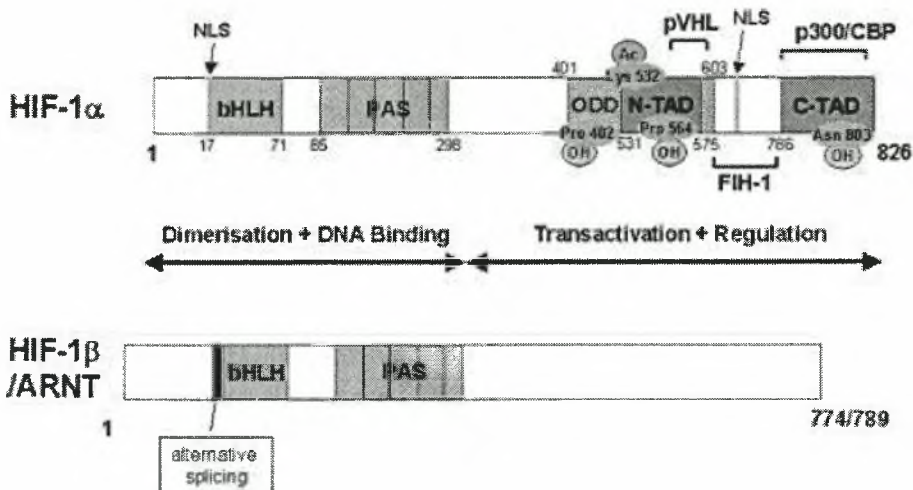
Πίνακας 1: Γονίδια που επάγονται από την υποξία μέσω του HIF-1 (Harris 2001)

HIF-1

A. Η δομή του HIF-1

Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από δύο υπομονάδες με δομή έλικα – στροφή – έλικα, τις HIF-1α και HIF-1β που εντοπίζονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 14 (14q21-q24) και 1 (1q21) αντίστοιχα (Wang *et al.*, 1995) Η HIF-1β υπομονάδα, που είναι γνωστή και ως ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator) είναι μια συνεχώς εκφραζόμενη πυρηνική πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μεταγραφή. Αντίθετα, τα επίπεδα της HIF-1α υπομονάδας αυξάνονται σε κατάσταση υποξίας.

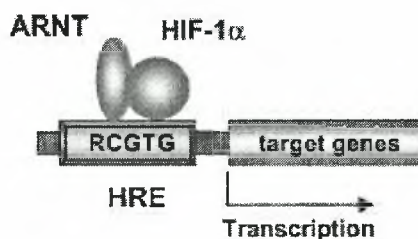
Το μόριο του HIF-1α (εικ. 1) περιλαμβάνει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS – Nuclear Localization Signals) που είναι υπεύθυνα για τη μετακίνηση στον πυρήνα, τις περιοχές bHLH και PAS (Jiang *et al* 1996, Semenza 2001) που είναι απαραίτητες για τον διμερισμό με τον ARNT, δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADN και TADC – Transcription Activation Domains) που συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του μορίου με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως οι CBP/p300 (Semenza 2001) και SRC-1, μια ρυθμιστική περιοχή που συμβάλλει στη σταθερότητα του μορίου και βρίσκεται μεταξύ των TADs και τέλος την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α παρουσία οξυγόνου (ODDD – Oxygen Dependent Degradation Domain).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των HIF-1α και ARNT. Οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν από μια bHLH (basic helix-loop-helix) και μια PAS (Per/ ARNT/ Sim) περιοχή, οι οποίες ρυθμίζουν τον διμερισμό και την πρόσδεση στο DNA. Οι άμινο- και καρβόξυ- τελικές περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD, C-TAD) του HIF-1α είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ενεργότητά του ενώ η ODD περιοχή ρυθμίζει την πρόσδεση στον pVHL που οδηγεί σε αποικοδόμηση. Η πρόσδεση του p300/ CBP συνενεργοποιητή γίνεται στη C-TAD περιοχή. (Από Bardos and Ashcroft, 2004)

Β. Η λειτουργία του HIF-1

Σε συνθήκες υποξίας, τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνουν και μεταφέρεται στον πυρήνα. Εκεί, διμερίζεται με τον ARNT για να σχηματισθεί ο HIF-1. Το σύμπλοκο επάγει τη μεταγραφή γονιδίων, η ταυτότητα των οποίων εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και το είδος του ερεθίσματος. Τα γονίδια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον HIF-1 παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Τα γονίδια αυτά, περιέχουν στον υποκινητή τους ένα ή περισσότερα στοιχεία που αποκρίνονται στην υποξία (HREs – Hypoxia Response Elements) τα οποία αποτελούνται από το μοτίβο G/ACGTG όπου προσδένεται ο HIF-1. (Semenza 2000&2001)



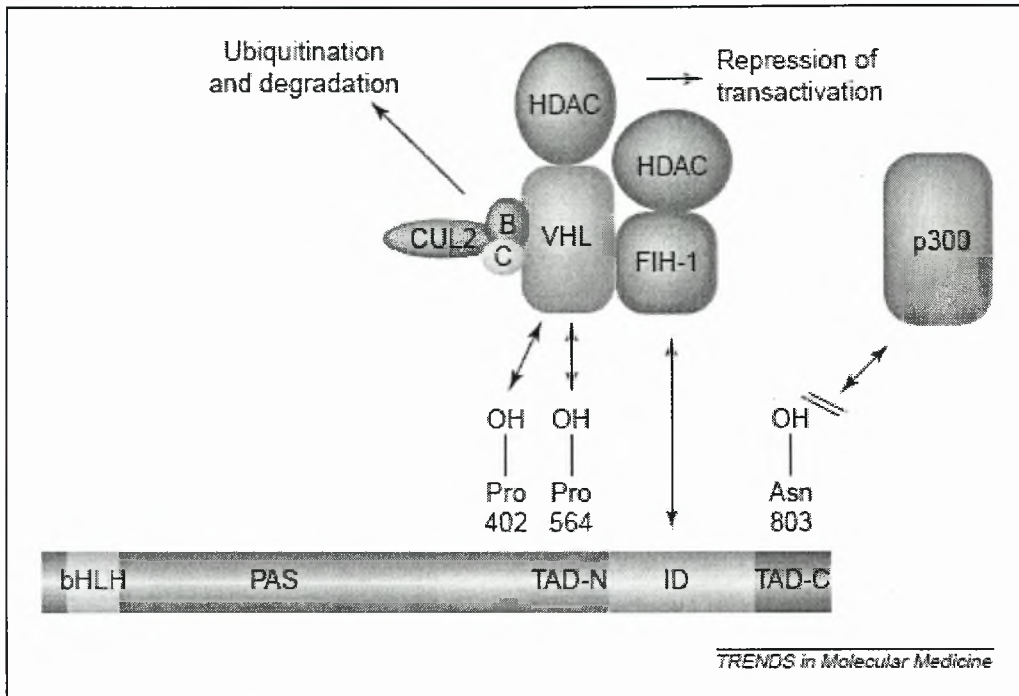
Εικόνα 2: Ο ARNT και ο HIF-1α διμερίζονται και προσδένονται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία των γονιδίων στόχων ενεργοποιώντας τη μεταγραφή τους. (Από Yeo et al., 2004)

Γ. Η ρύθμιση του HIF-1

Ι. Νορμοξία

Κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-1α παίζει το οξυγόνο και η συγκέντρωσή του σε κυτταρικό επίπεδο. Σε καταστάσεις νορμοξίας (φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου) ο HIF-1α υπόκειται σε ουβικουιτινίωση που οδηγεί το μόριο σε πρωτεοσώματα όπου και αποικοδομείται (Wenger et al, 2002). Ως ανιχνευτές των επιπέδων οξυγόνου λειτουργούν ορισμένα ένζυμα η δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται από το οξυγόνο και ονομάζονται υδροξυλάσες προλίνης (Prolyl Hydroxylase Domain - PHD) ή υδροξυλάσες προλίνης του HIF (HIF Prolyl Hydroxylase HPH). Παρουσία οξυγόνου, τα ένζυμα αυτά υδροξυλιώνουν δύο κατάλοιπα προλίνης (Pro 402 & Pro 564) στην ODD περιοχή του HIF-1α. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας του HIF-1α για τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα von Hippel – Lindau (pVHL) που είναι ο αναγνωριστικός παράγοντας ενός συμπλόκου ουβικουιτινίωσης (pVHL – elonginB – elonginC – Cul2 - Rbx) που οδηγεί τελικά το μόριο στα πρωτεοσώματα για αποικοδόμηση. Η αλληλεπίδραση του pVHL με τον HIF-1α ενισχύεται με την ακετυλίωση της λυσίνης 532 από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (Joo-Won Jeong et al 2002).

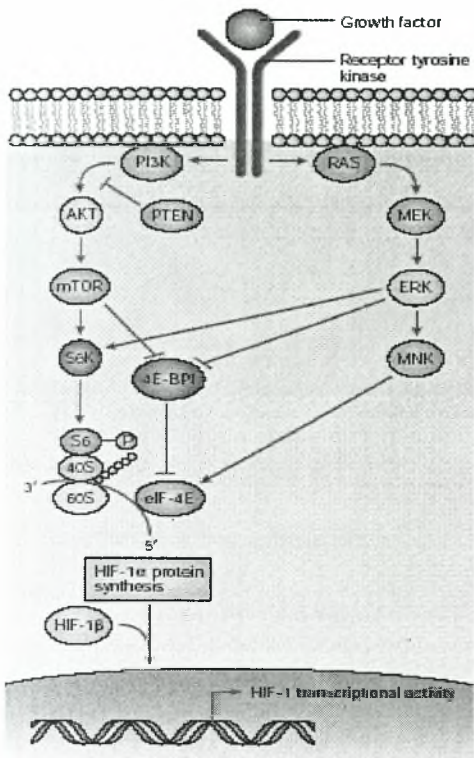
Πέρα από την υδροξυλίωση στα κατάλοιπα προλίνης της ODD περιοχής, υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα και στην C-TAD περιοχή αλλά σε κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn 803). Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την CH-1 περιοχή του συνενεργοποιητή p300 με αποτέλεσμα την πώση της μεταγραφικής δραστηριότητάς του. Συμπερασματικά, σε καταστάσεις νορμοξίας, τα επίπεδα του οξυγόνου επιδρούν τόσο στο χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης του HIF-1α αφού παρουσία οξυγόνου επάγεται η αποικοδόμησή της, όσο και στη μεταγραφική του ενεργότητα αφού η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον p300 (εικ. 3).



Εικόνα 3: Η υδροξυλίωση της προλίνης 402 ή 564 του HIF-1α είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της VHL πρωτεΐνης που ενεργοποιεί ένα σύμπλοκο ουβικουτινίωσης που σημαίνει τον HIF-1α ώστε να αποικοδομηθεί. Ο VHL ενεργοποιεί και την απακετυλάση των ιστονών (HDAC) που καταστέλλει τη δράση της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης στη θέση 803 εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συνενεργοποιητή p300 που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής.

(Από Semenza et al, 2002)

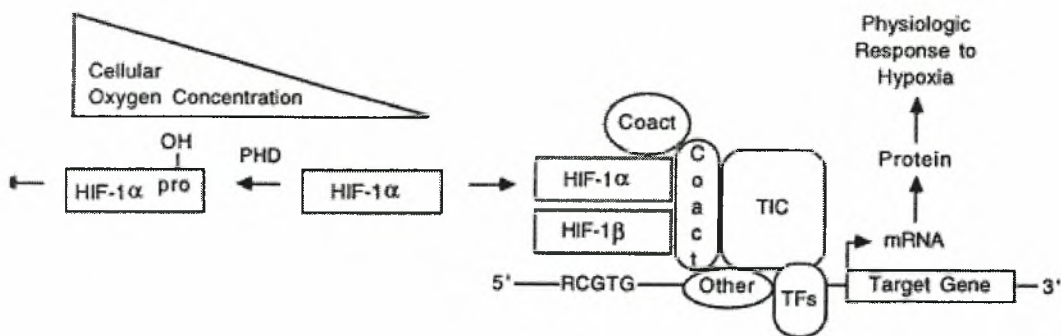
Εκτός από το οξυγόνο, στη ρύθμιση του HIF-1α σε κατάσταση νορμοξίας συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες όπως ο Ινσουλινόμορφος Αυξητικός Παράγοντας (IGF), ο Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών-2 (FGF-2), η ιντερλευκίνη 1β, η αγγειοτενσίνη II και άλλοι (Wenger 2002). Παρά τη μεγάλη τους ποικιλότητα, οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες είναι πιθανό να σταθεροποιούν τον HIF-1α μέσω μονοπατιών κινασών που ενεργοποιούνται από εξειδικευμένους υποδοχείς. Η διαφορά στην ενεργοποίηση του HIF-1 κατά την υποξία και στην ενεργοποίηση από αυξητικούς παράγοντες έγκειται στο ότι στην πρώτη περίπτωση αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1α σε όλους τους ιστούς ενώ στη δεύτερη έχουμε αύξηση σε συγκεκριμένη/ες κατηγορία/ες κυττάρων (εικ. 4). (Semenza 2003).



Εικόνα 4: Αυξητικός παράγοντας προσδένεται σε υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και ενεργοποιεί τα μονοπάτια της 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI3K) και των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα κινασών (MAPK). Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/ θρεονίνης AKT – γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B- και την mTOR (mammalian target of rapamycin). Στο μονοπάτι των MAP κινασών, η κινάση ERK (extra cellular signal-regulated kinase) ενεργοποιείται από την κινάση MEK (MAP/ ERK kinase). Η ERK με τη σειρά της ενεργοποιεί την MNK. Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την p70 S6 (S6K) κινάση -η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6- και την πρωτεΐνη που δεσμεύεται με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E). Η πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής στον eIF-4E αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA. Η φωσφορυλίωσή της όμως από τους προαναφερθέντες παράγοντες εμποδίζει την πρόσδεσή της στον eIF-4E με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μεταγραφής μιας ομάδας mRNA στα οποία περιλαμβάνεται και αυτό του HIF-1α.
(Από Semenza, 2003)

II. Υποξία

Κατά την υποξία, ο ARNT διμερίζεται με τον HIF-1α ο οποίος δεν υπόκειται σε υδροξυλίωση, ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση γιατί δεν υπάρχει αρκετό οξυγόνο ώστε να δράσουν οι υδροξυλάσες του HIF-1α. Το ετεροδιμερές σχηματίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στα HREs των γονιδίων στόχων και αλληλεπιδρά με μόρια που δρουν ως συνενεργοποιητές με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής και τη σύνθεση mRNA. Το τελικό αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας είναι η παραγωγή πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις του οργανισμού στην υποξία.



Εικόνα 5: Σε περιπτώσεις μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται και διμερίζεται με τον HIF-1β. Το διμερές προσδένεται στα HREs (RCGTG) και με τη βοήθεια συνενεργοποιητών (coactivators) σχηματίζουν το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής (TIC).

(Από Semenza, 2001)

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ HIF-1α

Η ενεργοποίηση και η ρύθμιση του HIF-1α προϋποθέτουν την αλληλεπίδρασή του με πολλές άλλες πρωτεΐνες. Η πρόοδος στον συγκεκριμένο τομέα είναι συνεχής και οι μέχρι τώρα γνωστές αλληλεπιδράσεις είναι:

1. **ARNT:** Η πρωτεΐνη με την οποία διμερίζεται ο HIF-1α για να σχηματίσει τον HIF-1 (*Wang et al 1995, Kallio et al 1998*)
2. **pVHL:** Ογκοκατασταλτικός παράγοντας και συστατικό του συμπλόκου ουβικουιτινίωσης. Παρουσία οξυγόνου αλληλεπιδρά με υδροξυλιωμένες προλίνες του HIF-1α οδηγώντας τον τελικά για αποικοδόμηση στα πρωτεοσώματα (*Ivan et al 2001, Ohh et al 2002*).
3. **CBP/ p300 (Creb Binding Protein):** Συμπαράγοντας της μεταγραφής που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στον πυρήνα σε κατάσταση υποξίας. Έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης.
4. **SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator) και TIF-2 (Transcription Intermediary factor):** Συμπαράγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α. Ο SRC-1 έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης, συνδέεται απευθείας και συνεχώς με τον CBP και λειτουργεί σαν γέφυρα μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων (*Banister et al, 1996*). Ο TIF-2 ανήκει στην οικογένεια των p160 μεταγραφικών παραγόντων και βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α *in vivo* (*Carrero Pillar et al, 1999*) αλλά δεν έχουν βρεθεί προς το παρόν οι θέσεις στον HIF-1α με τις οποίες αλληλεπιδρά.
5. **FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1):** Υδροξυλάση της ασπαραγίνης που υδροξυλιώνει την ασπαραγίνη στη θέση 803 του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον CBP/ p300 (*McNeill and Hewtson, 2002*.)
6. **p53:** Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την περιοχή των αμινοξέων 401 – 603 (ODD) του HIF-1α. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει κατά την υποξία προωθώντας την πρωτεόλυση του HIF-1α μέσω της οδού της Mdm-2-ουβικουιτίνου λιγάσης (*Rajani Ravi et al 2000, Won G. Et al 1998, Bech-Otschir et al 2001*).
7. **Jab 1 (Jun Activation Domain Binding Protein 1):** Συνενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 που ανταγωνίζεται τη δράση της p53-με την οποία αλληλεπιδρούν στην ίδια περιοχή- σε συνθήκες υποξίας σταθεροποιώντας τον HIF-1α (*Moon-Kyoung Bae et al, 2001*).
8. **hsp 90 (heat shock protein 90):** Πρωτεΐνη θερμικού σοκ που ανήκει στην οικογένεια των μοριακών συνοδών. Συμβάλλει στη σταθεροποίηση του HIF-1α αλλά δεν έχει αποσαφηνισθεί σε ποιες συνθήκες συμβαίνει αυτό. Από τους *Minet et al, 1999* βρέθηκε ότι η σταθεροποίηση γίνεται μόνο σε συνθήκες νορμοξίας, από τους *Katschinski et al 2002* ότι συμβαίνει σε συνθήκες υποξίας και από τους *Isaacs et al 2002* ότι συμβαίνει και στις δύο περιπτώσεις.
9. **p42/ p44 MAPKs (Mitogen Activated Serine/ Threonine Protein kinases):** Κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει τον διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT (*Richard et al, 1999*)
10. **HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4):** Αλληλεπιδρά σε συνθήκες υποξίας με την περιοχή PAS του HIF-1α ενεργοποιώντας την έκφραση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (*Zhang W. et al, 1999*)
11. **ARD1 (Arrest defective-1 protein):** Πρωτεΐνη με δράση ακετυλοτρανσφεράσης. Ακετυλιώνει τον HIF-1α στη λυσίνη στη θέση 532

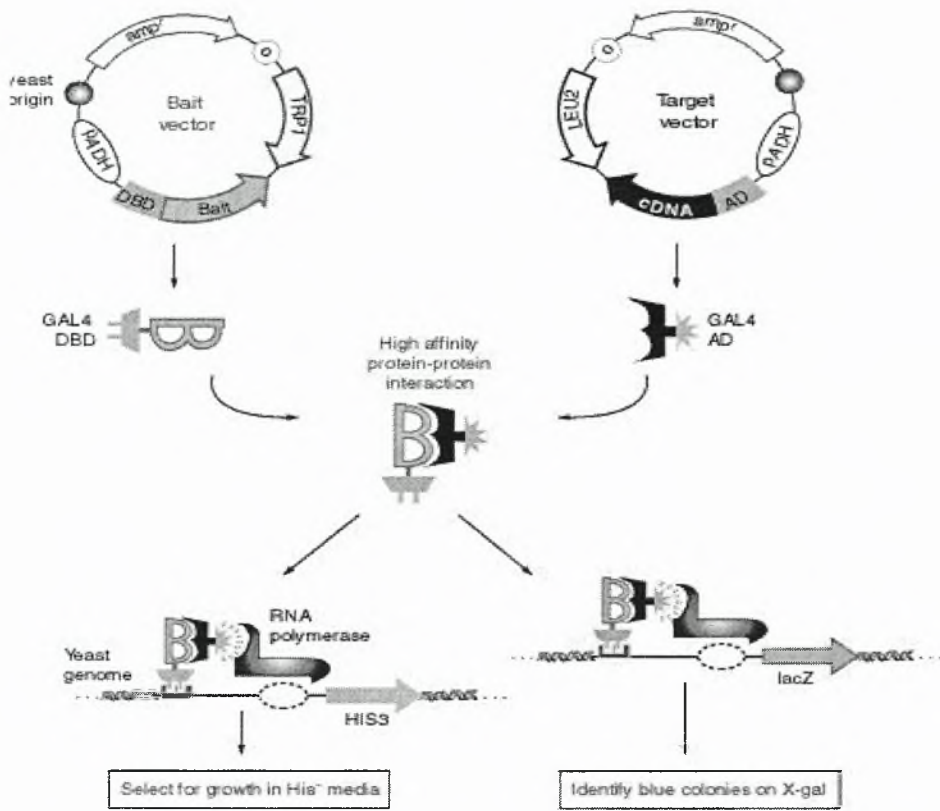
της ODDD αυξάνοντας τη συγγένειά του για τον pVHL (*Joo-Won Jeong et al 2002*). Πρόσφατες μελέτες πάντως αμφισβητούν ότι συγκεκριμένη αλληλεπίδραση επηρεάζει τον HIF-1α (*Bilton, 2005*).

12. **HDA7 (Histone Deacetylase 7):** Ένζυμο που σχηματίζει σύμπλοκο με τον HIF-1α και τον p300 στον πυρήνα σε συνθήκες υποξίας. Πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τον HIF-1α (*Kato et al, 2004*).
13. **Necdin :** Ογκοκατασταλτικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με την ODD περιοχή του HIF-1α σε κατάσταση υποξίας μειώνοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα (*Hyo-Eun Moon et al, 2005*).
14. **OS-9:** Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά τόσο με τον HIF-1α όσο και με τις προλυλ-υδροξυλάσες του σε κατάσταση νορμοξίας. Επάγει την υδροξυλίωση και την αποικοδόμηση του HIF-1α καθώς και την αλληλεπίδρασή του με τον pVHL (*Baek et al, 2005*).

ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Πολλές από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις (Jab-1, FIH-1, Necdin, HDA7, HSP90, ARD1, OS-9) έχουν ανιχνευθεί με τη μέθοδο των δύο υβριδίων. Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων (πρωτεϊνών) χρησιμοποιώντας τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, βασιζόμενη στη γνώση που αποκτήθηκε τη δεκαετία του '80 πάνω στους μηχανισμούς έναρξης της μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούνται από δύο περιοχές που μπορούν να δράσουν ξεχωριστά: την περιοχή αναγνώρισης και πρόσδεσης (DNA Binding Domain-BD) στους υποκινητές των γονιδίων και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain-AD).

Το σύστημα των δύο υβριδίων αποτελείται ουσιαστικά από τρία μέρη: i) την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει ή πρωτεΐνη "δόλωμα" (εν προκειμένω ο HIF-1α) που συντήκεται με την BD ενός μεταγραφικού παράγοντα. ii) τις πρωτεΐνες που τυχόν αλληλεπιδρούν μαζί του (λείες) και συνδέονται με την AD ενός μεταγραφικού παράγοντα και iii) ένα γονίδιο αναφοράς του οποίου η έκφραση δίνει στα κύτταρα συγκεκριμένο φαινότυπο. Στον υποκινητή του γονιδίου αυτού υπάρχει θέση δέσμευσης για την BD του δολώματος (*εικ.6*). Αν "λεία" και "δόλωμα" αλληλεπιδρούν *in vivo*, όταν θα εισαχθούν στον σακχαρομύκητα, θα επάγουν την προσέγγιση της AD με την BD και έτσι θα ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκτήσουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο.



Missfeld / Applied Molecular Genetics
 Fig. 05.09. Two hybrid REVISED

Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος των δύο υβριδίων. Τα πλασμίδια με το "δολώμα" και τη "λεία" εισάγονται σε κύτταρα σακχαρομύκητα που έχει γονίδια αναφοράς υπό τον έλεγχο συγκεκριμένου υποκινητή. Αλληλεπίδραση μεταξύ "λείας" και "δολώματος" θα οδηγήσει στη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε δύο αντικειμενικούς στόχους:

A) Την ανίχνευση και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και επηρεάζουν την έκφραση και τη λειτουργία του. Σε πειράματα που είχαν προηγηθεί της εργασίας, τμήματα του HIF-1α (HS και HE300- βλέπε Υλικά) είχαν συνδεθεί με την Περιοχή Πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 που υπάρχει στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9. Ο ανασυνδυασμένος πλέον φορέας αποτέλεσε το πλασμίδιο "δόλωμα". Οι υποψήφιες προς αλληλεπίδραση πρωτεΐνες, δηλαδή μια cDNA βιβλιοθήκη ποντικού με 2.5×10^6 cDNA κλώνους (Nikolakaki et al, 2001), συνδέθηκαν με την Activation Domain της πρωτεΐνης VP16 που υπάρχει στον πλασμιδιακό φορέα pVP16- πλασμίδιο "λεία". Στη συνέχεια, πλασμίδια "λείες" και πλασμίδια "δολώματα" (από ένα "δόλωμα" και μία "λεία" κάθε φορά) εισήχθησαν σε κύτταρα σακχαρομύκητα – στέλεχος pJ69-4A- που περιείχαν τρία γονίδια αναφοράς υπό τον έλεγχο του υποκινητή GAL4. Τα γονίδια αυτά ήταν τα: LacZ που κωδικοποιεί το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης και υδρολύει το υπόστρωμα X-gal δίνοντας μπλε χρώμα στις αποικίες, HIS3 που προσδίδει στα κύτταρα πρωτοτροφία στην ιστιδίνη οπότε μπορούν να μεγαλώσουν παρουσία 3-αμινοτριαζόλης που είναι συναγωνιστικός αναστολέας του προϊόντος του βιοσυνθετικού ενζύμου της ιστιδίνης και ADE2 που προσδίδει στα κύτταρα πρωτοτροφία στην αδενίνη δίνοντας άσπρες αποικίες (στην αντίθετη περίπτωση είναι κόκκινες).

Μετά το μετασχηματισμό, από τις αποικίες που προέκυψαν, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA το οποίο όμως αποτελούνταν σε κάθε περίπτωση από δύο πλασμίδια –ένα "δόλωμα" και μία "λεία". Στόχος της εργασίας ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ "λειών" και "δολωμάτων" ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α.

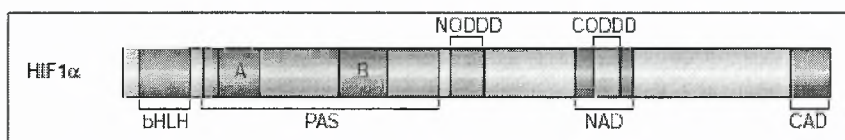
B) Να ελεγχθεί σε ένα απλό σύστημα το αν και κατά πόσο ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την ανθρώπινη πρωτεΐνη Male germ cell Rac GTPase Activity Protein (MgcRacGAP). Η ομόλογη πρωτεΐνη στον ποντικό είχε βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α μέσω της μεθόδου των δύο υβριδίων σε πειράματα που είχαν προηγηθεί. Για να εξακριβωθεί το αν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον HIF-1α *in vivo* χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα (Braliou et al, 2004) που βασίζεται σε κύτταρα σακχαρομύκητα στα οποία έχουν εισαχθεί τα γονίδια του HIF-1 και της β-γαλακτοσιδάσης. Αν η MgcRacGAP αλληλεπιδρά με τον HIF-1α αναμένουμε μεταβολές στα επίπεδα της β-γαλακτοσιδάσης.

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. ΥΛΙΚΑ

Τμήματα HIF-1α



HS (244-532)



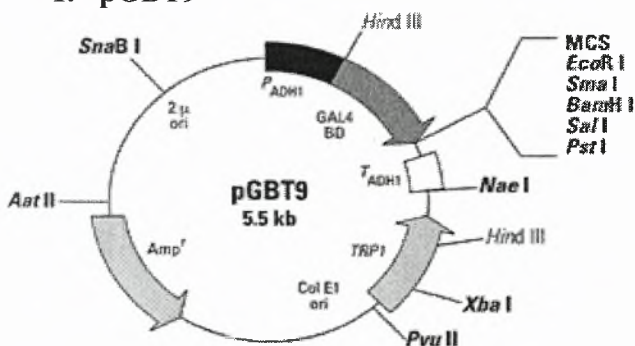
HE300 (1-330)



Εικόνα 7: Τα τμήματα του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν ως δολώματα για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες. Διακρίνεται το τμήμα HS με μέγεθος 837 bp που περιέχει την PAS B περιοχή και το τμήμα HE300 που αντιστοιχεί στην bHLH και PAS περιοχή. Τα τμήματα αυτά δεν περιλαμβάνουν περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής και επομένως δεν ενεργοποιούν από μόνα τους τα γονίδια αναφοράς.

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης

1. pGBT9



Εικόνα 8: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGBT9

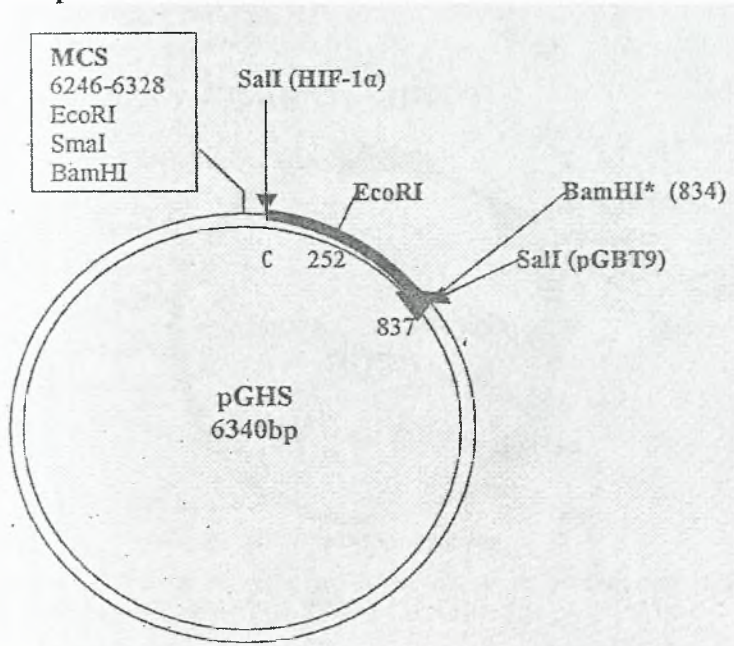
MCS: Multiple cloning site. Περιοχή κλωνοποίησης ξένου τμήματος DNA

Amp^r: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν

TRP1: Γονίδιο που προσδίδει πρωτοτροφία στο αμινοξύ τρυπτοφάνη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

GAL4-BD: Αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Binding Domain - BD) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4

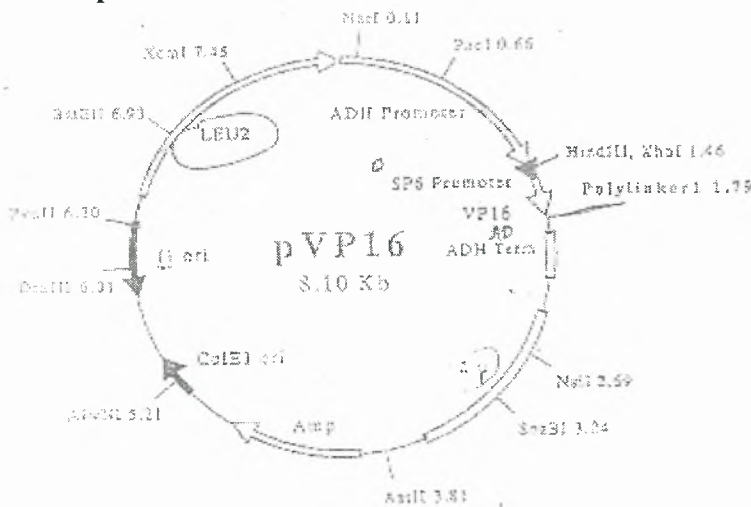
2. pGHS



Εικόνα 9: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGHS. Πρόκειται ουσιαστικά για τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pGBT9 με ένθεμα 837 βάσεις του HIF-1α (HS)

Για να εισαχθεί το ένθεμα στον φορέα pGBT9 έγινε πέψη του φορέα με την περιοριστική ενδονουκλεάση SalI. Με το ίδιο ένζυμο απομονώθηκε και το τμήμα HS από ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιείχε τον HIF-1α. (Λυμπεροπούλου, 2003)

3. pVP16



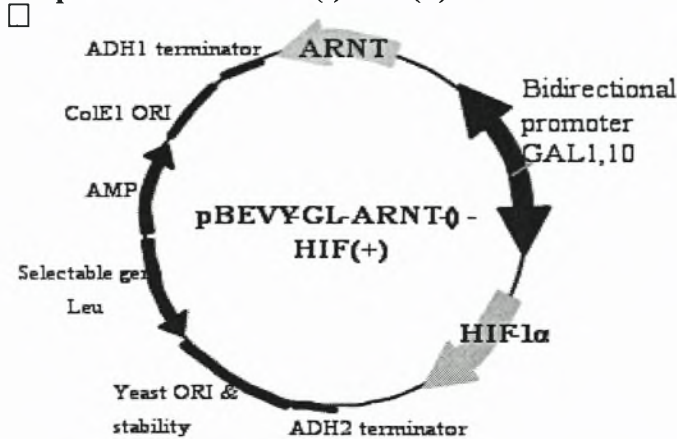
Εικόνα 10: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pVP16

VP16-AD: Αλληλουχία που κωδικοποιεί την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain - AD) του μεταγραφικού παράγοντα VP16

Amp^r: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν

Leu2: Γονίδιο που προσδίδει αυξοτροφία στο αμινοξύ λευκίνη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

4. **pBEVY-GL-ARNT(-)-HIF(+)**



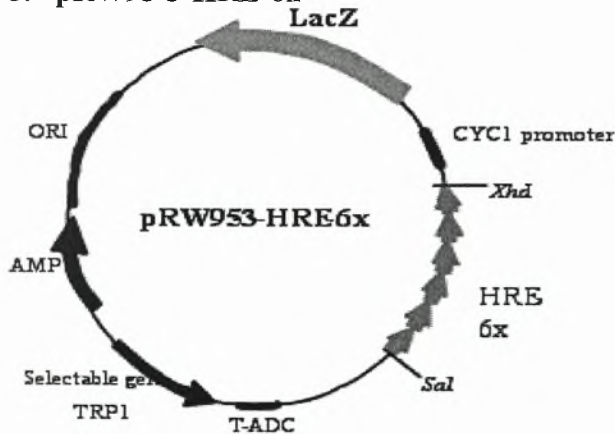
Εικόνα 11: χάρτης του ανασυνδυασμένου, με τα γονίδια των HIF-1α και ARNT, πλασμιδιακού φορέα Pbevy-GL-ARNT(-)-HIF(+)

ARNT – HIF: Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1

GAL1,10: Υποκινητής διπλής κατεύθυνσης που επάγεται από την γαλακτόζη

Leu2: Γονίδιο που προσδίδει αυξοτροφία στο αμινοξύ λευκίνη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

5. **pRW95-3-HRE-6x**



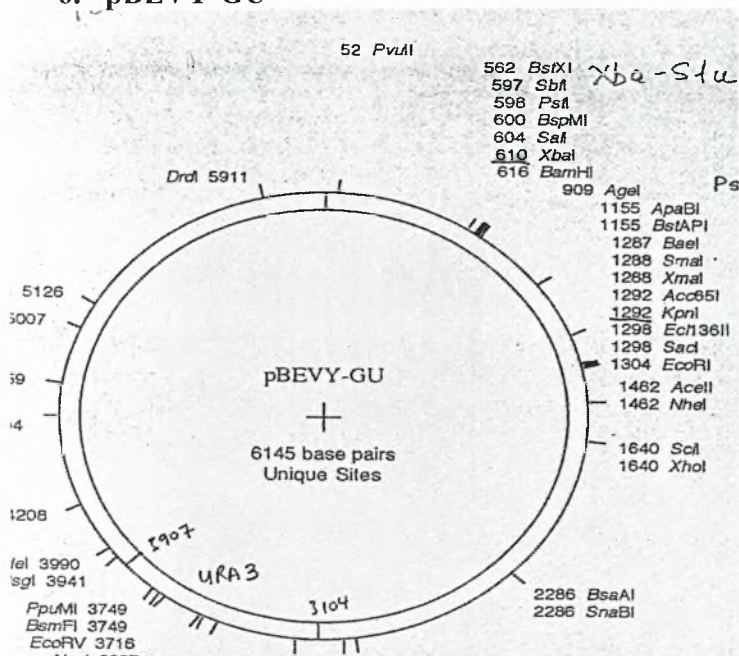
Εικόνα 12: Χάρτης του ανασυνδυασμένου, με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και τις αλληλουχίες απόκρισης στην υποξία του υποκινητή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, πλασμιδιακού φορέα pRW95-3-HRE-6x.

LacZ: Γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (γονίδιο αναφοράς)

HRE 6x: Έξι αντίγραφα της αλληλουχίας απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements) του γονιδίου της ερυθροποιητίνης

TRP1: Γονίδιο που προσδίδει πρωτοτροφία στην τρυπτοφάνη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

6. pBEVY-GU

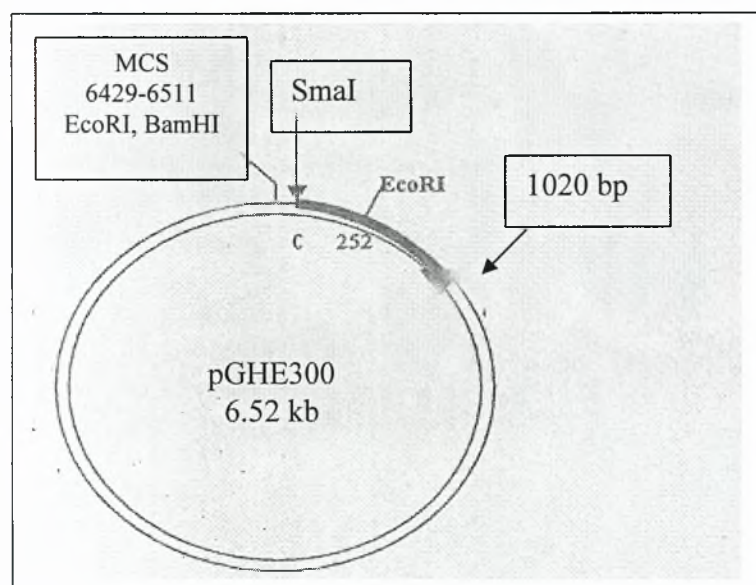


Εικόνα 13: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pBEVY-GU

URA3: Γονίδιο που προσδίδει πρωτοτροφία στο αμινοξύ ουρακίλη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

Amp^r: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν

7. pGHE300



Εικόνα 14: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGHE300

MCS: Multiple cloning site. Περιοχή κλωνοποίησης ξένου τμήματος DNA

Amp^r: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν

TRP1: Γονίδιο που προσδίδει πρωτοτροφία στο αμινοξύ τρυπτοφάνη επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων που το περιέχουν

Στελέχη βακτηριακών κυττάρων *E. coli*:

- Top 10
- KC8 (L⁻, W⁻, H⁻, U⁻)

Στελέχη κυττάρων σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*)

- pJ69-4A (MAT a trp1-901 leu 2-3, 112 ura3-52 his 3-200 gal4 Δ LYS2 :: GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met :: GAL7-lacZ) που φέρει ενσωματωμένα στο γονιδίωμά του τα γονίδια αναφοράς LacZ, ADE2, HIS3
- RS453 που έχει μετασχηματιστεί με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pRW95-3-HRE-6x και pBEVY-GL-ARNT(-)-HIF(+)

Θρεπτικά υλικά

LB (για 1000 ml)

- 10 gr bacto tryptone
- 5 gr bacto yeast extract
- 10 gr NaCl
- για τρυβλία: 20 gr agar
- αποστείρωση σε αυτόκαυστο

SC/ SG (για 1000 ml)

- 20 gr glucose/ 20 gr galactose
- 1.75 gr yeast nitrogen base
- 5 gr (NH₄)₂SO₄
- 0.55 gr από μίγμα αμινοξέων (Leu⁻, Trp⁻, Ade⁻, Ura⁻, His⁻)
- 350 μl NaOH 5M (ώστε το διάλυμα να αποκτήσει pH 5.6)
- για τρυβλία: 20 gr agar
- αποστείρωση σε αυτόκαυστο

YPD (για 1000 ml)

- 20 gr glucose
- 10 gr bacto yeast extract
- 20 gr bacto peptone
- για τρυβλία: 20 gr agar
- αποστείρωση σε αυτόκαυστο

M₉ τρυβλία (1000 ml)

- 750 ml dd H₂O
- 200 ml 5xM₉
- 1 ml MgSO₄ 2M
- 0.1 ml CaCl₂ 1M
- 5 gr glucose 100%

- 20 gr agar
- αποστείρωση σε αυτόκαυστο

5xM9 (1000 ml):

- 42.5 gr $(\text{Na})_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 15 gr KH_2PO_4
- 2.5 gr NaCl
- 5 gr NH_4Cl
- 1000 ml ddH₂O

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα θρεπτικά υλικά

I. Αμινοξέα: TRP (100x) 0.56 gr/ 50 ml, LEU (90x) 1.18 gr/ 50 ml

II. Αντιβιοτικά: Αμπικιλίνη 0.1 mg/ ml

III. Λοιπές χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν: AT (3-Αμινιτριαζόλη) 2M, X-Gal 20 mg/ ml, KH_2PO_4 2M, Na_2HPO_4 2M, ADE (166x) 0.17 gr/ 50 ml, URA (100x) 0.112 gr/ 50 ml

II. ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

- Προσθέτουμε 2.5 όγκους αιθανόλης 100% και 0.1 όγκους CH₃COONa pH 5.0 στο διάλυμα νουκλεϊκών οξέων
- Αφήνουμε στους -20°C για 20 min τουλάχιστον
- Φυγοκεντρούμε για 10 min στις 14000 rpm
- Αιωρούμε το ίζημα σε 500 μl αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες
- Ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα
- Επαναδιαλύουμε το DNA σε δις απεσταγμένο νερό

Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με εκχυλίσαις με διάλυμα φαινόλης – χλωροφορμίου

Χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από το DNA και βασίζεται στο ότι η αποπρωτεϊνωση γίνεται καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες αντί για έναν.

- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης : χλωροφορμίου με το διάλυμα νουκλεϊκού οξέως και αναμιγνύουμε
- Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 14000 rpm
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε σωληνάκι μικροφυγόκεντρου
- Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία
- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου με τον όγκο της υδατικής φάσης
- Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 14000 rpm
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε σωληνάκι μικροφυγόκεντρου
- Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη (βλέπε άνωθεν)

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τμημάτων DNA από 500 bp ως 7 kb.

- Διαλύουμε αгарόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x ώστε η τελική συγκέντρωσή της στο διάλυμα να είναι 1% (0.6 g αгарόζης σε 60 ml TAE)
- Θερμαίνουμε το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη
- Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ ml) ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα να είναι 0.5 μg/ ml
- Ρίχνουμε το διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές και περιμένουμε να πήξει
- Προσθέτουμε TAE 1x ώστε να καλυφθεί η πηκτή
- Προσθέτουμε στο διάλυμα με το DNA **διάλυμα φόρτωσης**, το οποίο είναι 7x σε σχέση με τον συνολικό όγκο
- Φορτώνουμε το διάλυμα στις εγκοπές της πηκτής

- Συνδέουμε με ηλεκτρόδια τη συσκευή και ηλεκτροφορούμε στα 100 V για 20 min τουλάχιστον
- Τοποθετούμε την πηκτή πάνω από λάμπα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζουμε

TAE: 4 mM Tris – Acetate, 1 mM EDTA

Διάλυμα φόρτωσης: 0.25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol FF, 30% glycerol (σε νερό)

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel Extraction kit Protocol της QIAGEN)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA από 70 ως 10000 bp.

- Με αποστειρωμένο νυστέρι αφαιρούμε το κομμάτι της πηκτής που περιέχει το τμήμα που μας ενδιαφέρει.
- Ζυγίζουμε το κομμάτι και προσθέτουμε 3 όγκους διαλύματος QG σε έναν όγκο πηκτής. (100 mg = 100μl)
- Επωάζουμε για 10 min στους 50°C
- Προσθέτουμε έναν όγκο ισοπροπανόλης σε έναν όγκο δείγματος
- Μεταφέρουμε το δείγμα στην ειδική στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000rpm
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 750 μl PE Buffer. Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm
- Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάκι φυγοκέντρωσης (1.5 ml)
- Προσθέτουμε 30 μl δις απεσταγμένο νερό, περιμένουμε 1 min και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm

Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase)

Χρησιμοποιείται για την αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα τμήματα DNA εμποδίζοντας την επανασύνδεση τους.

- Για αντίδραση όγκου 100 μl (10 μg πλασμιδιακού DNA)
- Προσθέτουμε 1 μl CIP (10 u/ μl)
- Αφήνουμε για 15 min στους 37°C
- Αφήνουμε για 15 min στους 55°C
- Προσθέτουμε 1 μl CIP
- Αφήνουμε για 15 min στους 37°C
- Προσθέτουμε EDTA ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 5 mM
- Αφήνουμε για 10 min στους 75°C
- Καθαρίζουμε το πλασμιδιακό DNA με εκχυλίσεις με φαινόλη – χλωροφόρμιο
- Κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη

Αντίδραση δημιουργίας τυφλών άκρων σε προϊόντα πέψης (Klenow)

Χρησιμοποιείται για τη δημιουργία τυφλών άκρων σε τμήματα DNA που έχουν υποστεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που δημιουργούν 5' προεξέχοντα κολλώδη άκρα.

- Για αντίδραση όγκου 150 μl
- Προσθέτουμε 3 μl klenow (5 u/ μl)
- Προσθέτουμε dNTPs ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 50 μM
- Αφήνουμε στους 37°C για 30 min
- Αφήνουμε στους 70°C για 10 min

Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)

Χρησιμοποιείται η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 η οποία καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων.

- Για αντίδραση όγκου 20 μl χρησιμοποιούμε
Πλασμιδιακό DNA και ξένο τμήμα DNA
2 μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x)
5 μl λιγάσης (1u/ μl)
dd H₂O μέχρι τα 20 μl
- Επαάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετασχηματίζουμε βακτηριακά κύτταρα E. coli με το προϊόν της αντίδρασης

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

A. Με τη χρήση στήλης (Spin Miniprep Kit Protocol της QIAGEN)

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από ολονύχτιες καλλιέργειες (1-5 ml) βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε αναλογία 1000/1.

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 min στις 4000rpm
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 250 μl P1 buffer και μεταφέρουμε σε μικροσωληνάκι φυγοκέντρωσης
- Προσθέτουμε 250 μl P2 Buffer και ανακινούμε
- Προσθέτουμε 350 μl N3 Buffer και ανακινούμε
- Φυγοκεντρούμε για 10 min στις 14000 rpm
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm
- Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 500 μl PB Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 750 μl PE Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm, απορρίπτουμε το έκλουσμα και ξαναφυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm
- Προσθέτουμε 20 μl δις απεσταγμένο νερό, περιμένουμε 1 min και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm

B. Με τη χρήση διαλυμάτων

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από ολονύχτιες καλλιέργειες (2-5 ml) βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε αναλογία 1000/1

- Χρησιμοποιούμε 2 ml από την υγρή καλλιέργεια τα οποία φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 5 min
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο εκτός από 100 μl στα οποία επαναδιαλύουμε το ίζημα
- Προσθέτουμε 300 μl διαλύματος **TENS** και αναμιγνύουμε
- Προσθέτουμε 150 μl διαλύματος CH_3COONa 3M pH 5.2 και αναμιγνύουμε
- Φυγοκεντρούμε για 2 min στις 14000 rpm
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2.5 όγκους αιθανόλης 100%
- Τοποθετούμε το δείγμα στους -4°C για 20 min
- Φυγοκεντρούμε για 10 min στις 14000 rpm
- Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη (βλέπε άνωθεν)

TENS :0.1N NaCl, 0.5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7.

Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

- Επιμολύνουμε 5 ml διαλύματος **TYM** με το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C overnight
- Αραιώνουμε την καλλιέργεια σε αναλογία 1: 200 (250 μl καλλιέργειας σε 50 ml **TYM**)
- Αφήνουμε την καλλιέργεια να μεγαλώσει έως ότου η απορρόφηση στα 600 να φθάσει περίπου στο 0.4
- Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 10min
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε διάλυμα **TFBI** όγκου ίσο με τον μισό όγκο του αρχικού διαλύματος (25 ml)
- Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 min
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2ml **TFBII** (1/25 του αρχικού όγκου)
- Αφήνουμε για 60 min στον πάγο
- Μοιράζουμε από 200 μl σε σωληνάκια μικροφυγόκεντρου και αποθηκεύουμε στους -80°C

TYM: 2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0.1M NaCl, 10mM MgSO_4 , αποστείρωση

TFB-I: 30mM CH_3COOK , 50mM MnCl_2 , 100mM KCl, 10mM CaCl_2 , 15% Glycerol, pH 7.0, φιλτράρισμα

TFB-II: 10mM MOPS, 75mM CaCl_2 , 10mM KCl, 20% Glycerol, pH 7.0, φιλτράρισμα

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*)

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούμε 200 μl *E. Coli* δεκτικών κυττάρων και πλασμιδιακό DNA. Τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται συνεχώς στον πάγο.

- Προσθέτουμε το πλασμιδιακό DNA στα δεκτικά κύτταρα
- Αφήνουμε στον πάγο για 30 min
- Μεταφέρουμε στους 42⁰C για 1 min και μετά ξανά στον πάγο
- Προσθέτουμε 800 μl διαλύματος LB
- Επωάζουμε στους 37⁰C για 60 min
- Φυγοκεντρούμε για 15 sec
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο εκτός από 100 μl στα οποία επαναδιαλύουμε το ίζημα
- Απλώνουμε σε τρυβλία LB με αντιβιοτικό επιλογής (Αμπικιλίνη) και επωάζουμε στους 37⁰C overnight

Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος pJ69-4A που περιείχε το πλασμίδιο pGBT9 που προσδίδει στα κύτταρα τη δυνατότητα παραγωγής τρυπτοφάνης για αντιδράσεις μετασχηματισμού με το πλασμίδιο pVP16 που προσδίδει στα κύτταρα τη δυνατότητα παραγωγής λευκίνης

- Επιμολύνουμε 10 ml διαλύματος SC Trp⁻ με το παραπάνω στέλεχος σακχαρομύκητα και επωάζουμε την καλλιέργεια στους 30⁰C όλη τη νύχτα
- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια (σε μήκος κύματος $\lambda = 600$ nm) και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε 100 ml διαλύματος YPD ώστε η τελική απορρόφησή της να είναι 0.2
- Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 30⁰C μέχρι η απορρόφηση να φθάσει περίπου στο 0.8
- Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 4000 rpm
- Επαναδιαλύουμε σε 1 ml CH₃COOLi 100 mM
- Φυγοκεντρούμε για 15 sec
- Προσθέτουμε στο ίζημα τα παρακάτω αντιδραστήρια με τη σειρά που δίνονται:
 - 240 μl 50% (w/v) PEG 3350
 - 36 μl CH₃COOLi 1M
 - 50 μl DNA από σπέρμα σολομού (2 mg/ml)
 - x μl πλασμιδιακού DNA
 - 34 - x μl δις απεσταγμένο νερό
- Αφήνουμε για 30 min στους 30⁰C
- Αφήνουμε για 20 min στους 42⁰C
- Φυγοκεντρούμε για 10 sec στις 12000 rpm
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 150 μl δις απεσταγμένο νερό
- Απλώνουμε σε τρυβλία SC Leu⁻Trp⁻ και επωάζουμε για 2 – 4 ημέρες στους 30⁰C

Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων με τη χρήση μικροφυγόκεντρου (Nucleotide Removal Kit Protocol της QIAGEN)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ραδιοσημασμένων τμημάτων DNA και ολιγονουκλεοτιδίων ? 17 νουκλεοτιδίων.

- Προσθέτουμε 10 όγκους PN Buffer σε έναν όγκο δείγματος και αναμιγνύουμε
- Μεταφέρουμε το δείγμα σε στήλη φυγοκέντρωσης κάτω από την οποία έχει τοποθετηθεί σωληνάκι των 2ml και φυγοκεντρούμε για 1min στις 6000rpm
- Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 500μl PE Buffer
- Φυγοκεντρούμε για 1min στις 6000 rpm και απορρίπτουμε το έκλουσμα
- Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο στάδιο
- Φυγοκεντρούμε για 1min στις 13000 rpm
- Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάκι φυγοκέντρωσης (1.5 ml)
- Προσθέτουμε 20 μl δις απεσταγμένο νερό και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm

Υβριδισμός πλασμιδιακού DNA με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό μεταξύ πλασμιδίων “δολωμάτων” και πλασμιδίων “λειών” (βλέπε εισαγωγή) που είχαν εισαχθεί σε κύτταρα E. coli T10. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε τμήμα του HIF-1α μεγέθους 1020 βάσεων (HE300 – βλέπε Υλικά). Για το λόγο αυτό, όσες αποικίες έδωσαν σήμα – υβριδίστηκαν- θεωρήθηκε ότι περιείχαν το πλασμίδιο “λεία” ενώ όσες δεν υβριδίστηκαν, θεωρήθηκαν πλασμίδια δολώματα.

I. Απομόνωση ανιχνευτή

Ο HE300 ήταν ενσωματωμένος στο πλασμιδιακό φορέα pGHE300 (βλέπε υλικά). Για την απομόνωσή του έγινε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI.

- Για αντίδραση όγκου 20 μl:

10 μl πλασμιδιακό DNA (1 μg/ μl)

0.5 μl EcoRI (10 u/ μl)

2 μl ρυθμιστικού διαλύματος EcoRI (10x)

12.5 μl ddH₂O

- Επωάζουμε για δύο ώρες στους 37⁰C
- Ηλεκτροφορούμε σε πηκτή αγαρόζης 1% (βλέπε άνωθεν)
- Ποσοτικοποιούμε το τμήμα που μας ενδιαφέρει
- Απομονώνουμε από την πηκτή το τμήμα που μας ενδιαφέρει και το καθαρίζουμε με τη μέθοδο Gel Extraction της QIAGEN (βλέπε άνωθεν)

II. Σήμανση ανιχνευτή

Για τη σήμανση του ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκαν νουκλεοτίδια (κυτοσίνες) σημασμένα με ραδιενεργό φώσφορο ([α-³²P] dNTP, 50 μCi, 3000 Ci/ mmol)

- Χρησιμοποιούμε 1 μl DNA (HE300 – 25 ng/ μl)
- Προσθέτουμε 29 μl ddH₂O
- Μεταφέρουμε στους 95⁰C για 2 min
- Προσθέτουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- 10 μl Labeling Buffer (5x)
- 2 μl dNTPs (A, T, G) 0.5 mM
- 2 μl BSA (10 μg/ μl)

- 5 μl [α - 32 P] dNTP
- 1 μl Klenow (5 u/ μl)

- Επιάζουμε στους 37⁰C για 30 min
- Μεταφέρουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Μεταφέρουμε στους 95⁰C για 2 min
- Προσθέτουμε 2 μl EDTA 0.5 M
- Απομονώνουμε τα σημασμένα τμήματα με το πρωτόκολλο Nucleotide Removal Kit Protocol της QIAGEN (βλέπε άνωθεν)

III. Προετοιμασία αποικιών

Οι αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό κυττάρων E.coli T10 με τα ζεύγη πλασμιδίων που είχαν απομονωθεί από κύτταρα σακχαρομύκητα (βλέπε σκοπό) μεταφέρθηκαν σε πέντε τρυβλία LB Amp (20 το πολύ αποικίες από κάθε δείγμα). Οι αποικίες επιάστηκαν στους 37⁰C όλη τη νύχτα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες όπου έγινε η κατήλωση του DNA:

- Τοποθετούμε τις μεμβράνες για 5 min σε διάλυμα SDS 10%
- Μεταφέρουμε σε διάλυμα NaOH 0.5M - NaCl 1.5M για 5 min
- Μεταφέρουμε σε διάλυμα Tris-Cl 0.5M - NaCl 1.5M για 5 min
- Ξεπλένουμε σε διάλυμα 2 x SSC για 10 min
- Μεταφέρουμε για 5 min στο υπεριώδες

SSC (20x): NaOH 3M – Κιτρικό Νάτριο 0.5M

IV. Υβριδισμός

- Τοποθετούμε τις μεμβράνες σε ειδικό κύλινδρο
- Προσθέτουμε το διάλυμα υβριδισμού **C&G (Church and Gilbert)**
- Τοποθετούμε στους 65⁰C για 10 min
- Προσθέτουμε 12 ml διαλύματος C&G στον ανιχνευτή και μεταφέρουμε το μίγμα στον κύλινδρο
- Αφήνουμε στους 65⁰C overnight

C&G: 0.25 M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS, pH 7.2

V. Εμφάνιση

Ξεπλένουμε τις μεμβράνες με **διάλυμα πλυσίματος**

Τοποθετούμε τις μεμβράνες σε κασέτα και καλύπτουμε με φιλμ

Αφήνουμε στους -80⁰C για 12 ώρες

Εμβαπτιζουμε για 5 min σε διάλυμα εμφάνισης (developer solution της Kodak)

Εμβαπτιζουμε για 5 min σε διάλυμα σταθεροποίησης (fixer solution της Kodak)

Διάλυμα πλυσίματος: 20mM Na₂HPO₄, 1% SDS, 1mM EDTA

Ταυτοποίηση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε πλασμιδιακό DNA (sequencing)

Η εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων κατά Sanger από το Μικροβιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΔΟΛΩΜΑΤΩΝ (HIF-1α) ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΛΕΙΩΝ (cDNAs)

Όπως προαναφέρθηκε, (Σκοπός, σελ. 14) κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ ζευγών πλασμιδίων τα οποία είχαν απομονωθεί από κύτταρα σακχαρομύκητα. Κάθε ζεύγος, αποτελείται από ένα πλασμίδιο που περιέχει τμήμα της αλληλουχίας του HIF-1α (πλασμίδιο "δόλωμα") και ένα πλασμίδιο με cDNA κλώνο από βιβλιοθήκη ποντικού (πλασμίδιο "λεία"). Τα πλασμίδια είχαν εισαχθεί στα κύτταρα του σακχαρομύκητα με σκοπό να ελεγχθεί, με τη μέθοδο των δύο υβριδίων, αν ο HIF-1α αλληλεπιδρά με κάποιες από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα cDNAs. Για τον διαχωρισμό των πλασμιδίων που περιέχονταν στα επιλεγμένα με τη μέθοδο των δύο υβριδίων στελέχη, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Η πρώτη βασιζόταν στην αυξοτροφία που θα προσέδιδαν σε κύτταρα *E. coli* τα πλασμίδια αυτά και η δεύτερη στον υβριδισμό του πλασμιδιακού DNA με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή που ανιχνεύει τον HIF-1α και άρα μόνο το πλασμίδιο "δόλωμα". Και οι δύο μέθοδοι αποτελούνται ουσιαστικά από τρία μέρη με τα δύο να είναι κοινά. Στο πρώτο μέρος μετασχηματίζουμε βακτηριακά κύτταρα με τα ζεύγη πλασμιδίων που έχουμε να διαχωρίσουμε και στο τρίτο μετασχηματίζουμε κύτταρα σακχαρομύκητα με υποψήφια πλασμίδια λείες για να πιστοποιήσουμε την ύπαρξη αλληλεπίδρασης. Η μόνη διαφορά έγκειται στο δεύτερο στάδιο όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των πλασμιδίων.

I. Διαχωρισμός πλασμιδίων βάσει αυξοτροφίας

1) Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με τα πλασμιδιακά ζεύγη (rescue)

Το πλασμίδιο (pGBT9) στο οποίο είχε εισαχθεί ο HIF-1α περιέχει γονίδιο που προσδίδει αυξοτροφία στην τρυπτοφάνη ενώ αυτό στο οποίο είχαν εισαχθεί τα cDNAs (pVP16), γονίδιο που προσδίδει αυξοτροφία στη λευκίνη. Με τα πλασμίδια αυτά μετασχηματίσαμε (βλέπε πίνακα 2) κύτταρα *E. coli* KC8 (L, W, U, H) –κάθε κύτταρο προσλαμβάνει ένα μόνο πλασμίδιο- και επιστρώσαμε σε τρυβλία LBamp.

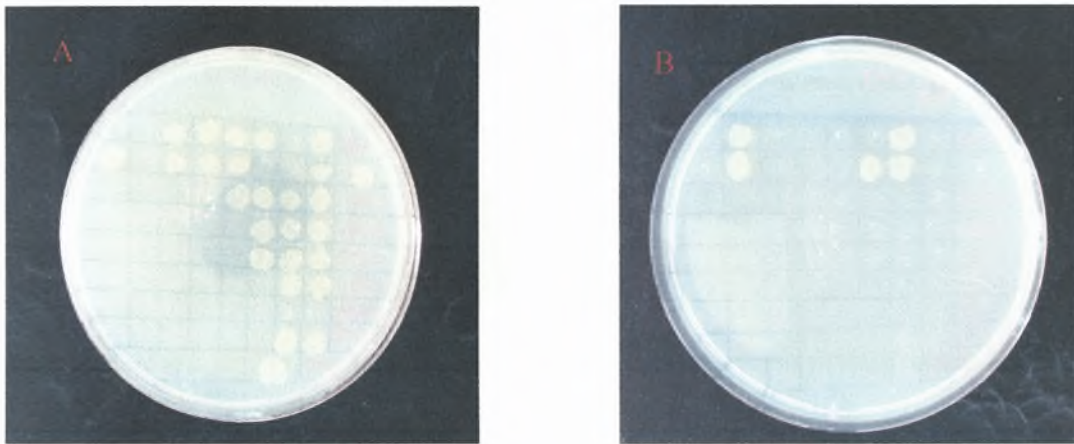
Πλασμίδιο "δόλωμα"	Πλασμίδιο "λεία"	Αποικίες
pGHS	Δ_1A_2	39
pGHS	Δ_2B_3	4
pGHS	Δ_2B_4	3
pGHS	Δ_1A_5	3
pGHS	Δ_1B_2	2
pGHS	Δ_2A_4	2
pGHS	Δ_1B_3	2
pGHS	Δ_1B_1	1

*Πίνακας 2: Αποτελέσματα μετασχηματισμού κυττάρων *E. coli* KC8 με τα ζεύγη πλασμιδίων (rescue).*

2) Μεταφορά αποικιών σε τρυβλία M9

Για να διαχωριστούν οι αποικίες που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο "δόλωμα" από αυτές που είχαν προσλάβει τα πλασμίδια λείες, κάθε αποικία (στην πρώτη περίπτωση που προέκυψαν 39 αποικίες, μεταφέρθηκαν οι είκοσι) μεταφέρθηκε σε δύο τρυβλία. Το πρώτο ήταν M9⁺Leu⁺Ura⁺His και στο οποίο αναμενόταν να μεγαλώνουν μόνο οι αποικίες που περιείχαν το πλασμίδιο "δόλωμα". Το δεύτερο ήταν M9⁺Trp⁺Ura⁺His και αναμενόταν να μεγαλώνουν οι αποικίες με τα πλασμίδια "λείες".

Σημείωση: Το θρεπτικό μέσο M9, σε αντίθεση με το LB, δεν περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός αυτό και προσθέτοντας όσα από αυτά τα συστατικά είναι απαραίτητα κάθε φορά μπορούμε να διαχωρίσουμε κύτταρα με διαφορετικές πρωτοτροφίες.



Εικόνα 15 : A: Τρυβλία M9⁺Leu⁺Ura⁺His. Αναμένεται να αναπτυχθούν μόνο οι αποικίες που περιέχουν το πλασμίδιο "δόλωμα" που προσδίδει αυξοτροφία στην τρυπτοφάνη. B. Τρυβλία M9⁺Trp⁺Ura⁺His. Αναμένεται να αναπτυχθούν μόνο οι αποικίες που περιέχουν το πλασμίδιο "λεία" που προσδίδει αυξοτροφία στη λευκίνη. Από πάνω προς τα κάτω έχουμε τα δείγματα: Δ₁A₂, Δ₂B₃, Δ₂B₄, Δ₁A₅, Δ₁B₂, Δ₂A₄, Δ₁B₃, Δ₁B₁

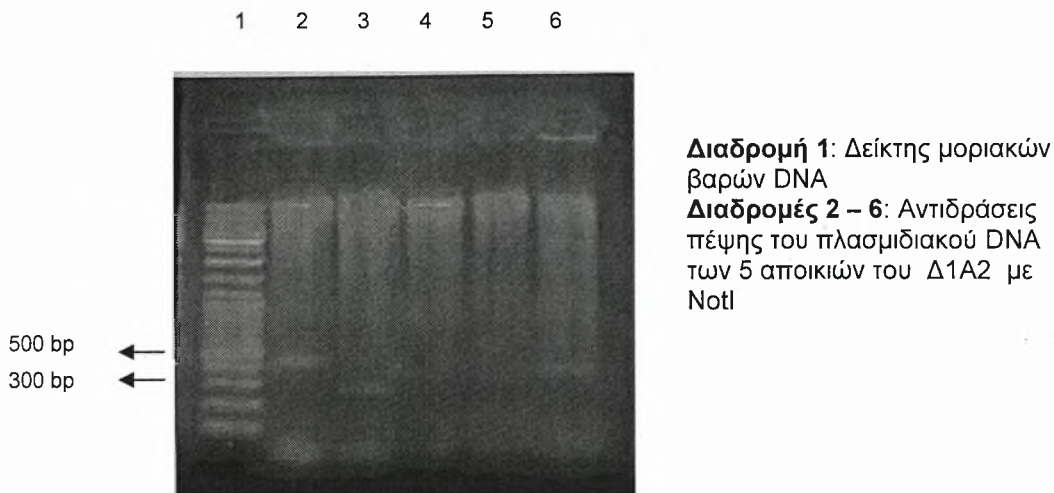
3) Αποτελέσματα

Αντίθετα με τα αναμενόμενα, σαφή αποτελέσματα πήραμε μόνο για ένα πλασμίδιο "λεία", το Δ₁A₂, όπου οι αποικίες που αναπτυσσόταν στο ένα τρυβλίο δεν αναπτυσσόταν στο άλλο και αντίστροφα. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις υπήρξαν αποικίες που δεν μεγάλωσαν σε κανένα τρυβλίο και αποικίες που περιείχαν μόνο το πλασμίδιο "δόλωμα" (το τελευταίο αποτέλεσμα ήταν λίγο πολύ αναμενόμενο γιατί ενώ θεωρητικά το 50% των αποικιών κάθε ζεύγους πλασμιδίων πρέπει να περιέχει το πλασμίδιο "δόλωμα" και το υπόλοιπο 50% το πλασμίδιο "λεία", στην πράξη ισχύει μια σχέση 6 προς 1 υπέρ του πλασμιδίου δολώματος βάσει προηγούμενης πείρας του εργαστηρίου).

4) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI

Για να πιστοποιήσουμε ότι οι αποικίες του ζεύγους Δ₁A₂ που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία χωρίς λευκίνη περιείχαν το πλασμίδιο pVP16 με κάποιο cDNA απομονώσαμε αρχικά το πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο "χρήση διαλυμάτων" (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 25). Το απομονωθέν DNA επαναδιαλύθηκε σε 20μl dd

H₂O. Δέκα μl από το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI ώστε να πιστοποιηθεί η ύπαρξη ενθέματος. Η συγκεκριμένη ενδονουκλεάση χρησιμοποιήθηκε επειδή όλα τα cDNAs της βιβλιοθήκης έχουν εντεθεί στη θέση NotI του Multiple Cloning Site (MCS) του φορέα pVP16. Τα ενθέματα αναμένεται να έχουν μέγεθος από 350 ως 700 bp λόγω του τρόπου κατασκευής της βιβλιοθήκης. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (βλέπε Μέθοδοι, σελ.22).



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% του πλασμιδιακού DNA που έχει απομονωθεί από τις Δ₁A₂ αποικίες και έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NotI.

Σύμφωνα με την εικόνα της πέψης υπάρχουν τρία διαφορετικά ενθέματα (450 bp στη διαδρομή 1, 300 bp στις διαδρομές 3 και 5 και 400 περίπου bp έκτη) στις 5 αποικίες του Δ₁A₂. Το αποτέλεσμα αυτό δεν θεωρήθηκε φυσιολογικό αφού οι αποικίες από ένα ζεύγος πλασμιδίων έπρεπε να περιέχουν το ίδιο cDNA (όσες από αυτές περιείχαν το πλασμίδιο "λεία").

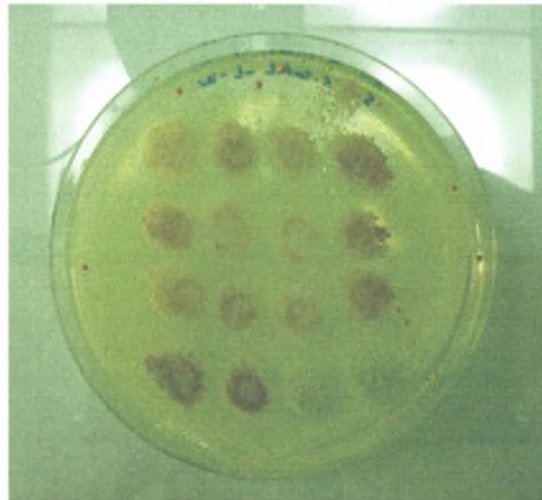
5) Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA και έλεγχος φαινοτύπου.

Για να εξακριβώσουμε αν κάποιο από τα απομονωθέντα πλασμίδια περιέχει πράγματι cDNA που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, μετασηματίσαμε με αυτά κύτταρα σακχαρομύκητα (pJ69-4A) που περιείχαν το πλασμίδιο pGHS (βλέπε Υλικά, σελ.20). Λόγω των διαφορετικών προτύπων που παρουσιάστηκαν με την ηλεκτροφόρηση, στον μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA που αντιστοιχούσε και στα τρία πρότυπα. Ο μετασηματισμός έγινε βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στις μεθόδους (σελ 26).

Κατά τον έλεγχο φαινοτύπου, οι αποικίες που προέκυψαν από το μετασηματισμό μεταφέρθηκαν σε τρυβλία SC-Leu-Trp+X-Gal, SC -Ade-Leu-Trp και SC -Ade-His-Leu-Trp+AT (με αυξανόμενη συγκέντρωση AT). Το AT (3-αμινοτριαζόλη) είναι συναγωνιστικός αναστολέας του βιοσυνθετικού ενζύμου της ιστιδίνης (HIS3). Σε περίπτωση που ο HIF-1α αλληλεπιδρούσε με το πεπτίδιο που κωδικοποιεί το cDNA των απομονωθέντων πλασμιδίων θα ενεργοποιούνταν η

μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς και θα προέκυπταν αποικίες με τους αντίστοιχους φαινότυπους. Εν τούτοις, οι φαινότυποι που προέκυψαν έδειξαν ότι τα γονίδια αναφοράς δεν ενεργοποιήθηκαν κάτι που υποδηλώνει ότι δεν υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και του πεπτιδίου για το οποίο κωδικοποιεί το ένθεμα του πλασμιδίου "λειά".

Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση της πρώτης μεθόδου για την ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α δεν έδωσε αποτελέσματα και αυτό οφείλεται πιθανά στο μικρό αριθμό βακτηριακών αποικιών που προέκυπτε από τον μετασχηματισμό με τα εκχυλίσματα των κυττάρων σακχαρομύκητα. η μικρή απόδοση μετασχηματισμού είναι μια ιδιαιτερότητα του στελέχους KC8 το οποίο όμως είναι το μόνο που περιέχει αυξοτροφίες και επιτρέπει τον διαχωρισμό των δύο ειδών πλασμιδίων με απλή ανάπτυξη σε συγκεκριμένα μέσα. προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ένα άλλο στέλεχος με μεγαλύτερη απόδοση μετασχηματισμού (Top10) έπρεπε να χρησιμοποιήσουμε άλλο τρόπο διαχωρισμού μεταξύ των δύο πλασμιδίων και επιλέχθηκε η μέθοδος ανίχνευσης με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.



Εικόνα 17: Ενδεικτική εικόνα από τον έλεγχο φαινότυπου με τρυβλία SC Leu⁻Trp X-Gal. Οι αποικίες παρουσία X-Gal δεν χρωματίστηκαν πράσινες γεγονός που υποδηλώνει την μη ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς.

II. Διαχωρισμός πλασμιδίων με τη χρήση ραδιοσημασμένου ανιχνευτή.

1) Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli με τα πλασμιδιακά ζεύγη (resque)

Όπως και στη μέθοδο του διαχωρισμού βάσει αυξοτροφίας, το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε το μετασχηματισμό κυττάρων E. coli Top10 με τα ζεύγη των απομονωθέντων πλασμιδίων (βλέπε πίνακα 3). Το στέλεχος T10 είναι πιο δεκτικό σε μετασχηματισμό από το στέλεχος KC8 αλλά δεν παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των αποικιών βάσει αυξοτροφίας.

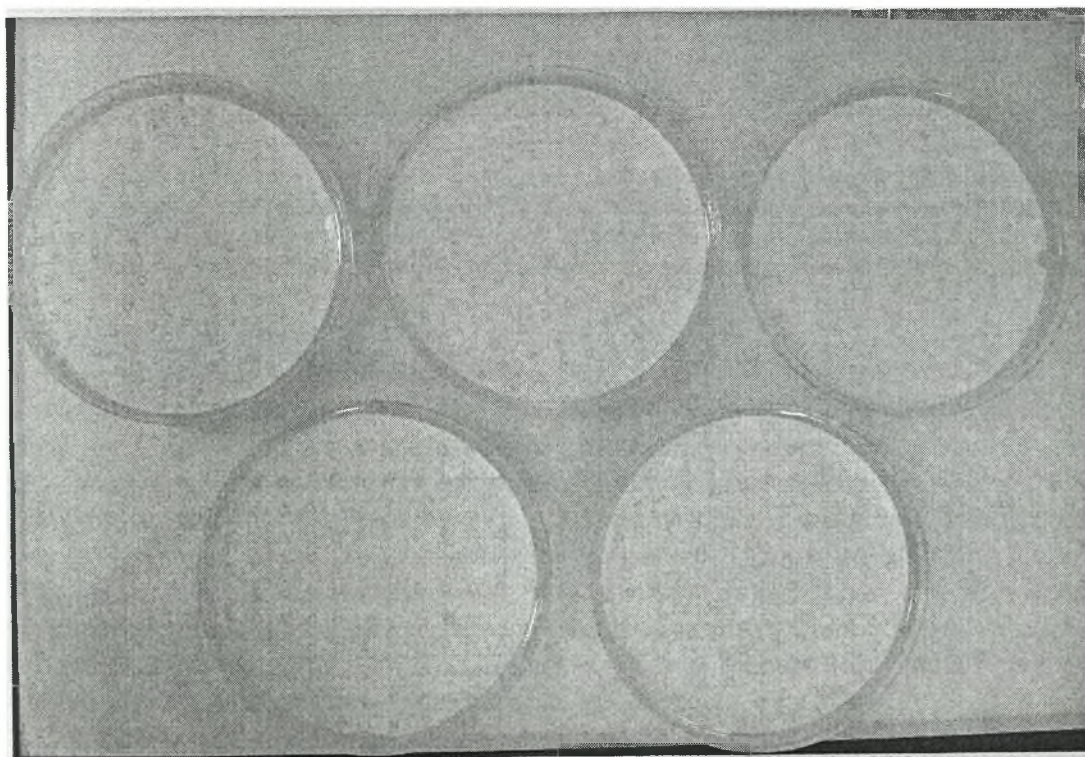
Πλασμίδιο "δόλωμα"	Πλασμίδιο "λειά"	Αποικίες	Πλασμίδιο "δόλωμα"	Πλασμίδιο "λειά"	Αποικίες
pGHS	Δ_2B_4	145	pGHS	M_2B_5	16
pGHS	Δ_2A_1	32	pGHS	M_3B_1	71
pGHS	Δ_2A_4	91	pGHS	X_1A_5	12
pGHS	$\Delta_2\Delta_3$	32	pGHS	X_1A_1	35

pGHS	Δ_2B_1	36	pGHE300	1α13?	23
pGHS	$\Delta_2\Delta_1$	17	pGHE300	4d	23
pGHS	$\Delta_2\Gamma_3$	107	pGHE300	5d	10
pGHS	$\Delta_2\Delta_4$	41	pGHE300	2d	29
pGHS	M_2A_1	43	pGHE300	2e	19
pGHS	Δ_1B_3	11	pGHE300	2f	30
pGHS	$M_2\Delta_1$	31	pGHE300	3e	35
pGHS	M_1A_1	197	pGHE300	5b	173
pGHS	M_2Z_1	9	pGHE300	1c	11

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετασχηματισμού κυττάρων *E. coli* Top10 με τα ζεύγη πλασμιδίων.

2) Υβριδισμός πλασμιδιακού DNA αποικιών με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή

Οι αποικίες που προέκυψαν από τους μετασχηματισμούς μεταφέρθηκαν αριθμημένες σε νέα τρυβλία LBamp. Από κάθε ζεύγος πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν 20 το πολύ αποικίες και προέκυψαν έτσι πέντε τρυβλία (εικ. 18). Αφού αναπτύχθηκαν όλη τη νύχτα στους 37°C, οι αποικίες μεταφέρθηκαν σε ειδικές μεμβράνες στις οποίες θα γινόταν ο υβριδισμός (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 27).

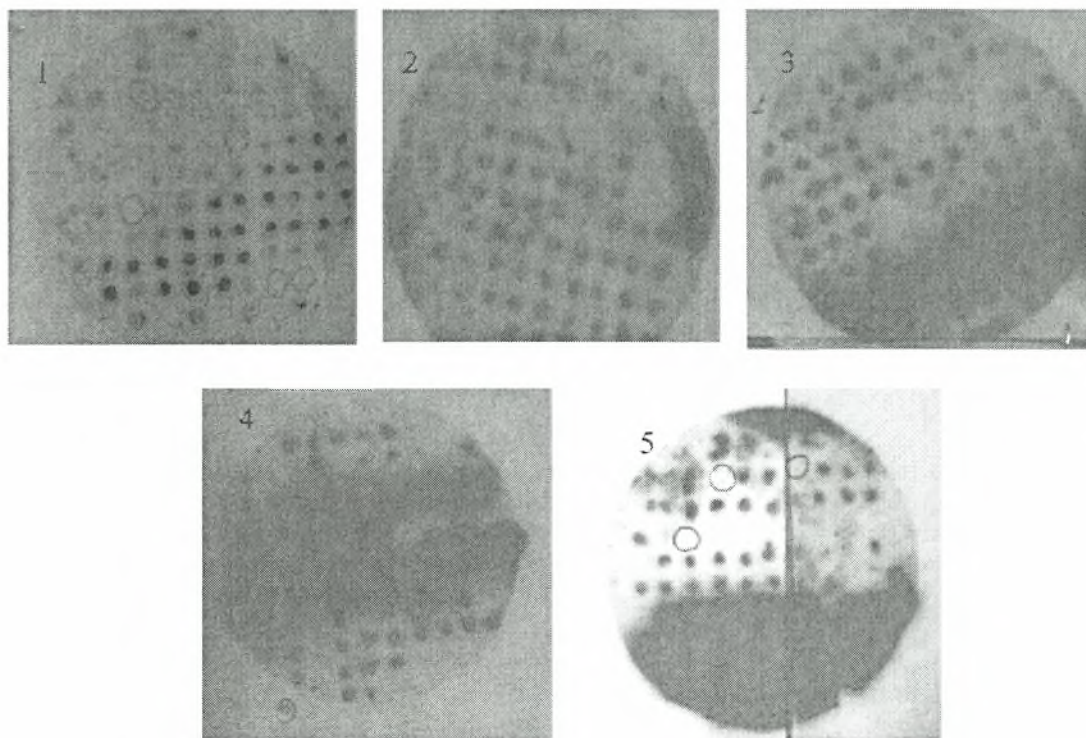


Εικόνα 18: Οι πέντε μεμβράνες με τις αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* T10 με τα πλασμιδιακά ζεύγη. Από αριστερά προς δεξιά έχουμε τις μεμβράνες 1, 2, 3, 4, 5 αντίστοιχα.

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το τμήμα HE300 του HIF-1α μεγέθους 1020 bp (βλέπε Υλικά, σελ. 16). Το τμήμα αυτό παρουσιάζει μεγάλη αλληλεπικάλυψη (86 bp)

με το τμήμα HS οπότε δεν θεωρήθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικοί ανιχνευτές. Λόγω της φύσης του ανιχνευτή, όσες από τις αποικίες περιείχαν το πλασμίδιο "δόλωμα" θα υβριδίζοταν με αυτόν ενώ όσες περιείχαν πλασμίδιο "λεία" όχι.

Η εικόνα που προέκυψε μετά την εμφάνιση ήταν η ακόλουθη:



Εικόνα 19: Η εικόνα των μεμβρανών μετά τον υβριδισμό και την εμφάνιση του φιλμ. Από αριστερά προς δεξιά έχουμε τις μεμβράνες 1, 2, 3, 4, 5. Επειδή ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το τμήμα HE300 οι αποικίες με αυτό το "δόλωμα" εμφανίζονται πιο σκούρες από αυτές που είχαν για "δόλωμα" το τμήμα HS. Σε κύκλο σημειώνονται μερικές από τις αποικίες που θεωρήθηκε ότι έδιναν αρνητικό σήμα στον υβριδισμό.

3) Έλεγχος αποτελεσμάτων υβριδισμού

Θεωρητικά, κάθε αποικία που δεν θα έδινε σήμα στον υβριδισμό θα περιείχε πλασμίδιο "λεία". Για να εξακριβωθεί το κατά πόσο τα αποτελέσματα του υβριδισμού ήταν αξιόπιστα έγινε απομόνωση και πέψη του πλασμιδιακού DNA των αποικιών αυτών με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη μέθοδο "χρήση διαλυμάτων" (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 25). Στις περιπτώσεις που η πέψη επιβεβαίωσε τον υβριδισμό ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα (στέλεχος pJ69-4A) με το εκάστοτε πλασμιδιακό DNA "λεία" για να γίνει η επιβεβαίωση φαινοτύπου (η διαδικασία περιγράφεται στα Αποτελέσματα, μέρος A, σελ 31 - 32).

Πλασμίδιο "δόλωμα"	Πλασμίδιο "λεία"	Αποικίες προς έλεγχο (a)	Αποικίες με πλασμίδιο "λεία" (b)	Αποικίες σακχαρομύκητα (c)
pGHS	Δ_2B_4	2	1	OXI
pGHS	Δ_2A_1	2	1	OXI
pGHS	Δ_1B_3	4	1	OXI

pGHS	$\Delta_2\Delta_3$	1	-	
pGHS	Δ_2B_1	2	-	
pGHS	$\Delta_2\Gamma_3$	2	-	
pGHS	M_1A_1	3	-	
pGHS	M_2B_5	2	2	OXI
pGHS	X_1A_5	2	2	NAI
pGHE300	1a13?	2	2	NAI
pGHE300	2d	3	2	NAI
pGHE300	2f	3	2	NAI
pGHE300	3e	2	2	OXI
pGHE300	5b	2	2	NAI

a: Αποικίες που δεν δίνουν σήμα στον υβριδισμό

b: Αποικίες στις οποίες επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του πλασμιδίου "λεία" έπειτα από πέψη με τις ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII

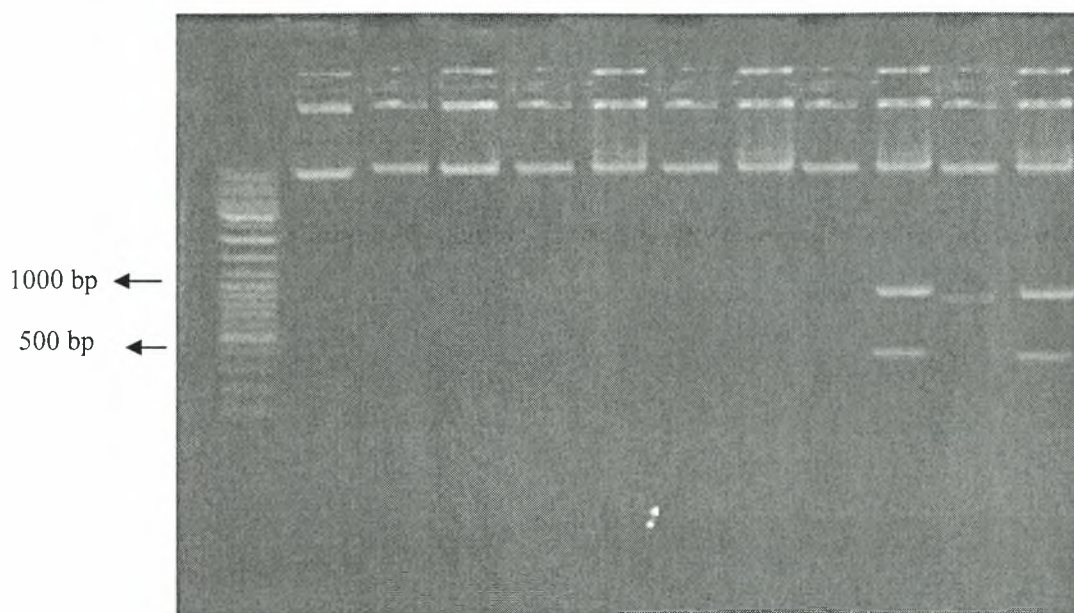
c: Αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα με το εκάστοτε πλασμίδιο "λεία"

Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα του υβριδισμού των μετασχηματισμένων αποικιών και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων. Η ύπαρξη αρνητικών αποτελεσμάτων κατά τον έλεγχο ύπαρξης του πλασμιδίου "λεία" οφείλεται στο ότι η εικόνα του υβριδισμού στις περιπτώσεις αυτές ήταν διφορούμενη. Οι περιπτώσεις όπου μετά το μετασχηματισμό στα κύτταρα σακχαρομύκητα δεν προέκυψαν αποικίες θα συζητηθούν στη συνέχεια.

α) Πέψη πλασμιδιακού DNA υποψήφιων "λειών"

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του πλασμιδίου "λεία" στις αποικίες που εμφανιζόταν να μη δίνουν σήμα στον υβριδισμό έγινε πέψη με τις ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII. Οι ενδονουκλεάσες αυτές αναγνωρίζουν θέσεις εκατέρωθεν του MCS του φορέα pVP16 έτσι ώστε μετά από πέψη του φορέα με τα ένζυμα αυτά να προκύπτει θραύσμα 300 bp. Εφόσον υπάρχει ένθεμα στο MCS, το μέγεθος του οποίου θα κυμαίνεται από 350 ως 750 bp (λόγω τρόπου κατασκευής βιβλιοθήκης), το θραύσμα που θα προκύψει θα έχει ανάλογα αυξημένο μέγεθος (σε περίπτωση που η αλληλουχία του cDNA που περιείχαν τα πλασμίδια λείες περιείχε θέσεις που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα αυτά, θα προέκυπταν περισσότερες ζώνες). Σύμφωνα με τον πίνακα ελέγχθηκαν αποικίες από δώδεκα ζεύγη πλασμιδίων και βρέθηκε πλασμίδιο "λεία" σε δέκα από αυτές.

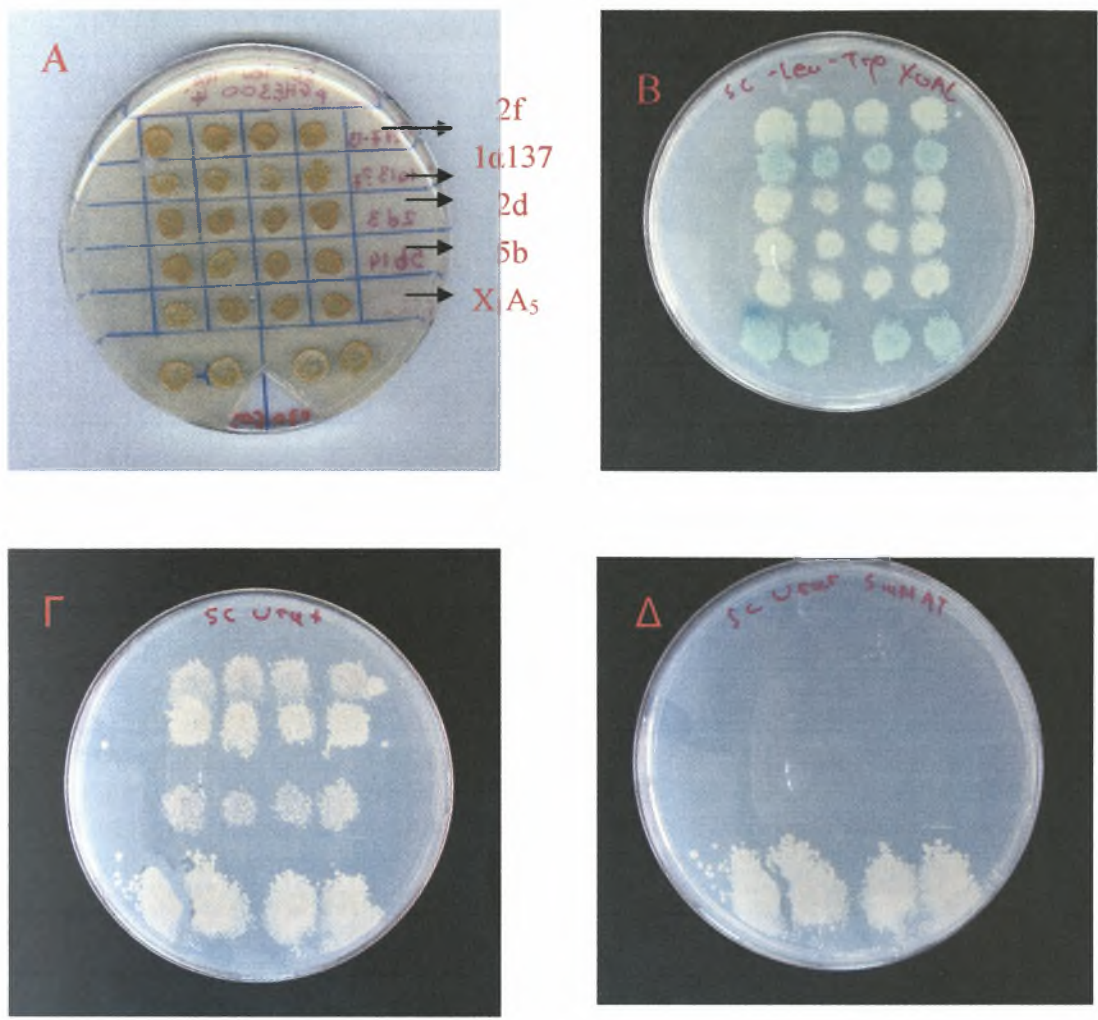
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Εικόνα 20: Συγκεντρωτική εικόνα των πέψεων των υποψήφιων πλασμιδίων "λειών" που έδωσαν θετικά αποτελέσματα, με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII. Το μόνο παράδοξο παρατηρείται στις διαδρομές 9 και 10 όπου υποψήφια πλασμίδια λείες από το ίδιο ζεύγος πλασμιδίων δίνουν διαφορετικά πρότυπα. Και στα δύο δείγματα έγινε έλεγχος φαινοτύπου και ονομάστηκαν για λόγους ευκολίας 1a13 7 και 1a13 9 αντίστοιχα. Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA, 2: 2d, 3: 2f, 4: Δ₂B₄, 5: X₁A₅, 6: Δ₁B₃, 7: Δ₂A₁, 8: M₂B₅, 9: 1a13 7, 10: 1a13 9, 11: 5b, 12: 3e

β) Έλεγχος φαινοτύπου

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA που δεν έδωσε σήμα στον υβριδισμό είχε ως αποτέλεσμα την εύρεση έντεκα δειγμάτων που θα μπορούσαν να αποτελούν πλασμίδια λείες. Με το DNA μετασηματίστηκαν κύτταρα σακχαρομύκητα του στελέχους ρJ69-4A (βλέπε Υλικά, σελ. 20 και Σκοπός, σελ. 14). Όπως φαίνεται και στον πίνακα 4, αποικίες προέκυψαν μόνο σε πέντε περιπτώσεις (5b, 2f, 1a13 7, 2d, X₁A₅). Το επόμενο βήμα ήταν η μεταφορά των αποικιών αυτών σε τρυβλία με X-Gal, τρυβλία χωρίς αδενίνη και ιστιδίνη και τρυβλία με αυξανόμενη συγκέντρωση αμινοτριαζόλης (χωρίς αδενίνη και ιστιδίνη) ώστε να ελεγχθεί το κατά πόσο ενεργοποιούνταν τα γονίδια αναφοράς που περιείχαν τα κύτταρα του σακχαρομύκητα (βλέπε Αποτελέσματα, μέρος Α, σελ. 31 - 32 και Σκοπός, σελ 14). Στο τρυβλίο με το X-Gal, αλληλεπίδραση "λείας" και "δολώματος" θα είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μπλε χρώματος. Μετά από δύο ημέρες, μπλε χρώμα ήταν εμφανές μόνο στις αποικίες με τη "λεία" 1a137. Με την πάροδο έξι ημερών, μπλε χρώμα μικρότερης έντασης εμφανίστηκε τόσο στην πρώτη (2f) όσο και στην τέταρτη (5b) σειρά αποικιών. Στο τρυβλίο που δεν περιείχε αδενίνη και ιστιδίνη παρατηρήθηκε ανάπτυξη στην πρώτη, τη δεύτερη και την τέταρτη σειρά γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση των γονιδίων ADE2 και HIS3. Τέλος, στο τρυβλίο με την αμινοτριαζόλη δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών κάτι που υποδηλώνει ότι το γονίδιο HIS3 έχει ενεργοποιηθεί σε πολύ μικρό βαθμό.



Εικόνα 21 : Οι φαινότυποι που προέκυψαν κατά τον έλεγχο φαινοτύπου. Σε κάθε τρυβλίο έχουμε οριζόντια τέσσερις μετασηματισμένες αποικίες σακχαρομόκητα. Κάθε τετράδα περιέχει ένα από τα πέντε υποψήφια πλασμίδια "λείες". Συγκεκριμένα, από πάνω προς τα κάτω έχουμε αποικίες με τα πλασμίδια: 2f, 1a13 7, 2d, 5b, X₁A₅. Στην τελευταία γραμμή είναι τοποθετημένες αποικίες που περιέχουν πλασμίδιο λεία του οποίου το προϊόν (MgcRacGAP) αλληλεπιδρά ισχυρά με το προϊόν του ρGHS.

- A:** Οι αποικίες σε τρυβλία SC -Leu⁻Trp. Από το τρυβλίο αυτό οι αποικίες μεταφέρθηκαν στα τρυβλία στα οποία έγινε ο έλεγχος φαινοτύπου.
- B:** Τρυβλία SC -Leu-Trp+X-Gal. Αλληλεπίδραση "δολώματος" και "λείας" θα είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μπλε χρώματος
- Γ:** Τρυβλία SC -Leu-Trp-Ade-His.
- Δ:** Τρυβλία SC -Leu-Trp-Ade-His+AT.

4) Εύρεση των αλληλουχιών των ενθεμάτων που κωδικοποιούν τις υποψήφιες πρωτεΐνες λείες

Για τα τρία δείγματα που έδιναν εν μέρει την επιθυμητή εικόνα κατά τον έλεγχο φαινοτύπου αποφασίστηκε να γίνει έλεγχος της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Αρχικά έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα δείγματα με τη βοήθεια στήλης (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 24) και στη συνέχεια έγινε η αλληλούχιση με τη μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 28). Αποτελέσματα πήραμε για δύο από τα τρία δείγματα και συγκεκριμένα για τα 1a13 7 και 2f.

i) Για το δείγμα 1a13 7 η αλληλουχία ήταν:

```
1   ttaaTTATCA gGGGaCTTTA acTYtCCatC ttcTTCCAcT tCCACCcTtT
51  CTWGACCATT CTCAACGATT CTCTTgGTGG TGATTTTTTTT GCCATTAATt
101 ATTTTCGATGG AGGTTGACAC CGACTTGTAG TTGCCTGCCG CCCCACCaAC
151 GCAAGACATG GAGAAAGAAG AAAGGCCCTA GTTTCCTGGA GAACCGAAGA
201 ATGTGAATCC AGTATCTAAC GAAGCGAAGC CACCCCCAAA TCCTGGGAAT
251 TCGGTAAAGG AGGTAGAGAA GGGTACAGCC CctCGGCTTC TGCTTCCACG
301 GGTGCTCCTC CGATCCCCAA AAAAGTTCTC AAGGGGGTCT CCCCCGAAGA
351 AGTCGAAGGA GAAAGGGTCG TGGCCCCCGA AGAACTCCCT GAAGACCTCC
401 GCGGGGTCTC GGAAGGAGAA GACGTA CTGG AAGGCATCGT GGAACGGGCT
451 GCCCGTGAGC GGCCGC
```

ii) Για το δείγμα 2f η αλληλουχία ήταν:

```
1   ABVSAaagGa KABWHA tMka WCaYCCATTT ATHHYcatGG tCTtAACTGC
51  CCATCTTCTT CAWCTTCTAC TCTTTTWTGW WCGTTCTCCA CAATCCTCTT
101 TGTCGTGATT TTTTtKCCAT TAActATCTT AGTTGAAGTT GATAtTGATT
151 TGAAGTTGCC ctTTCCACTG CcGCCAaATG ACgTTGAAGA AAATGAAGTG
201 AGACCCCAT GACCTAGTGA CCCAaATGGA gTGAAGcCTG TaTCAAAAGC
251 AGGAaATCCA CTtCCAAAAG AAGGAAATCC ACTGAAGGTA GAGAaAAATG
301 AGCCGGcAcC TCGGCTTCTA TTTcCTCGGG GACCCCTTCG GTTTCCAAAA
351 AAGTCATCAA ATGGGTCTTC AAAGAAGTCA AATGAAAATG TGAGCGGCCG
401 C
```

Σημείωση 1: Γράμματα εκτός των τεσσάρων βάσεων του DNA υποδηλώνουν αβεβαιότητα κατά την ανάγνωση των αλληλουχιών.

Σημείωση 2: Με μπλε χρώμα επισημαίνεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση NotI με τη χρήση της οποίας είχε γίνει η εισαγωγή των cDNAs στον φορέα pVP16. Η δεύτερη θέση που αναγνωρίζει το ένζυμο βρίσκεται πολύ κοντά στο σημείο στο οποίο ξεκινά η αλληλούχιση με αποτέλεσμα να υπάρχει αβεβαιότητα κατά την ανάγνωσή του.

Κάθε αλληλουχία, με τη βοήθεια δικτυακών βάσεων δεδομένων, μεταφράστηκε δίνοντας έξι διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης. Από τα έξι πλαίσια ελέγχθηκαν (σε κάθε περίπτωση) για ομολογία με πρωτεΐνες μόνο τα τρία με φορά 3' - 5' αφού οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται κατά την αλληλούχιση «διαβάζουν» ανάποδα από τη φορά του ενθέματος.

- Για το δείγμα 1a13 7 τα πλαίσια ανάγνωσης ήταν:

3?- 5?Frame 1

AAAHGQPVPRCLPVRLLLPRPRGGLQGVLRGPRPFLLRLLRGRPP**Stop**ELFWGSE
 EHPWKQKPRGCTLLYLLYRIPRIWGWLRVRYWIHIFRFSRKLGPFFFLHVLRWWG
 GRQLQVGVNLHRN

3?- 5?Frame 2

RPLTGSPFHDAFQYVFSFRDPAEVFREFFGGHDPFSFDFFGGDPLENFFGDRRSTR
 GSRSRGAVPFSTSFTEFFPGFGGGFASLDTGFTSFGSPGNLGLSSFSMSCVGGAGN
 YKSVSTSIE

3?- 5?Frame 3

GRSRAARSTMPSTSSPSETPRRSSGSSSGATTLSPTSSGETPLRTFLGIGGAPV
 EAEAEGLYPSLPPLNSQDLGVASLR**Stop**ILDSHLSVLQETWAFLLSPCLALVGR
 QATTSRCQPPSK

Πίνακας 5: Τα τρία αναγνωστικά πλαίσια της αλληλουχίας του ενθέματος των πλασμιδίων 1a13 7. Οι ενδείξεις Stop αντιστοιχούν σε κωδικόνια λήξης και τα αμινοξέα RPLT σε αμινοξέα του πλασμιδιακού φορέα pVP16 γεγονός που υποδεικνύει το σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.

- Για το δείγμα 2f τα πλαίσια ανάγνωσης ήταν:

3?- 5?Frame 1

AAAHIFI**Stop**LL**Stop**RPI**Stop**StopLFWKPKGSPRK**Stop**KPRCRLIFLYLQW
 ISFFWKWISCF**Stop**YRLHSIWWTRSWGSHFIFFNVIWRQWKGLQININFN**Stop**
 DS**Stop**W**Stop**KNHD

3?- 5?Frame 2

RPLTFSFDFFEDPFDDFFGNRRGPRGNRSRGAGSFFSTFSGFPSFGSGFPAFDTGF
 TPFGLGHGGLTSFSSTSFGGSGKGNFKSISTSTKIVNGKKITT

3?- 5?Frame 3

GRSHFHLTSLKTHLMTFLETEGVPEEIEAEVPAHFSLPSVDLLELVDFLLLIQAS
 LHLGH**Stop**VMGVSLHFLQRHLAAVERATSNQYQLQLR**Stop**LMVKKSR

Πίνακας 6: Τα τρία αναγνωστικά πλαίσια της αλληλουχίας του ενθέματος των πλασμιδίων 2f 7. Οι ενδείξεις Stop αντιστοιχούν σε κωδικόνια λήξης και τα αμινοξέα RPLT σε αμινοξέα του πλασμιδιακού φορέα pVP16 γεγονός που υποδεικνύει το σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.

Για τα δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, αναζητήθηκαν σε βάσεις δεδομένων πρωτεΐνες με τις οποίες να παρουσιάζουν ομολογία.

- Για το δείγμα 1α13 βρέθηκε ότι παρουσιάζει πλήρη ομολογία με την DnaJB3 ή Heat shock protein J3 του Mus Musculus

 MVDYYEVLGVPRQASAEAIRKAYRKLALKWHPDKNPEHKEEAERRFKQVAQAYEVLSDVR

-----RPLTGSPPFHDAFQYVFSFRDPAEVFREFFGGHDPFSFDFFGGDP
 KREVDRCGEVGEVGGGGAAGSPFHDAFQYVFSFRDPAEVFREFFGGHDPFSFDFFGGDP
 :*****

LENFFGDRRSTRGSRSGAVPFSTSFTEFPFGGGFASLDTGFTSFGSPGNLGLSSFSME
 LENFFGDRRSTRGSRSGAVPFSTSFTEFPFGGGFASLDTGFTSFGSPGNSGLSSFSM-

TSCVGAAGNYKSVSTSI-----
 -SCGGAAGNYKSVSTSTEIINGKKITTKRIVENGQERVEVEEDGELKSLIINGREQLLR
 ** ***** *

 INTQ

- Για το δείγμα 2f βρέθηκε ότι ήταν ομόλογο (100% ομολογία) με την DnaJB6 ή Heat shock protein J2 (HSJ-2) του Mus Musculus

 MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKQALKWHPDKNPENKEEAERKFKQVAEAYEVLSDAK

-----RPLTF-----SFDFPEDPF
 KRDIYDKYKGEGLNGGGGGGIHFDSPFEFGFTFRNPDDVFREFFGGRDPFSFDFFEDPF
 * : * *****

DDFFGNRRGPRGNRSRGAGSFFSTFSGFPSFGSGFPAFDTGFTPFGSLGHGGLTSFSSTS
 DDFFGNRRGPRGNRSRGAGSFFSTFSGFPSFGSGFPAFDTGFTPFGSLGHGGLTSFSSTS

FGSGKGNFKSISTSTKIVNGKKITT-----
 FGSGMGNFKSISTSTKIVNGKKITTKRIVENGQERVEVEEDGQLKSLTINGKEHLLRLD

--
 NK

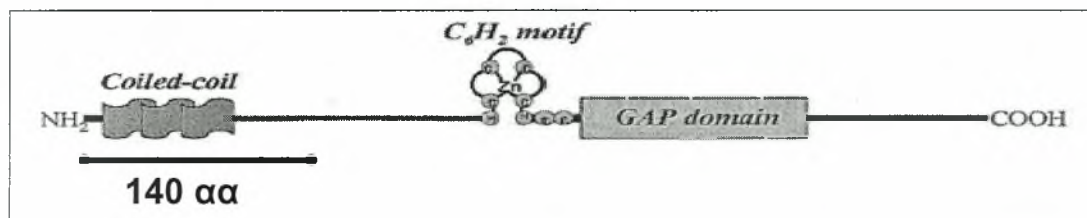
Σημείωση: και στις δύο περιπτώσεις η πρώτη σειρά αμινοξέων αντιστοιχεί στο δείγμα και η δεύτερη στην πρωτεΐνη με την οποία παρουσιάζει ομολογία. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις ταυτίσεις μεταξύ των δύο αλληλουχιών. Τυχόν διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων αλληλουχιών (κυρίως προς το τέλος των αλληλουχιών) οφείλονται σε λάθη κατά την αλληλούχιση

Συμπερασματικά, από τα τρία δείγματα για τα οποία έγινε προσπάθεια εύρεσης της αλληλουχίας τους, το εργαστήριο όπου έγινε η αλληλούχιση έδωσε αποτελέσματα για τα δύο. Από αυτά, το ένα (1α137) παρουσιάζει ομολογία με την Heat shock protein J3 του Mus Musculus ενώ το άλλο (2f), ομολογία με την Heat shock protein J2 (HSJ-2) του Mus Musculus που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την προηγούμενη.

Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MgcRacGAP ΜΕ ΤΟΝ HIF-1α

Η MgcRacGAP είναι μια ανθρώπινη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτοκίνησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kitamura *et al*, 2001). Για την ομόλογη πρωτεΐνη στο ποντίκι βρέθηκε, μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων, ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί το κατά πόσο η πρωτεΐνη αυτή (για την ακρίβεια τμήμα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στα 140 πρώτα αμινοξέα της-GAP140-) αλληλεπιδρά με τον HIF-1α *in vivo* με τη βοήθεια ενός απλού συστήματος. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στον σακχαρομύκητα και συγκεκριμένα στο στέλεχος RS453 στο οποίο είχαν εισαχθεί δύο πλασμίδια (βλέπε Υλικά, σελ. 18): Το πρώτο περιείχε τα γονίδια των HIF-1α και ARNT υπό τον έλεγχο υποκινητή που επάγεται από τη γαλακτόζη και το δεύτερο το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης ως γονίδιο αναφοράς ελεγχόμενο από υποκινητή στον οποίο περιέχονται έξι αλληλουχίες απόκρισης στην υποξία (HREs). Αλληλεπίδραση του HIF-1 με τα HREs έχει ως αποτέλεσμα αποικίες με μπλε χρώμα. Εισάγοντας στο σύστημα την MgcRacGAP και εφόσον αυτή εκφράζεται και αλληλεπιδρά με τον HIF-1α αναμένουμε μεταβολές στα επίπεδα της β-γαλακτοσιδάσης που θα αντικατοπτρίζονται στο χρώμα των αποικιών.

Για να εξακριβωθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης στο συγκεκριμένο σύστημα, έπρεπε αρχικά η GAP140 να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα που να προσδίδει αυξοτροφία σε κάποιο αμινοξύ εκτός των λευκίνη και τρυπτοφάνη αφού πλασμίδια που προσδίδουν αυξοτροφία σε αυτά τα αμινοξέα υπήρχαν ήδη στο σύστημα (βλέπε Σκοπό, σελ. 14 και Υλικά, σελ. 18. Κατά συνέπεια, ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε ο pBEVY-GU (βλέπε Υλικά, σελ. 19) που προσδίδει αυξοτροφία στην ουρακίλη.

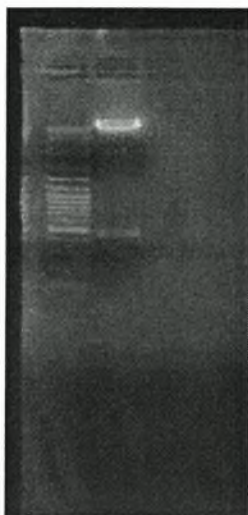


Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος της MgcRacGAP που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την εν λόγω πρωτεΐνη. Το τμήμα αυτό αποτελείται από 140 αμινοξέα ενώ ολόκληρη η πρωτεΐνη από 632.

1) Εξαγωγή της GAP140 από τον πλασμιδιακό φορέα pVP16

Η GAP140 υπήρχε κλωνοποιημένη στο πλασμιδιακό φορέα pVP16 και για να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα έπρεπε να εξαχθεί από τον φορέα αυτό. Για την πέψη του φορέα (20 μg) χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Για να επιβεβαιωθεί ότι το ένζυμο λειτούργησε, 10 μl από την αντίδραση της πέψης (συνολικός όγκος 150 μl) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%. Το ένθεμα είχε μέγεθος 420 bp.

420 bp ←



Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης του φορέα pVP16 που περιείχε την GAP 140 μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση NotI.

Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA

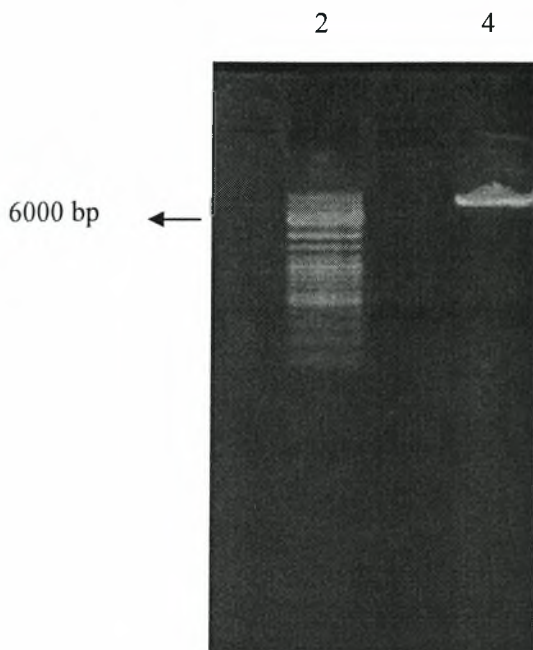
Διαδρομή 2: Αντίδραση πέψης του φορέα pVP16 - GAP με την ενδονουκλεάση NotI

2) Απομόνωση και καθαρισμός της GAP 140

Μετά την επιβεβαίωση της πέψης προστέθηκε στην αντίδραση το ένζυμο Klenow σε συνδυασμό με νουκλεοτίδια (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 24) ώστε να δημιουργηθούν τυφλά άκρα στην GAP 140 για να μπορέσει να εισαχθεί στον φορέα PBEVY-GU. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 1% και απομόνωση της GAP 140 με το Gel Extraction kit Protocol της QIAGEN (βλέπε Μέθοδοι, σελ 23). Το DNA που απομονώθηκε επαναδιαλύθηκε σε 25 μl ddH₂O.

3) Πέψη του πλασμιδιακού φορέα PBEVY-GU και αποφωσφορυλίωση των άκρων του

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10 μg πλασμιδιακού DNA και είχε όγκο 100 μl. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SmaI η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα. Για να επιβεβαιώσουμε ότι το ένζυμο λειτούργησε ηλεκτροφορήσαμε 5 μl από την αντίδραση σε πηκτή αγαρόζης 1%.



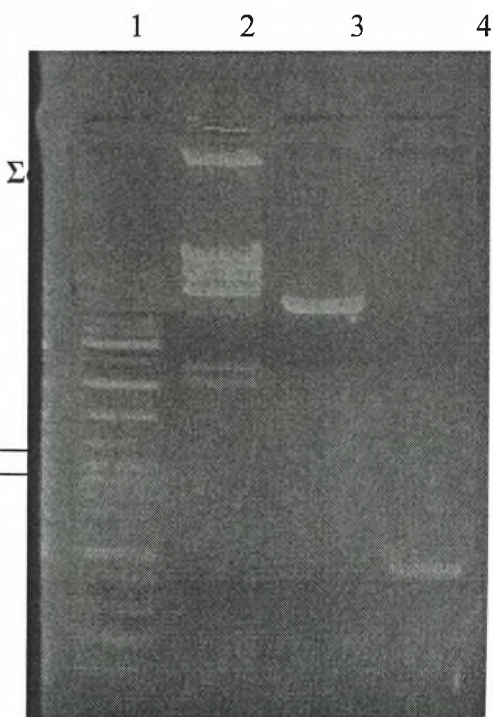
Εικόνα 24: Ο φορέας pBEVY-GU έπειτα από πέψη με το ένζυμο SmaI. Το γεγονός ότι μεταναστεύει ως μια μπάνα υποδηλώνει ότι το ένζυμο έχει λειτουργήσει.

Διαδρομή 2: Δείκτης μοριακών βαρών DNA
 Διαδρομή 4: Ο φορέας pBEVY-GU έπειτα από πέψη με την ενδονουκλεάση SmaI

Μετά την επιβεβαίωση της πέψης, τα άκρα του φορέα αποφωσφορυλιώθηκαν με τη χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 23) ώστε ο φορέας να μην ξανακλείσει.

4) Ποσοτικοποίηση και αντίδραση σύνδεσης μεταξύ φορέα και ενθέματος

Πριν την κλωνοποίηση της GAP140 στον PBEVY-GU έπρεπε να γίνει η ποσοτικοποίηση και των δύο ώστε να χρησιμοποιηθούν ισομοριακές ποσότητες στην αντίδραση σύνδεσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% όπου ηλεκτροφορήθηκαν 3 μl από το ένθεμα και 3 μl από τον φορέα. Εκτός από τον κανονικό μάρτυρα μοριακών βαρών DNA χρησιμοποιήθηκε και ο ειδικός δείκτης λ HindIII με συγκέντρωση 500 ng/ μl και μοριακό βάρος 48.5 kb. (χρησιμοποιήθηκαν 2 μl του συγκεκριμένου δείκτη)



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% των pBEVY-GU και GAP140 για ποσοτικοποίηση.

Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA
 Διαδρομή 2: Δείκτης μοριακών βαρών λ HINDIII
 Διαδρομή 3: pBEVY-GU
 Διαδρομή 4: GAP140

→ 420 bp

Αποτελέσματα:

pBEVY-GU	200 ng/ μλ
GAP140	20 ng/ μλ

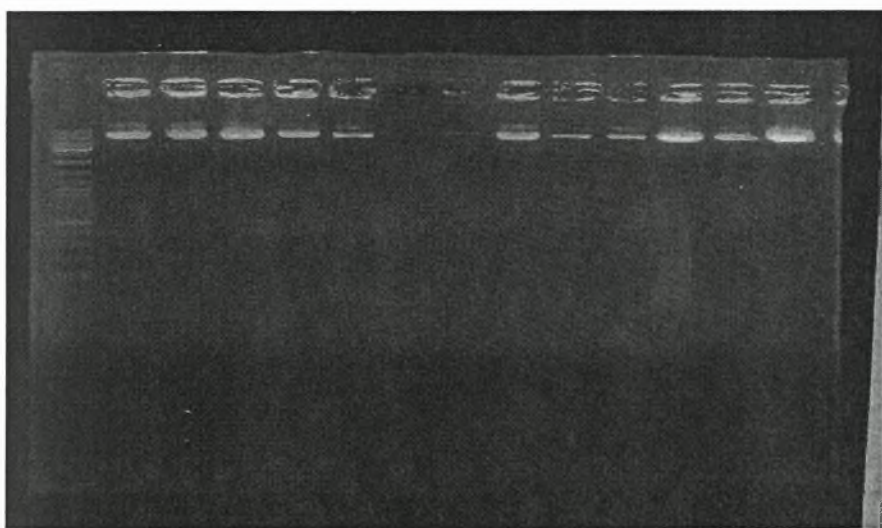
Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν 300 ng GAP140 και 1000 ng PBEVY-GU. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε σκέτος PBEVY-GU με και χωρίς λιγάση. Με τα προϊόντα της σύνδεσης μετασηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli T10 (βλέπε Μέθοδοι, σελ 25) . Η επώαση έγινε σε τρυβλία LB με μάρτυρα επιλογής το αντιβιοτικό αμικιλίνη.

5) Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA

Τα μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37⁰C. Ακολούθως, μεμονωμένες αποικίες από τα κύτταρα αυτά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υγρό LB με αμικιλίνη και επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες ώστε να γίνει απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση διαλυμάτων (βλέπε Μέθοδοι, σελ. 24). Το DNA που απομονώθηκε επαναδιαλύθηκε τελικά σε 20 μl ddH₂O.

6) Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος

Για να ελεγχθεί εάν το πλασμιδιακό DNA που απομονώσαμε περιείχε το ένθεμα αλλά και εάν αυτό είχε τον σωστό προσανατολισμό προχωρήσαμε σε πέψη των δειγμάτων (16) με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 10 μl πλασμιδιακού DNA. Αν ο φορέας είχε ανασυνδυασθεί και το ένθεμα είχε τον σωστό προσανατολισμό, θα προέκυπτε ζώνη στις 300 βάσεις ενώ αν είχε ανάποδο προσανατολισμό, στις 120 βάσεις. Εν τούτοις, σε κανένα από τα δείγματα πλασμιδιακού DNA που ελέγχθηκαν δεν εντοπίστηκε το ένθεμα (βλέπε εικ.26).



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης μεταξύ pBEVY-GU και GAP140 έπειτα από πέψη με την ενδονουκλεάση EcoRI. το ένθεμα με σωστό προσανατολισμό θα έδινε ζώνη στις 300 βάσεις. όμως σε καμία περίπτωση δεν προέκυψε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχοντας ως πρωταρχικό σκοπό το διαχωρισμό μεταξύ πλασμιδίων “λειών” και “δολωμάτων” χρησιμοποιήσαμε δύο μεθόδους. Η πρώτη, η οποία βασιζόταν στις αυξοτροφίες που προσέδιδαν τα πλασμίδια δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική. Το πρόβλημα εντοπιζόταν στο ότι ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων KC8 με τα απομονωθέντα πλασμίδια ήταν μικρής απόδοσης αφού έδινε λίγες ή καθόλου αποικίες. Κατά συνέπεια, ο διαχωρισμός “λειών” και “δολωμάτων” δεν ήταν εφικτός. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στο ότι τα κύτταρα KC8 είναι πιο δύσκολο να μετασχηματιστούν και ακόμη και όταν αυτός συμβαίνει, οι αποικίες που προκύπτουν δεν είναι αρκετές (επειδή στην πράξη ισχύει μια αναλογία 6 προς 1 μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων που προσλαμβάνουν το πλασμίδιο “δόλωμα” και αυτών που προσλαμβάνουν τη “λεία”, χρειάζονται αρκετές αποικίες για έναν επιτυχή διαχωρισμό). Ένας δεύτερος παράγοντας που πιθανόν αν έπαιξε ρόλο είναι και το ότι το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε στους μετασχηματισμούς δεν ήταν αρκετά καθαρό.

Αλλάζοντας στρατηγική προσέγγισης του προβλήματος, χρησιμοποιήθηκαν στη θέση των KC8 τα κύτταρα Top10. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι περισσότερο δεκτικά στο μετασχηματισμό και δίνουν μεγάλο αριθμό αποικιών. Εν τούτοις, δεν παρέχουν τη δυνατότητα διαχωρισμού βάσει αυξοτροφιών. Για το λόγο αυτό ο διαχωρισμός επιχειρήθηκε μέσω υβριδισμού του πλασμιδιακού DNA με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή ο οποίος ήταν το τμήμα HE300 (βλέπε Υλικά, σελ. 16) του HIF-1α. Από τον υβριδισμό προέκυψαν δέκα δείγματα (βλέπε Αποτελέσματα, Πίνακας 4) για τα οποία η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες επιβεβαίωσε ότι περιείχαν το πλασμίδιο pVP16 (“λεία”). Μετασχηματίζοντας κύτταρα σακχαρομύκητα με τα δείγματα αυτά προέκυψαν αποικίες μόνο στις 5 από τις 10 περιπτώσεις. Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA και ο μετασχηματισμός επαναλήφθηκαν για τα δείγματα αυτά με τα ίδια αρνητικά αποτελέσματα. Μερικές υποθέσεις για την εξήγηση του φαινομένου είναι οι εξής:

- Η εικόνα του υβριδισμού ήταν σωστή αλλά για κάποιο λόγο το πλασμίδιο “λεία” έχασε την ικανότητα παραγωγής λευκίνης ή την ικανότητα ανάπτυξης σε κύτταρα σακχαρομύκητα
- Δεδομένου ότι η επιλογή των πλασμιδίων “λειών” βασίζεται σε αρνητικό αποτέλεσμα (μη υβριδισμός) δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση τα πλασμίδια αυτά να μην ήταν ούτε “δολώματα” ούτε “λείες”. Κάτι ανάλογο είχε παρατηρηθεί και σε μία περίπτωση κατά τον διαχωρισμό βάσει αυξοτροφιών. (βλέπε Αποτελέσματα, σελ. 30)

Δύο από τα πέντε θετικά δείγματα αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν πολύ υψηλή ομολογία με δύο πρωτεΐνες του ποντικού. Συγκεκριμένα, το δείγμα 1a13 παρουσιάζει 100% ομολογία (βλέπε Αποτελέσματα, σελ. 40) με την πρωτεΐνη DnaJB3 ή heat shock protein J3 ή MSJ-1. Το δεύτερο δείγμα, που είναι το 2f 7, παρουσιάζει 100% ομολογία (βλέπε αποτελέσματα, σελ. 40) με την πρωτεΐνη DnaJB6 ή heat shock protein J2 ή Mtj. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι μοριακοί συνοδοί και ανήκουν στην οικογένεια HSP40 ή DnaJ. Τα μέλη της οικογένειας αυτής ρυθμίζουν τη λειτουργία της heat shock protein 70 (Fink, 1999). Η DnaJB3 εντοπίζεται στα γενετικά κύτταρα του αρσενικού και εκφράζεται στη μεταμειωτική φάση της ανάπτυξης των γενετικών

κυττάρων (*Beruti et al, 1998*). Η DnaJB6 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς ενώ είναι απαραίτητη και για την ανάπτυξη του πλακούντα (*Hunter et al, 1999*).

Επειδή οι συνοδοί πρωτεϊνών (chaperons) έχουν δομή που τους επιτρέπει να αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες θα πρέπει να αποσαφηνισθεί το κατά πόσο η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση είναι εξειδικευμένη, οπότε η DnaJ συμμετέχει στη ρύθμιση του HIF-1α ή πρόκειται για τυχαίο γεγονός. Αξίζει να σημειωθεί ότι επειδή οι δύο πρωτεΐνες προέρχονται από την ίδια οικογένεια παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (77%). Χαρακτηριστικό της οικογένειας αυτής είναι το συντηρημένο αμινοτελικό άκρο που ονομάζεται περιοχή J (J domain) και περιλαμβάνει τα 70 πρώτα αμινοξέα κάθε πρωτεΐνης. Όμως, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τις δύο πρωτεΐνες στις μη συντηρημένες περιοχές τους (βλέπε γράφημα 1) γεγονός που ίσως συνηγορεί υπέρ της μη τυχαίας αλληλεπίδρασης.

```
Query: 1 MVDYYEVLGVPRQASAEAIRKAYRKLALKWHPDKNPEHKKEEAERRFKQVAQAYEVLSDVR 60
MVDYYEVLGV R AS E I+KAYRK ALKWHHPDKNPE+KEEAER+FKQVA+AYEVLSD +
Sbjct: 1 MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKQALKWHPDKNPENKEEAERKFKQVAEAYEVLSDAK 60

Query: 61 KREVVYDRCGEVGEVGGGGGAAGSPFHDAFQYVFSFRDPAEVFREFFGGHDPFSFDFFGGDP 120
KR++YD+ G+ G GGGG G F F++ F+FR+P +VFREFFGG DPFSFDFF DP
Sbjct: 61 KRDIYDKYKKEGLNNGGGGGGIHFDSPFEEFGFTFRNPDDVFREFFGGDRDPFSFDFF-EDP 119

Query: 121 LENFFGDRRSTRGRSRGAVPFSTSFTEFPFGGGGFASLDTGFTSFGSPGNGLSSF-SM 179
++FFG+RR RG+RSRGA F ++F+ FP FG GF + DTGFT FGS G+ GL+SF S
Sbjct: 120 FDDFFGNRRGPRGNRSRGAGSFFSTFSGFPSFGSGFPFADTGTTPFGSLGHGGLTSFSST 179

Query: 180 SCGGGAAGNYKSVSTSTETIINGKKITTKRIVENGQERVEVEEDGELKSLIINGREQLLRI 239
S GG GN+KS+STST+I+NGKKITTKRIVENGQERVEVEEDG+LKSL ING+E LLR+
Sbjct: 180 SPGGSGMGNFKSISTSTKIVNGKKITTKRIVENGQERVEVEEDGQLKSLTINGKEHLLRL 239

Query: 240 NTQ 242
+ +
Sbjct: 240 DNK 242
```

Γράφημα 1: Ομοπαράθεση των αλληλουχιών των DnaJB3 (Query) και DnaJB6 (Subject). Οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν ομολογία στο αμινοτελικό (1-70 αα) και το καρβοξυτελικό άκρο (190-240 αα). Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τις μη συντηρημένες περιοχές των δύο πρωτεϊνών (από 81 ως 199 με την DnaJB3 - εδώ με μπλε χρώμα- και από 110 ως 217 με την DnaJB6 - κόκκινο χρώμα).

Για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων του διαχωρισμού βάσει υβριδισμού μπορούν να γίνουν μερικές αλλαγές όπως:

- Επανάληψη του υβριδισμού με τη χρήση δύο ανιχνευτών, δηλαδή τον HE300 (χρησιμοποιήθηκε μόνο αυτός γιατί συμπεριλαμβάνει τον HS στην αλληλουχία του) σε συνδυασμό με τον HS ώστε η εικόνα του υβριδισμού να είναι ξεκάθαρη
- Απομονωθέντα ζεύγη πλασμιδίων με τα οποία απέτυχε ο μετασχηματισμός να αραιωθούν σε αναλογία 1 προς 100 και να ξαναεπιχειρηθεί μετασχηματισμός. Η πρόταση αυτή βασίζεται στο ότι αραιώση 1 προς 10 σε ζεύγη πλασμιδίων, που αρχικά δεν έδιναν αποικίες, είχε θετικά αποτελέσματα (στις περισσότερες περιπτώσεις)

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, σκοπός ήταν να ελεγχθεί το κατά πόσο ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την GAP140 in vivo και ποιο είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής. Για να γίνει η μελέτη αυτή η GAP140 θα έπρεπε αρχικά αν

κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pBEVY-GU ώστε να εισαχθεί στη συνέχεια στο σύστημα μέσω του οποίου θα γινόταν η μελέτη της αλληλεπίδρασής της με τον HIF-1α. Εν τούτοις, η κλωνοποίηση δεν κατέστη δυνατή με την πρώτη προσπάθεια και λόγω των περιορισμένων χρονικών ορίων διεξαγωγής της παρούσας εργασίας δεν επιχειρήθηκε η επανάληψη στον ίδιο ή σε διαφορετικό φορέα (με τις ίδιες ιδιότητες). Η κλωνοποίηση της GAP140 σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και η μελέτη της αλληλεπίδρασής της με τον HIF-1α in vivo θα αποτελέσουν μελλοντικό στόχο του εργαστηρίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Peanson M, Chan DA, Giaccia AJ, Semenza GL, (2005), OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. 18;17(4):503-12.
- Bardos JI, Ashcroft M, (2004), Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*.;26(3):262-9.
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollman C, Dubiel W, (2001), COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J*. 2;20(7):1630-9.
- Berruti G, Perego L, Borgonovo B, Martegani E. (1998), MSJ-1, a New Member of the DnaJ Family of Proteins, Is a Male Germ cell-Specific Gene Product, *Experimental Cell Research* 239, 430-441
- Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC, (2005) Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF, *J Biol Chem*, 2;280(35):31132-40
- Braliou G.G., E. Venieris and G. Simos, 2004, The Human hypoxia Inducible Factor (HIF-1) Heterodimer is active in yeast: The Basis of a Bioassay for Identification of Anticancer Agents. Proceedings of the 56th Meeting, Newsletter 51.
- Chachami G., Simos G., Hatziefthimiou A., Bonanou S., Molyvdas P., Paraskeva E., (2004), Cobalt induces HIF-1_α expression in ASM cells by a ROS and PI3K dependent mechanism, *Am J Respir Cell Mol Biol*., Nov;31(5):544-51
- Fink A.L., (1999), Chaperone-Mediated Protein Folding, *Physiological Reviews*, Vol.79, No2
- Harris A.L., (2001), Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth, *Nature Reviews*, 2:38-47
- Hofer T, Wenger H, Gassmann M, (2002), Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic strategies, *Pflugers Arch*.;443(4):503-7
- Hunter PJ, Swanson BJ, Haendal MA, Lyons GE, James C. C. (1999), Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development, *Development* 126, 1247-1258
- Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 12;274(46):32631-7
- Ivan et al, (2001), HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW, (2002), Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 27;111(5):709-20.
- Jiang B.H, Semenza G.L, Bauer C, Marti .H, Hypoxia –inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172-C1180 (1996)
- Kalio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear localization and recruitment of

- the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.* 17:6573-86
- Kato H, Tamazizu-Kato S, Shibasaki F, (2004), Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1 α and increases transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1;279(40):41966-74
 - Katschinski DM, Le L, Heinrich D, Wagner KF, Hofer T, Schindler SG, Wenger RH, (2002), Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 α is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem.* 15;277(11):9262-7
 - Kitamura T, Kawashima T, Minoshima Y, Tonozuka Y, Hirose K, Nosaka T, (2001), Role of MgcRacGAP/Cyk4 as a regulator of the small GTPase Rho family in cytokinesis and cell differentiation, *Cell Structure and Function.*, 26:645-651
 - Leung SK, Ohh M, (2002), Playing Tag with HIF: The VHL Story. *J Biomed Biotechnol.*;2(3):131-135.
 - Λυμπεροπούλου Α., (2003), Μελέτη των μοριακών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία: Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1 α με το σύστημα των δύο υβριδίων, Διπλωματική Εργασία, ΠΣΕ Ιατρικής - Βιοχημείας
 - Manalo J.D., Rowan A. Lavoie T. Natarajan L. Kelly B. Garcia J, Semanza G., (2005), Transcriptional Regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 α , *Blood*, Vol. 105
 - Mc Neil LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ, (2002), Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J.* 1;367(Pt 3):571-5.
 - Nikolakaki et al. (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein-specific kinase 1 that interacts specifically with Scaffold Attachment Factor B. *J. Biol. Chem.* 276, 40175-40182
 - Ravi R. et al, (2000), Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev.* 14, 34-44
 - Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J, (1999), p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 12;274(46):32631-7
 - Schofield CJ, Ratcliffe PJ, (2004), HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *J. Biol Chem.* 385 (3-4):223-30
 - Semenza G. L, (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Cell Dev. Biol.* 15, 551-578
 - Semenza GL., (2002), HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics., *Trends Mol Med*, 8:S62-7
 - Semenza GL., (2003), Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:721-32
 - Semenza G., (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nature reviews*, 3:721-732
 - Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. (1991). Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5680-84
 - Semenza GL, (2000), HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 15;14(16):1983-91

- Wang G. L, Jiang B. H, Rue E. A, Semenza G. L, (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix –PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 92, 5510-5514 Wenger R.H., 2002, Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors and O₂-regulated gene expression, *FASEB J*, 16:1151-1162
- Yeo EJ, Chun YS, Park JW, (2004) , New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol.* 15;68(6):1061-9
- Zhang W, Tsuchiya T, Yasukochi Y, (1999), Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia. *J. HumGenet.*44(5):293-9.

