



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα
HIF-1α: Μελέτη νέων αλληλεπιδράσεων»**

Κουκουλάς Κρέων

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, επιβλέπων
- Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Οκτώβριος 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

« The role of phosphorylation in the regulation of transcription factor HIF-1 α : Investigation of protein-protein interactions»

Koukoulas Kreon

Advisory Thesis Committee:

- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry, supervisor
- George Simos, Professor of Biochemistry
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

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

Larissa, October 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΥΠΟΞΙΑ.....	9
1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....	9
1.2.1 Δομή	9
1.2.2 Λειτουργία	11
1.3 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1α..	12
1.3.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α	12
1.3.2 Μη οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α.....	14
1.3.3 Ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα	20
1.4 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.....	20
1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	22
1.6 ΝΟΥΚΛΕΟΦΩΣΜΙΝΗ.....	24
1.6.1 Δομή	24
1.6.2 Λειτουργία	25
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	28
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
3.1 ΥΛΙΚΑ	29
3.1.1 Βακτηριακά στελέχη	29
3.1.2 Κυτταρικές σειρές	29
3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας.....	29
3.1.4 Χημικά.....	29
3.1.5 Πλασμυδιακοί φορείς.....	29
3.1.6 Υλικά χρωματογραφίας.....	30
3.1.7 Εκκινητές.....	31

3.1.8	Αντισώματα	31
3.1.9	Απομόνωση RNA(kit)	31
3.1.10	Μέσα παροδικής επιμόλυνσης.....	31
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
3.2.1	Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....	32
3.2.2	Μετασχηματισμός κυττάρων.....	32
3.2.3	Επαγωγή της υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	33
3.2.4	Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	34
3.2.5	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.....	35
3.2.6	Δοκιμές συγκατακρήμνισης (in vitro pull down assay) πρωτεϊνών.....	36
3.2.7	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	37
3.2.8	Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση. 40	
3.2.9	Ανοσοκατακρήμνιση.....	42
3.2.10	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	44
3.2.11	Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού.....	45
3.2.12	Παροδική επιμόλυνση.....	46
3.2.13	Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας.....	48
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1	Έλεγχος αρχικού πειράματος συγκατακρήμνισης.....	54
4.2	Υπερέκφραση των μορφών GST-HIF-1α (348-826) σε βακτηριακά κύτταρα <i>E. Coli</i> BL21-RIL και καθαρισμός των πρωτεϊνών.....	56
4.3	Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών κυττάρων HeLa από τις χιμαιρικές πρωτεΐνες GST-HIF-1α 348-826 wt, SA και SE.....	58
4.4	Ανάλυση με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού των ενδογενών HIF-1α και νουκλεοφωσμίνης και έλεγχος του συνεντοπισμού τους.....	59
4.5	Αλληλεπίδραση HIF-1α και νουκλεοφωσμίνης μετά από ανοσοκατακρήμνιση.....	62

4.6	Αλληλεπίδραση με την νουκλεοσομίνη GFP χμαιοικών πρωτεϊνών, από κύτταρα που εκφράζουν GFP-HIF-1α wt , IA/SA, SE μετά από ανοσοκατακρήμνιση.	63
4.7	Η αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοσομίνης δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αλλά μειώνει την μεταγραφική του ενεργότητα.....	64
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας, κυρίου Ηλία Μυλωνή.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του Π.Μ.Σ. και μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, κύριο Αναστάσιο Γερμενή για την άρτια διεξαγωγή του προγράμματος και τον εμπλουτισμό του με διαλέξεις εξαιρετων επιστημόνων.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, Καθηγητή Βιοχημείας κύριο Γεώργιο Σίμο που με δέχτηκε ως μεταπτυχιακό φοιτητή στο εργαστήριο και συνέβαλε στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Εδώ, θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου σε όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Βιοχημείας, η συνεχής δράση των οποίων διατηρεί το εργαστήριο σε υψηλό λειτουργικό επίπεδο.

Η εκτίμηση και η υποχρέωση που νιώθω προς το πρόσωπο του κυρίου Ηλία Μυλωνή, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας και επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, είναι δύσκολο να περιγραφεί. Η μεθοδικότητα σε συνδυασμό με το δραστήριο πνεύμα του αποτέλεσε παράδειγμα και έμπνευση στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα. Οι συμβουλές και η υπομονετική του καθοδήγηση υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση της εργασίας μου, ενώ η σταθερή εμπιστοσύνη με την οποία με τίμησε, ήταν σημαντική ψυχολογική βοήθεια. Τον ευχαριστώ ειλικρινά.

Πραγματικά θα ήθελα να ευχαριστήσω, αλλά και να τους ευχηθώ για ότι καλύτερο στη ζωή τους, τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καραγιώτα Αγγελική, Πάγγου Έσα, Δρακούλη Σωτηρία, Γκοτινάκου Ιωάννα, την διδάκτορα Κούρτη Μαρία, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα αλλά και όλους τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου. Η βοήθεια, η συμπαράσταση και η φιλία τους εντός και εκτός του εργαστηρίου, ήταν για μένα ένα καθημερινό και αναπάντεχο δώρο.

Τέλος, με όλη μου τη καρδιά θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου. Με την επιμονή τους να με στηρίζουν σε ό,τι κάνω, να χαίρονται και να λυπούνται μαζί μου, χωρίς να σταματούν να μου προσφέρουν την αγάπη τους, γεμίζουν τη ψυχή μου σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελλάτωση των επιπέδων οξυγόνου (υποξία) σε κύτταρα και ιστούς είναι χαρακτηριστικό πολλών φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Οι κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIFs), που δρουν ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται, μεταξύ άλλων, με την ερυθροποίηση, τον μεταβολισμό και την επιβίωση. Ο HIF-1α είναι η ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο υπομονάδα του HIF-1. Ανεξάρτητα από το οξυγόνο η δράση του HIF-1α ρυθμίζεται και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες.

Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δείχθηκε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 στις θέσεις Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³ επάγει την πυρηνική συσσώρευση και κατά συνέπεια τη μεταγραφική του ενεργότητα μέσω εξουδετέρωσης ενός παρακείμενου σήματος πυρηνικής εξαγωγής, που αναγνωρίζεται από την εξπορτίνη CRM-1. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέες αλληλεπιδράσεις του HIF-1α που εξαρτώνται από την φωσφορυλίωση, αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές ενός πεπτιδίου του HIF-1α που περιέχει την περιοχή φωσφορυλίωσης από τις ERK χρησιμοποιήθηκαν ως δολώματα σε δοκιμές συγκατακρήμνισης από κύτταρα HeLa. Μία πρωτεΐνη συνδέθηκε εξειδικευμένα με το πεπτίδιο που έφερε την φωσφομιμητική μετάλλαξη και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ως η νουκλεοφοσμίνη.

Στη παρούσα εργασία πειράματα συγκατακρήμνισης και ανοσοκατακρήμνισης επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση HIF-1α - νουκλεοφοσμίνης και την εξάρτηση της από τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2. Επίσης, δείχθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στον πυρήνα όταν οι ERK1/2 είναι ενεργοποιημένες. Επιπλέον, αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης με siRNA είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α χωρίς να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η νουκλεοφοσμίνη επάγεται σε συνθήκες υποξίας η αλληλεπίδραση της με τον HIF-1α μπορεί να είναι μέρος ενός νέου μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης που συμβάλει στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία.

Λέξεις κλειδιά: Υποξία, HIF-1α, ERK1/2, φωσφορυλίωση, νουκλεοφοσμίνη

ABSTRACT

Oxygen deprivation (hypoxia) in cells and tissues is a situation encountered in many physiological and pathological conditions. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) are the key transcriptional activators of cellular response to hypoxia and activate the transcription of genes involved in erythropoiesis, metabolism and survival. HIF-1 α is the oxygen-regulated subunit of HIF-1. Apart from oxygen levels HIF-1 α is also regulated by protein-protein interactions and post-translational modifications.

Recent research in the Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly revealed that ERK1/2 mediates the phosphorylation of HIF-1 α at Ser⁶⁴¹ and Ser⁶⁴³ and promotes its nuclear accumulation and activity by masking a CRM1-dependent nuclear export signal. In order to identify additional phosphorylation-dependent HIF-1 α interactions, we used small GST-HIF-1 α -derived peptides that contain the ERK modification sites in wild-type, phospho-deficient or phospho-mimetic mutant forms as baits in pull-down assays with HeLa cell protein extracts. A single protein, which was identified by mass spectroscopy as the nucleolar protein nucleophosmin, bound specifically to the peptide carrying the phospho-mimetic mutation.

In the present study, pull-down and immunoprecipitation experiments confirmed the interaction between HIF-1 α and nucleophosmin under conditions that stimulate or mimic ERK-dependent phosphorylation of HIF-1 α . Additionally, these proteins colocalize in the nucleus of cells when ERK1/2 pathway is activated. Finally, siRNA-induced silencing of nucleophosmin reduced HIF-1 α transcriptional activity without affecting its protein levels. Taking into account that nucleophosmin is induced under hypoxia, its association with and activation of HIF-1 α may represent a novel positive feedback mechanism that stimulates HIF-1 α and contributes to cellular adaptation to hypoxia.

Keywords: Hypoxia, HIF-1 α , ERK1/2, phosphorylation, nucleophosmin

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΞΙΑ

Η προσαρμογή σε περιβάλλον παρουσία οξυγόνου αποτέλεσε σταθμό στη πορεία της εξέλιξης των οργανισμών. Ο αερόβιος μεταβολισμός των μεταζώων βασίζεται στη χρήση του οξυγόνου ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων στην αλυσίδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για τη παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια. Στο ανθρώπινο σώμα το οξυγόνο αποτελεί συστατικό του νερού, οργανικών μορίων (π.χ. υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα), ενώ φυσικά χρειάζεται για την αναπνοή. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση του οξυγόνου αποτελούν σημαντικά ερεθίσματα, απέναντι στα οποία αναπτύχθηκαν εξελικτικά ομοιοστατικοί μηχανισμοί σε επίπεδο κυττάρων, ιστών και οργανισμών [1].

Η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου για έναν οργανισμό, ιστό ή κύτταρο, κάτω από ένα επίπεδο ορίζεται ως υποξία. Υποξικές συνθήκες εμφανίζονται φυσιολογικά σε μεγάλο υψόμετρο, μετά από έντονη μυϊκή άσκηση αλλά αποτελούν χαρακτηριστικό και πολλών άλλων φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων στον οργανισμό. [2]. Η συνεχής υποξία αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την προαγωγή της εμβρυογένεσης στα θηλαστικά [3], την ερυθροποίηση, αλλά και τη διατήρηση και ομαλή λειτουργία βλαστικών κυττάρων, κατά την ανάπτυξη διαφόρων ιστών (αίματος, οστών) [4,5]. Ωστόσο, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό και ασθενειών όπως η ισχαιμία και ο καρκίνος [1].

Η απόκριση του κυττάρου στην υποξία περιλαμβάνει μια γρήγορη φάση που καθορίζεται από μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών, ενώ ακολουθεί μια καθυστερημένη φάση ρύθμισης της έκφρασης στοχευμένων γονιδίων και πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που είναι γνωστοί ως επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors).

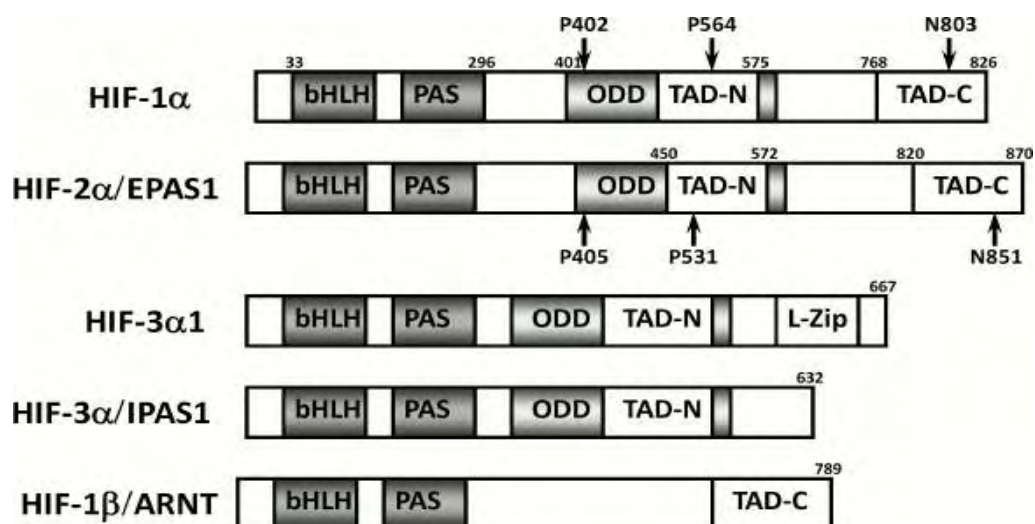
1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

1.2.1 Δομή

Οι HIFs είναι πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH/PAS, που σχηματίζουν πυρηνικά ετεροδιμερή και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων της υποξίας. Το ετεροδιμερές συνίσταται από μια α-υπομονάδα που ρυθμίζεται από το οξυγόνο και από μια β-υπομονάδα που εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα. Στα κύτταρα των θηλαστικών τρία γονίδια εκφράζουν για τις ισομορφές της α-υπομονάδας HIF-1α, HIF-2α (EPAS1) και HIF-3α (IPAS) [6-8]. Η β-υπομονάδα αποτελείται από την πρωτεΐνη HIF-1β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator).

Τα μέλη της οικογένειας των HIFs χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη κατανομή επικρατειών (Εικόνα 1.1). Συγκεκριμένα, οι τρεις ισομορφές HIF-α και ο HIF-1β φέρουν στο

αμινοτελικό τους άκρο επικράτειες βασικών αμινοξέων με βασική δομή έλικα-βρόγχο-έλικα (bHLH) για δέσμευση στο DNA, αλλά και PER-ARNT-SIM (PAS) επικράτειες με -A και -B υποπεριοχές, που ευθύνονται για την συγκρότηση του ετεροδιμερούς. Κεντρικά στις HIF-α υπομονάδες εντοπίζεται η επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD). Η ιδιότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής οφείλεται στις επικράτειες TADs (Transactivation Domains) που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο των HIFs [9].



Εικόνα 1. 1 Δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF. Διακρίνονται οι συντηρημένες επικράτειες σύνδεσης στο DNA (bHLH), ετεροδιμερισμού (PAS), οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD) και ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD, C-TAD) [10].

Οι bHLH και PAS επικράτειες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των HIFs. Συγκεκριμένα οι bHLH επικράτειες των HIF-1α και HIF-2α είναι κατά 85% ομόλογες ενώ οι αντίστοιχες PAS επικράτειες ταυτίζονται κατά 70%. Από την άλλη ο HIF-3α διαφοροποιείται περισσότερο και οι bHLH και PAS επικράτειές του ταυτίζονται κατά 74% και 52-58% με αυτές των HIF-1α και HIF-2α αντίστοιχα [9].

Οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν αυξημένη ομολογία και στην αμινοξική αλληλουχία και λειτουργία των επικρατειών οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD και μεταγραφικής ενεργοποίησης TAD, φέροντας δύο υποπεριοχές TAD-N και TAD-C. Στις διάφορες ισομορφές του HIF-3α παρατηρείται απουσία της καρβοξυτελικής υποπεριοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης TAD-C, η οποία στην ισομορφή HIF-3α1 έχει αντικατασταθεί από ένα μοτίβο φερμουάρ λευκίνης, ενώ η ισομορφή HIF-3α4 έχει απολέσει τις TADs [8,11]. Όπως αναλύεται στη συνέχεια οι δομικές ομοιότητες και διαφορές αντικατοπτρίζονται και στη λειτουργία των HIFs.

1.2.2 Λειτουργία

Όπως ήδη περιγράφηκε, η μεταγραφική δράση των HIFs εκδηλώνεται από ετεροδιμερή, των οποίων η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από το οξυγόνο ενώ η HIF-1β εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα. Σε συνθήκες υποξίας η α υπομονάδα σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και ετεροδιμερίζεται με την HIF-1β υπομονάδα (ARNT) [6]. Το σύμπλοκο δεσμεύει τους συμπράγοντες CBP/P300 στις TAD-C επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης και συνδέεται στις περιοχές των προαγωγέων ή των ενισχυτών γονιδίων στόχων και επάγει τη μεταγραφή τους [12]. Η αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν οι HIFs είναι τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements). Πρόκειται για σύνθετα στοιχεία αποτελούμενα από ένα καλά συντηρημένο πυρήνα όπου συνδέεται ο HIF με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' και υψηλής ποικιλότητας πλευρικές αλληλουχίες που ρυθμίζουν την μεταγραφική απόκριση [13].

Η ανακάλυψη των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων έγινε σε μελέτες της επαγωγής, υπό συνθήκες υποξίας, τη μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), μιας γλυκοπρωτεΐνης που ρυθμίζει στα θηλαστικά την παραγωγή ερυθροκυττάρων [14]. Η ερυθροποίηση είναι μια από τις κύριες αποκρίσεις στην υποξία σε επίπεδο οργανισμού. Βασική τοπική απόκριση στην ελλιπή οξυγόνωση σε επίπεδο ιστού αποτελεί η αγγειογένεση, με πληθώρα γονιδίων να αποτελούν στόχους των HIFs και σημαντικότερο εκπρόσωπο τον παράγοντα αύξησης του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelium Growth Factor). Πέρα από τις αποκρίσεις που στοχεύουν στην αύξηση της πρόσληψης και της αξιοποίησης του οξυγόνου, οι HIFs ρυθμίζουν τη μετατόπιση του μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορύλιωση προς τη γλυκόλυση. Γονίδια στόχοι των HIFs κωδικοποιούν μεταξύ άλλων για μονομεταφορείς γλυκόζης (GLUT1) αλλά και για τα περισσότερα γλυκολυτικά ένζυμα [2]. Εκτός από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, οι παράγοντες HIF ρυθμίζουν και τον μεταβολισμό των λιπιδίων επάγοντας γονίδια στόχους που εκφράζουν ένζυμα όπως η λιπίνη-1 και συμβάλουν στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων σε λιποσταγονίδια σε συνθήκες υποξίας [15,16].

Η δομική ομολογία των HIF-1α και HIF-2α έχει αντίκτυπο στη λειτουργία τους καθώς και οι δύο σταθεροποιούνται σε συνθήκες υποξίας, μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου διμερίζονται με τον ARNT και επάγουν τη μεταγραφή τόσο κοινών όσο και διαφορετικών γονιδίων στόχων [17]. Ωστόσο, σε αντίθεση με τον HIF-1α που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους, η έκφραση και δράση του HIF-2α είναι αρκετά ιστοειδική και εντοπίζεται κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο κατά την εμβρυική ανάπτυξη και σε μια σειρά άλλων κυτταρικών τύπων [18,19]. Η τρίτη α-υπομονάδα HIF-3α όπως περιγράφηκε διαφοροποιείται αρκετά από τις δύο πρώτες. Εμφανίζει μεγάλη ποικιλία παραλλαγών που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος και

παρουσιάζουν διαφορετική μεταγραφική ενεργότητα, αλλά και διαφορετικές ιδιότητες ρύθμισης από το οξυγόνο και διμερισμού με τον ARNT. Η μορφή HIF-3α4 που όπως αναφέρθηκε δεν φέρει επικράτειες μεταγραφικής TADs, δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α [11].

1.3 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1α

Ο HIF-1α είναι η πιο καλά μελετημένη α-υπομονάδα των HIFs καθώς η έκφραση του είναι καθολική τόσο σε επίπεδο ζωικών οργανισμών, όσο και κυτταρικών τύπων. Επιπρόσθετα, η δράση του HIF-1 καλύπτει το σύνολο της κυτταρικής απόκρισης στη υποξία ρυθμίζοντας την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση, τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Από την άλλη ενέχεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, αποτελώντας δείκτη των συμπαγών όγκων και προωθώντας την επιβίωση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Η δράση του HIF-1 ρυθμίζεται από τον HIF-1α καθώς ο ARNT εκφράζεται σε σταθερά υψηλά επίπεδα. Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων που εκφράζεται συνεχώς και υπόκειται σε συνεχή ρύθμιση τόσο σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης (νορμοξία) όσο και σε υποξία. Η ρύθμιση του γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής, έκφρασης, σταθεροποίησης και συσσώρευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζεται ο διμερισμός με τον ARNT, η πρόσδεση σε γονίδια στόχους και η αλληλεπίδραση με ποικίλους παράγοντες της μεταγραφής. Μέρος αυτών των ρυθμίσεων, όπως οι οξυγονοεξαρτώμενες ρυθμίσεις, αλλά και κάποιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν καθολικό χαρακτήρα και τελούνται σε όλα τα κύτταρα που εκφράζουν τους HIFs. Από την άλλη ρυθμίσεις όπως αυτές της μεταγραφής και της μετάφρασης του γονιδίου του HIF-1α διαφοροποιούνται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον οργανισμό.

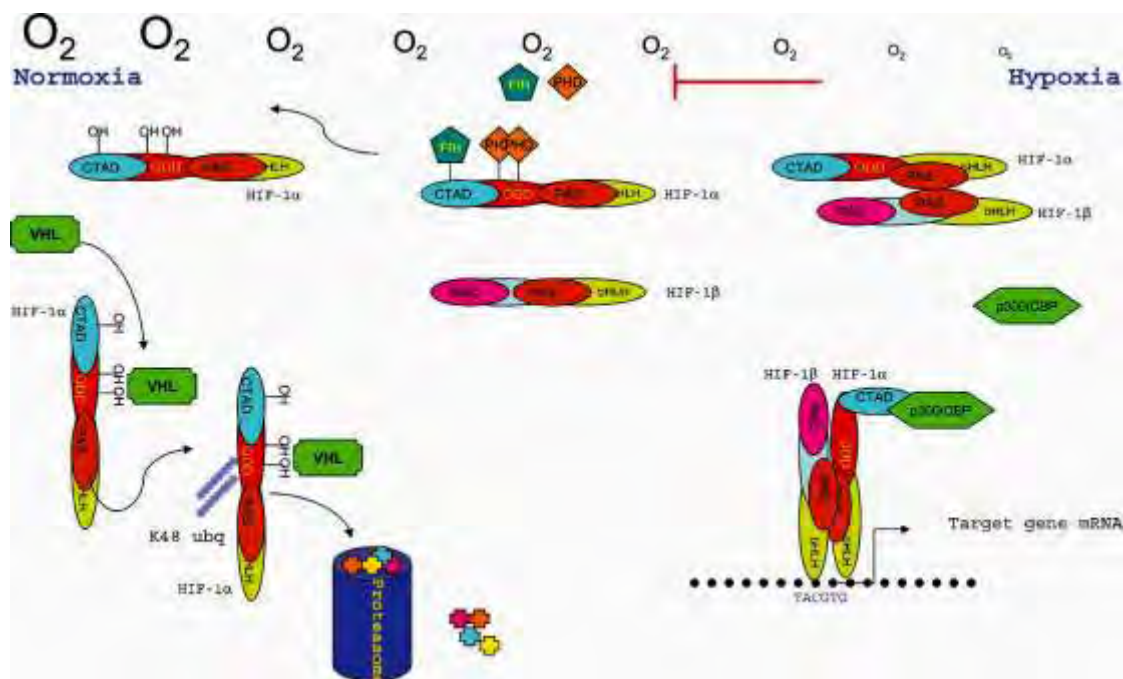
1.3.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

Η κυριότερη ρύθμιση στην οποία υπόκειται ο HIF-1α βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα οξυγόνωσης του κυττάρου ή ιστού. Σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1α συντίθεται συνεχώς και αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, υδροξυλίωση του HIF-1α σε δύο κατάλοιπα προλίνης (Pro 402 και 564) εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD, έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευσή του από την πρωτεΐνη Von Hippel-Lidau (VHL). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος E3 λιγάσης-ουβικιτίνης, έτσι ο HIF-1α πολύ-ουβικιτινιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα [20].

Η αρχική υδροξυλίωση καταλύεται από μια τάξη ενζύμων που ονομάζονται προλυλο-υδροξυλάσες (prolyl-hydroxylases, PHDs). Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών και χρειάζονται δισθενή σίδηρο Fe^{2+} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαραγόντες για την ενζυμική τους δράση καθώς και μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα. Συνεπώς, σε συνθήκες

υποξίας το μοριακό οξυγόνο εκλείπει από τα υποστρώματα των PHDs, καθιστώντας τις PHDs ανενεργές. Έτσι ο HIF-1α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τον ARNT και επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων [21]. Μάλιστα η PHD2 φαίνεται να είναι ο κύριος ρυθμιστής του HIF-1α, όπως έχει ελεγχθεί με πειράματα αποσιώπησης, ενώ ο υποκινητής του γονιδίου της φέρει ένα HIF-1 εξαρτώμενο HRE, δημιουργώντας έτσι έναν πιθανό έλεγχο αρνητικής ανατροφοδότησης [22].

Πέρα από την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση, ένας ακόμη μηχανισμός υδροξυλίωσης αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Ο παράγοντας FIH (Factor Inhibiting HIF) υδροξυλιώνει μια ασπαράγινη (Asn-803) εντός της καρβοξυτελικής επικράτειας μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση του HIF-1α με συμπαράγοντες της μεταγραφής [23]. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με το σύμπλοκο CBP/p300 είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, κυρίως λόγω της ενεργότητας ακετυλ-τρανσφεράσης του τελευταίου που κάνει δυνατή τη τοπική τροποποίηση της χρωματίνης, ενώ έχει βρεθεί ότι μέσω της CBP αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και άλλοι σημαντικοί συμπαράγοντες της μεταγραφής, όπως η SRC-1 [24].



Εικόνα 1. Η οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας υδροξυλιώνεται από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες στην ODD, πολυουβικιτινιάνεται από τον VHL και αποικοδομείται στο 26S πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και μειωμένου οξυγόνου η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α αναστέλλεται από τον παράγοντα FIH που υδροξυλιώνει μια ασπαράγινη στη C-TAD και αποτρέπει τη σύνδεση των συμπαράγοντων της μεταγραφής CBP/p300. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α σταθεροποιείται και είναι μεταγραφικά ενεργός [25].

Παρόλο που και ο FIH, όπως οι PHDs, ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών που χρειάζονται Fe^{2+} και α -κετογλουταρικό σαν συμπαράγοντες και μοριακό οξυγόνο ως

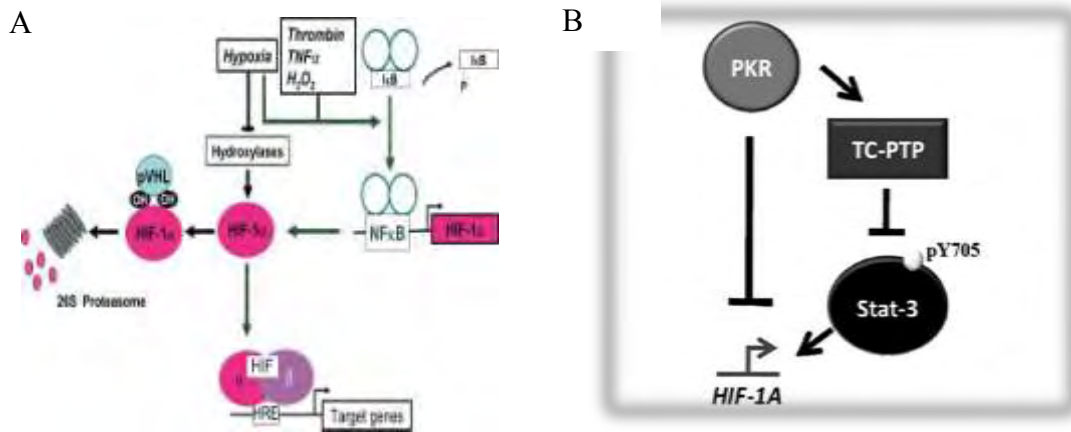
υπόστρωμα, τα δύο ένζυμα διαφέρουν σημαντικά. Ο παράγοντας FIIH παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το μοριακό οξυγόνο από τις PHDs με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργός και σε συνθήκες σχετικά χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Έτσι ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργότητα και σε συνθήκες όπου ο HIF-1α σταθεροποιείται [26].

1.3.2 Μη οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

1.3.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Αρχικές μελέτες συνέδεσαν την αυξημένη συσσώρευση και ενεργότητα του HIF-1 με την επίδραση του TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) και ιντερλευκινών, σε κύτταρα που βρίσκονται στο αρχικό στάδιο φλεγμονής, προτείνοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-1 που σχετίζονται με την αρχική απόκριση στην φλεγμονή όπως το iNOS και ο VEGF [27,28]. Στη συνέχεια βρέθηκε, σε κύτταρα ινοβλαστών NIH/3T3, ότι ο TNF-α επάγει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α και μάλιστα με έναν μηχανισμό που εξαρτάται από τον NF-κB, χωρίς ωστόσο να επάγει τα επίπεδα mRNA του HIF-1α [29], κάτι που βρίσκεται σε αντιδιαστολή με επακόλουθα ευρήματα. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός μιας συντηρημένης, σε διάφορα είδη, υποπεριοχής εντός του υποκινητή του γονιδίου *HIF-1A* (-197/188 bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής) με την οποία αλληλεπιδρά άμεσα ο NF-κB και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου [30]. Ο μηχανισμός που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NF-κB μετά από φωσφορυλίωση και καταστροφή της ρυθμιστικής υπομονάδας IκB, σύνδεσή του στη συντηρημένη υποπεριοχή του υποκινητή του HIF-1A και επαγωγή της μεταγραφής του, σχετίζεται με την TNF-α εξαρτώμενη ενεργοποίηση του NF-κB και βρέθηκε ότι επάγεται από ROS, θρομβίνη και βραχείας διάρκειας υποξία [31,32].

Επιπλέον, τη μεταγραφή του γονιδίου *HIF-1A* έχει βρεθεί ότι επάγει, σε καρκινικά κύτταρα, ο μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (Stat3) [33], ενώ η αναστολή του Stat3 από την, εξαρτώμενη από το δίκλωνο RNA, κινάση του eIf-2α PKR βρέθηκε ότι ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή του *HIF1A* γονιδίου [34].

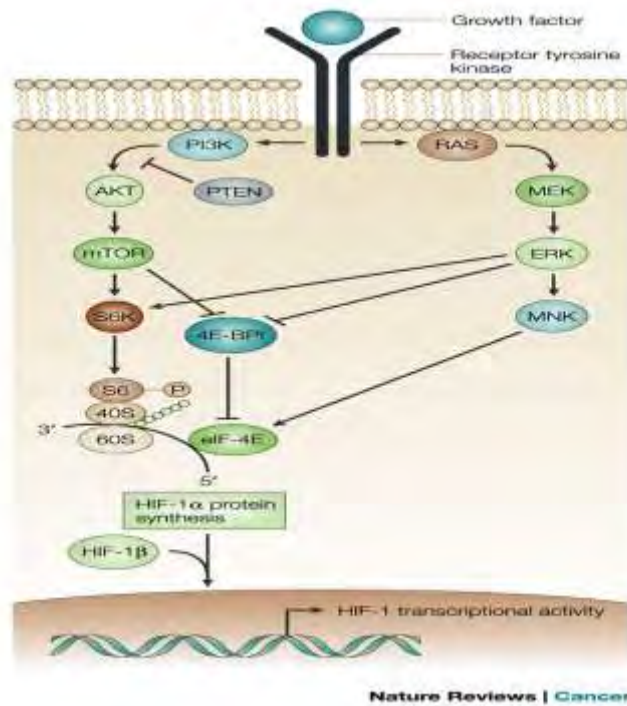


Εικόνα 1. 3 A) Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF-1A* από τον NF-κB [35]. B) Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF-1A* από την PKR μέσω της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης του Stat3 [34].

1.3.2.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης

Η διέγερση της σύνθεσης του HIF-1α είναι ιστοειδική και εξαρτάται από τη δράση σηματοδοτικών μορίων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες, που ενεργοποιούν μονοπάτια που επάγουν την κυτταρική αύξηση και την πρωτεϊνοσύνθεση και συγκεκριμένα τα μονοπάτια της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των κινασών ERK (extracellular signal-regulated kinases) (Εικόνα 1. 4).

Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι με τη σειρά του ενεργοποιούν την PI3K και τις ERK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Στο μονοπάτι των ERK, οι ERK έχουν ενεργοποιηθεί από τις MEK (MAPK/ERK Kinase) και ενεργοποιούν με τη σειρά τους τις MNK (MAPK interacting protein kinases). Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την p70 S6 κινάση (S6K), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη που προσδέεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (4E-BP1). Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF-4E παρεμποδίζεται από τη φωσφορυλίωση του από τις mTOR και ERK έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' καλύπτρα. Επίσης οι MNK φωσφορυλιώνουν τον eIF-4E και διεγείρουν άμεσα τη δράση του. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η αυξημένη μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο HIF-1α [36].



Εικόνα 1. 4 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη διέγερση της σύνθεσης του HIF-1α. Ανατύπωση από: nature.com [36]

1.3.2.3 Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

Όπως έχει δειχθεί τόσο η σταθερότητα όσο και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων του με άλλες πρωτεΐνες

- Hsp90/RACK1

Η πρωτεΐνη μοριακή συνοδός Hsp90 (Heat shock protein 90) βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και τον προστατεύει από μία ανεξάρτητη από το οξυγόνο και από το σύμπλοκο VHL πολυουβικτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος (RCC), που δεν εκφράζουν VHL και ο HIF-1α σταθεροποιείται σε νορμοξία, βρέθηκε ότι αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα, ενώ μόρια ανταγωνιστές της Hsp90 μειώνουν δραστικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α [37]. Σε αυτά τα αποτελέσματα προστίθεται μια μελέτη που έδειξε την in-vitro αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον υποδοχέα της ενεργοποιημένης protein C κινάσης (RACK1). Βρέθηκε ότι ο RACK1 ανταγωνίζεται την Hsp90 για μια θέση δέσμευσης με τον HIF-1α εντός της PAS-A επικράτειας του τελευταίου και επάγει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα προσδένοντας ένα διαφορετικό του VHL σύμπλοκο E3 λιγάσης, σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας [38]. Τη δράση αυτή του RACK1 σταθεροποιεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται τόσο στον HIF-1α όσο και στον RACK1, η SSAT1 (Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1) [39], ενώ αντίθετο ρόλο σε αυτόν το μηχανισμό βρέθηκε ότι διαδραματίζει η SEPT9_v1 [40].

- MgcRacGap

Ρυθμιστικό ρόλο για τη μεταγραφική ενεργότητα, αλλά όχι για τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τον εντοπισμό του HIF-1α, φαίνεται ότι παίζει η αλληλεπίδρασή του με την MgcRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ρυθμιστής των μικρών G πρωτεϊνών Rho και Cdc42 που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Βρέθηκε ότι η MgcRacGap αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στην περιοχή PAS-B (αμινοξέα 244-352) και ανταγωνίζεται τον ARNT ως προς το σχηματισμό του ετεροδιμερούς [41,42].

- p53

Ο παράγοντας p53 εμπλέκεται, ανάμεσα σε άλλα, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων. Αλληλεπιδρά με την ODD περιοχή του HIF1α, και μέσω της πρωτεΐνης MDM2, που αποτελεί μέρος συμπλόκου E3 λιγάσης ουβικιτίνης, οδηγεί τον HIF1α σε ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, σε συνθήκες υποξίας [43].

- Myc

Πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, των κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιογένεση του μιτοχονδρίου. Αλληλεπίδραση του HIF1α με το Myc φαίνεται να οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας [44].

1.3.2.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Η ρύθμιση του HIF-1α μετα-μεταφραστικά περιλαμβάνει προσθήκη λειτουργικών ομάδων από τα κατάλληλα ένζυμα. Οι τροποποιήσεις αυτές ρυθμίζουν την σταθερότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, αλλά και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

- *Ακετυλίωση*

Η N-ακετυλτρανσφεράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ARD-1* ποντικού, βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in-vitro* και *in-vivo* με τον HIF-1α και να τον ακετυλιώνει σε ένα κατάλοιπο λυσίνης (K532) εντός της ODD. Η ακετυλίωση αυτή συνδέθηκε με ισχυρότερη πρόσδεση του συμπλόκου E3 λιγάσης VHL στον HIF-1α και επαγωγή της αποικοδόμησης του σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, ωστόσο προτάθηκε μείωση των επιπέδων mRNA της *ARD-1* κάτω από την επίδραση υποξίας [45]. Επόμενες μελέτες ωστόσο έθεσαν υπό αμφισβήτηση τα παραπάνω ευρήματα, τόσο όσον αφορά την επίδραση της υποξίας στην *ARD-1* όσο και στη γενικότερη επίδραση της τελευταίας πάνω στον HIF-1α [46]. Πρόσφατα η ακετυλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α (Lys-9, -10, -11, -19, -21) βρέθηκε επίσης να αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη και να μειώνει τη μεταγραφική της ενεργότητα. Η ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η δράση της απακετυλάσης HDAC4 επάγει τα πρωτεϊνικά

επίπεδα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, ενώ αποσιώπηση της HDAC4 έχει τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα [47].

Η ακετυλίωση του HIF-1α στο καρβοξυτελικό άκρο (Lys^{674, 709}) από διαφορετικούς μηχανισμούς φαίνεται πως αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και επάγει την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ακετυλίωση από τον παράγοντα που σχετίζεται με το σύμπλοκο CBP/p300 (PCAF) στη Lys⁶⁷⁴ επάγει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις CBP/p300 [48], ενώ η ακετυλίωση στη Lys⁷⁰⁹ γίνεται από την p300 και σταθεροποιεί τον HIF-1α ανταγωνιζόμενη πιθανή πολυουβικτινίωσή του στην ίδια θέση [49].

- *S-νιτροσυλίωση*

Η προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου σε σουλφυδρικές ομάδες κυστεΐνης, είναι μια τροποποίηση που ρυθμίζει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές αποκρίσεις [50]. Έχει βρεθεί ότι παρεμβαίνει στην υδροξυλίωση του HIF-1α από την PHD2 μειώνοντας έτσι την αποικοδόμησή του σε συνθήκες νορμοξίας, ενώ σε συνθήκες υποξίας συμβάλλει στην επαγωγή, σε εξάρτηση με τον HIF-1α, των mRNAs της PHD2 με αποτέλεσμα την ταχύτερη αποικοδόμηση του HIF-1α σε συνθήκες επανοξυγόνωσης [51]. Ο ίδιος ο HIF-1α φαίνεται πως τροποποιείται με προσθήκη NO στο καρβοξυτελικό του άκρο (Cys⁸⁰⁰) και η τροποποίηση αυτή προτάθηκε ότι επάγει την μεταγραφική του ενεργότητα, αυξάνοντας την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο CBP/p300 [52]. Ωστόσο, σε αντικρουόμενα αποτελέσματα από άλλη ερευνητική ομάδα βρέθηκε ότι η νιτροσυλίωση στη Cys⁸⁰⁰ μειώνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την ακετυλ-τρανσφεράση p300 [53].

- *Σουμοϋλίωση*

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο θέσεις σουμοϋλίωσης στην αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α στις λυσίνες -391, -437 που βρίσκονται εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD [54]. Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες για το αν η σουμοϋλίωση αυτή σταθεροποιεί τον HIF-1α παρεμποδίζοντας άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η ουβικτινίωση [54] ή τον οδηγεί σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα προκαλώντας κατά την υποξία τη VHL εξαρτώμενη πολυουβικτινίωση του [55].

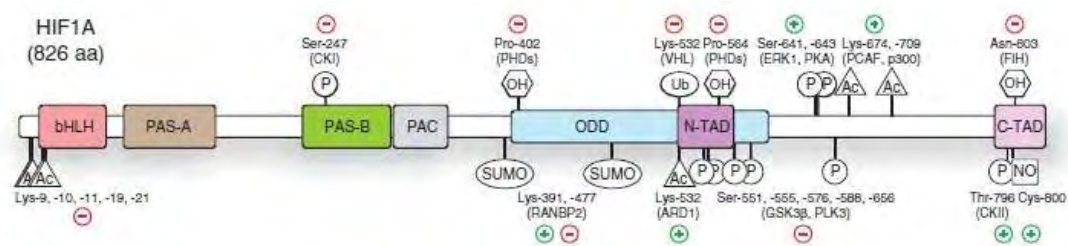
- *Φωσφορυλίωση*

Από τον αρχικό χαρακτηρισμό του HIF-1α ως φωσφοπρωτεΐνη [56], έχουν ανακαλυφθεί πολλές θέσεις και μηχανισμοί φωσφορυλίωσης που ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη δράση του. Ένας θετικός ρυθμιστής του HIF-1α είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης CK2 (Casein Kinase 2), αναστολή της οποίας οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 [57]. Ταυτοποιήθηκε μια θέση φωσφορυλίωσης από την CK2 στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α (Thr⁷⁹⁶) που βρίσκεται εντός της C-TAD. Η φωσφορυλίωση στη θέση αυτή, επάγει τον HIF-

1α παρεμποδίζοντας την ανασταλτική υδροξυλίωση του HIF-1α από την FIH υδροξυλίωση [53,58]. Τη σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, φαίνεται να προάγει και η δράση της κινάσης ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) που φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη σερίνη -696. Η ATM κινάση επάγεται σε συνθήκες υποξικού στρες και η δράση της στοχεύει στην απορρύθμιση του mTORC1 μέσω της ελεγχόμενης από τον HIF-1 επαγωγής γονιδίων στόχων [59].

Από την άλλη, έχουν ταυτοποιηθεί τρία αμινοξικά κατάλοιπα εντός της N-TAD του HIF-1α, φωσφορυλίωση των οποίων δρα αποσταθεροποιητικά για την πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στα αμινοξέα Ser⁵⁵¹, Thr⁵⁵⁵ και Ser⁵⁸⁹ προωθώντας την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το οξυγόνο και τον pVHL [60]. Μια ακόμα φωσφορυλίωση, από την Plk3 (Polo-like-kinase 3) στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser⁵⁷⁶ και Ser⁶⁵⁷, φαίνεται να αποσταθεροποιεί επίσης τον HIF-1α [61]. Επιπλέον, εκτός από τις επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης και οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης, αμινοξικά κατάλοιπα που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης του HIF-1α ταυτοποιήθηκαν και εντός της PAS-B επικράτειας διμερισμού με τον ARNT. Βρέθηκε ότι η κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ) φωσφορυλιώνει την σερίνη -247, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συγκρότηση ενεργού συμπλόκου με τον ARNT [62]. Έτσι, μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με αποτέλεσμα να ελατώνεται η συγκέντρωση της λιπίνης-1 και η συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας [16]. Επίσης, ο HIF-1α ρυθμίζεται από τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες Cdk1 και Cdk2. Έχει ταυτοποιηθεί ένα κατάλοιπο φωσφορυλίωσης από την Cdk1 στη σερίνη -668 που προτάθηκε ότι αποτρέπει την αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα [63]. Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις Cdk1 και Cdk2 με σταθεροποίηση ή αντίστοιχα αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στα λυσοσώματα και όχι στο πρωτεάσωμα [64]. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η PKA τροποποιεί τον HIF-1α και αυξάνει τόσο την σταθερότητα του όσο και την μεταγραφική του ενεργότητα επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση του με τον συμπάραγοντα p300 [65].

Τέλος, μεγάλης σημασίας για τη ρύθμιση του HIF-1α είναι η φωσφορυλίωσή του από τις ERK1/2 (p44/p42 MAPK) που αναλύεται στη παράγραφο 1.4.



Εικόνα 1. 5 Αναπαράσταση της δομής του HIF-1α με ενδείξεις για τις θέσεις διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, των ενζύμων που τις καταλύουν και του θετικού ή αρνητικού ρόλου της τροποποίησης στη λειτουργικότητα του HIF-1α [9].

1.3.3 Ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα

Βασικό στάδιο για τη δράση κάθε μεταγραφικού παράγοντα είναι η εισαγωγή του στον πυρήνα. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς αυτής ρυθμίζεται από την ισχύ των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που διαθέτει και από την διαθεσιμότητα των ιμφορτινών που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά. Έχουν εντοπιστεί δύο κλασικά διμερή σήματα πυρηνικού εντοπισμού στην αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α. Το ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-74) και το δεύτερο στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756), αλλά πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS είναι λειτουργικό. Τα κλασικά σήματα πυρηνικού εντοπισμού συνήθως συνδέονται με μια ιμφορτίνη α και μέσω αυτής στην ιμφορτίνη β, που εκτελεί τη μεταφορά. Βρέθηκε ότι στο καρβοξυτελικό NLS του HIF-1α συνδέονται τέσσερις ισομορφές των ιμφορτινών α (α1,α3,α5 και α7). Η πληθώρα αυτή των διαθέσιμων ιμφορτινών δείχνει τη σημασία της αποτελεσματικής εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα για την άμεση ρύθμιση της απόκρισης στην υποξία [66].

Προσθέτοντας στο πλουραλισμό εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα, πειραματικά δεδομένα από το Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., έδειξαν ότι απενεργοποίηση του διμερούς καρβοξυτελικού NLS, δεν αποτρέπει την μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα. Βρέθηκε ότι οι ιμφορτίνες 4 και 7 αναγνωρίζουν ένα νέο μη κλασικό, αλλά λειτουργικό, NLS στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α (αμινοξέα 1-251) που δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως [67].

1.4 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2

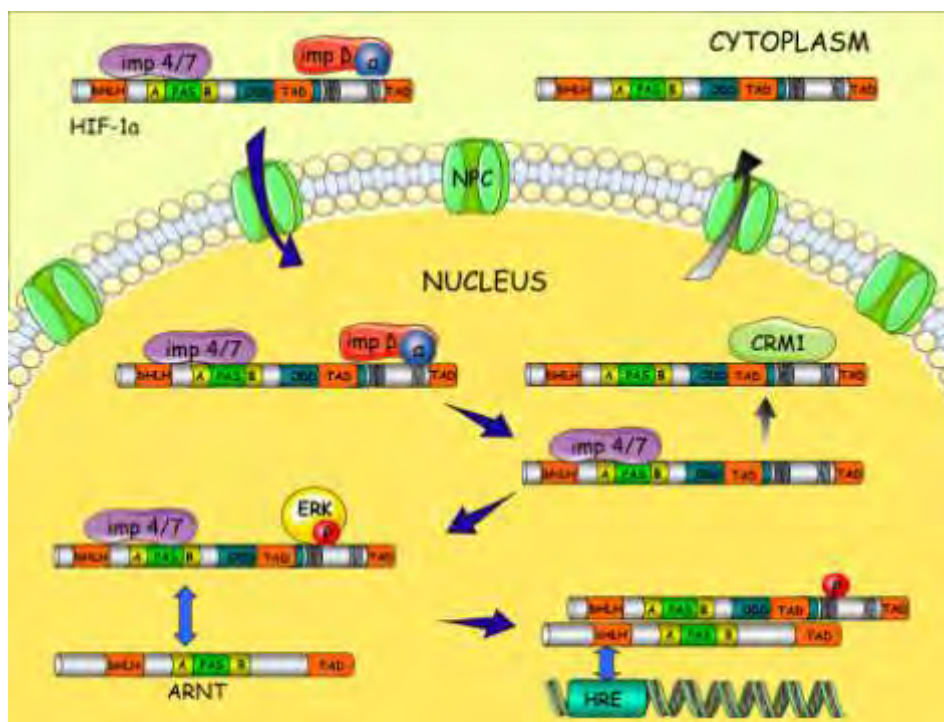
Ένας από τους σημαντικότερους και περισσότερο μελετημένους μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-1α αφορά την άμεση φωσφορυλίωση του από τις κινάσες ERK1/2. Το μονοπάτι που ενεργοποιεί τις ERK κινητοποιείται φυσιολογικά από παράγοντες αύξησης, κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια ορισμένα εκ των οποίων έχει βρεθεί ότι επάγονται σε συνθήκες υποξίας [68,69]. Επιπλέον λόγω της απορρύθμισης των ογκογονιδίων όπως τα c-Ras και c-Raf οι ERK είναι συνεχώς ενεργές σε πολλούς τύπους καρκίνου [70]. Αν και οι MAPK επάγουν το μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης και, έτσι, τον HIF-1α (Εικόνα 1. 4) η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-

1α από τις ERK1/2 παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής του ενεργότητας όπως έχει δειχθεί με την χρήση ειδικών αναστολέων των MEK (PD98059 και U0126)[71].

Από τις πρώτες μελέτες που χαρακτήρισαν τον HIF-1α ως φωσφοπρωτεΐνη είχε δειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται *in vivo* από τις MAP κινάσες και συγκεκριμένα από τις p42/p44 MAPK (ERK1/2) και όχι από τις p38 MAPK και c-Jun N-τελική κινάση [72]. Παλαιότερα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αποκάλυψαν δύο αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης (Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³) ως θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 [73]. Σημειακές μεταλλάξεις των θέσεων αυτών (σερίνη 641 και σερίνη 643 σε αλανίνη, SA) ή προσθήκη του αναστολέα PD98059 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης του HIF-1α στον πυρήνα και κατά συνέπεια τη μειωμένη δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα. Περαιτέρω διερεύνηση, σε κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή του HIF-1α SA, η οποία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, έγινε προσθήκη της Leptomycin B (LMB), που αναστέλλει τη δράση της γενικής εξαπορτίνας των θηλαστικών CRM-1 (exportin 1). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη SA μορφή να συσσωρευθεί στον πυρήνα και να ανακτήσει, μερικά, τη μεταγραφική ενεργότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου μορφή. Έτσι προτάθηκε ότι η απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 αναστέλλει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α μέσω της εξαγωγής του στο κυτταρόπλασμα [73].

Σε επόμενο στάδιο επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός ενός υδρόφοβου NES (⁶³²MEDIKILI⁶³⁹) γειτονικά στις σερίνες 641/643 που τροποποιούνται από τις ERK1/2. Φωσφομιμητική μετάλλαξη (σερίνη 641 σε γλουταμινικό, SE), έδωσε ανθεκτικό στην αναστολή από τις ERK1/2 φαινότυπο, με υψηλή πυρηνική συγκέντρωση και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Επιπλέον, οι μορφές του HIF-1α όπου έχουν μεταλλαχθεί τόσο το NES όσο και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK, ανέκτησαν τις ιδιότητες της αγρίου τύπου μορφής του HIF-1α όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την ενεργότητα [74].

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στο παρακάτω μοντέλο ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Σύμφωνα με αυτό, προτείνεται, ότι μετά τη σταθεροποίησή του HIF-1α, αυτός αλληλεπιδρά τις ιμφορτίνες και εισάγεται στον πυρήνα. Εκεί, αν το μονοπάτι των ERK είναι ενεργό, όπως παρατηρείται σε έντονα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τότε οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απόκρυψη ενός εξαρτώμενου από την CRM1 σήματος πυρηνικής εξαγωγής. Έτσι ο HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Αντίθετα, εάν το μονοπάτι των ERK είναι ανενεργό, τότε η CRM1 προσδένεται στο NES και εξάγει τον HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωσή του στον πυρήνα και τη μεταγραφική του ενεργότητα σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1. 6 Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Ο HIF-1α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα, όπου, αλληλεπιδρά με την CRM1 και εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλη ενεργοποίηση των ERK1/2, έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του, την απόκρυψη του NES και την συσσώρευση του στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους της υποξίας [75].

1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ακανόνιστη, μη λειτουργική αγγειογένεση. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη δημιουργία ενός υποξικού μικροπεριβάλλοντος που επάγει την σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1α. Με τη σειρά τους οι HIFs, ενεργοποιώντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ρυθμίζουν την προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

Συγκεκριμένα ο HIF-1, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF, ANGPT-2, iNOS) [76], και τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπέρ της γλυκόλυσης (GLUT-1, HK2) [77], συμβάλλοντας στη παροχή οξυγόνου και την άμεση κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του αυξανόμενου όγκου. Πέρα από τη ρύθμιση της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης, ο HIF-1 αναστέλει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-CoA, άρα την είσοδό του στον κύκλο του Krebs, καθώς επάγει τα επίπεδα της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK-1). Ενώ, επάγοντας τα επίπεδα της LDH-A (Lactate Dehydrogenase A) προωθεί τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ [78]. Έτσι μειώνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια μειώνονται η κατανάλωση μοριακού οξυγόνου και η παραγωγή ROS. Σε αυτό συμβάλλει και η αύξηση της αποδοτικότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, λόγω της αντικατάστασης του τέταρτου συμπλόκου που έχει

δράση οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX4-1 σε COX4-2), στη οποία συμβάλλει η δράση του HIF-1 [2]. Η πρόσληψη γλυκόζης είναι πολύ αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, ακόμα και σε συνθήκες όπου η οξειδωτική φωσφορυλίωση δε μεταβάλλεται. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ αυξάνει κατά πολύ το όξινο φορτίο του κυττάρου. Αυτό ρυθμίζεται από επαγόμενους από τον HIF-1 μεταφορείς (monocarboxylate transporters MCTs) που εξάγουν το γαλακτικό οξύ με συμμεταφορά H^+ ρυθμίζοντας έτσι το pH τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον του [77]. Ως αποτέλεσμα, το όξινο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο η μεταβολή του pH δεν είναι η μόνη επίδραση των HIF1 στον εξωκυττάριο χώρο του υποξικού ιστού. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 επάγει την σύνθεση μιας ομάδας υδροξυλασών του κολλαγόνου (P4HA1, P4HA2, PLOD2), που δρουν αναδιοργανώνοντας το εξωκυττάριο πλέγμα σε φυσιολογικά και καρκινικά υποξικά κύτταρα [79].

Ο HIF-1 εμπλέκεται σε όλη τη βιολογία του καρκίνου και ο ρυθμιστικός του ρόλος έχει περιγραφεί, μεταξύ άλλων, στη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων [80], τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, την δυνατότητα να διαφεύγουν από ανοσοποιητικό έλεγχο [81], την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, την μετάσταση [82] και την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία [83].

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, ο HIF-1α σταθεροποιείται από την υποξία καθώς σταματάει η οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμησή του, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τα μονοπάτια PI3K/AKT και MAPK (Εικόνα 1. 4). Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από συσσώρευση μεταλλάξεων που δρουν απορρυθμίζοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν τον HIF-1α. Έτσι, η παραγωγή του παραμένει σε υψηλά επίπεδα και ανεξάρτητα από την παροχή οξυγόνου. Άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VHL αναστέλουν την εξαρτώμενη από το οξυγόνο αποικοδόμηση των HIFα υπομονάδων, σχετίζονται με το νεφρικό καρκίνωμα [84] και συνιστούν ξεχωριστό κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο [85]. Κατά παρόμοιο τρόπο, μεταλλάξεις στο γονίδιο του ενζύμου αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH), οδηγεί σε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος που εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλει τη δράση των PHDs, σταθεροποιώντας τον HIF-1α [86]. Επιπλέον, μόρια που ενεργοποιούνται καταβολικά του μονοπατιού του ογκογονιδίου *Src*, επάγουν την παραγωγή ROS, τα οποία μειώνουν το διαθέσιμο ασκορβικό οξύ, αναστέλλοντας έτσι τη δράση των PHDs [87].

Η υπερέκφραση του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα επιβεβαιώνεται από πάρα πολλά κλινικά δεδομένα βιοψιών που προέρχονται από διάφορες μορφές ανθρώπινων όγκων. Τα υψηλά επίπεδα των HIF σε όγκους σχετίζονται με κακή πρόγνωση, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης και υψηλή θνησιμότητα [1]. Αν και δεν έχει επιτευχθεί άμεση στόχευση του HIF,

κλινικές δοκιμές και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι θα μπορούσε να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου, ενώ φάρμακα που δρουν έμμεσα, παρεμποδίζοντας μονοπάτια που επάγουν τους HIFs έχουν ήδη μερική επιτυχία σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου [88].

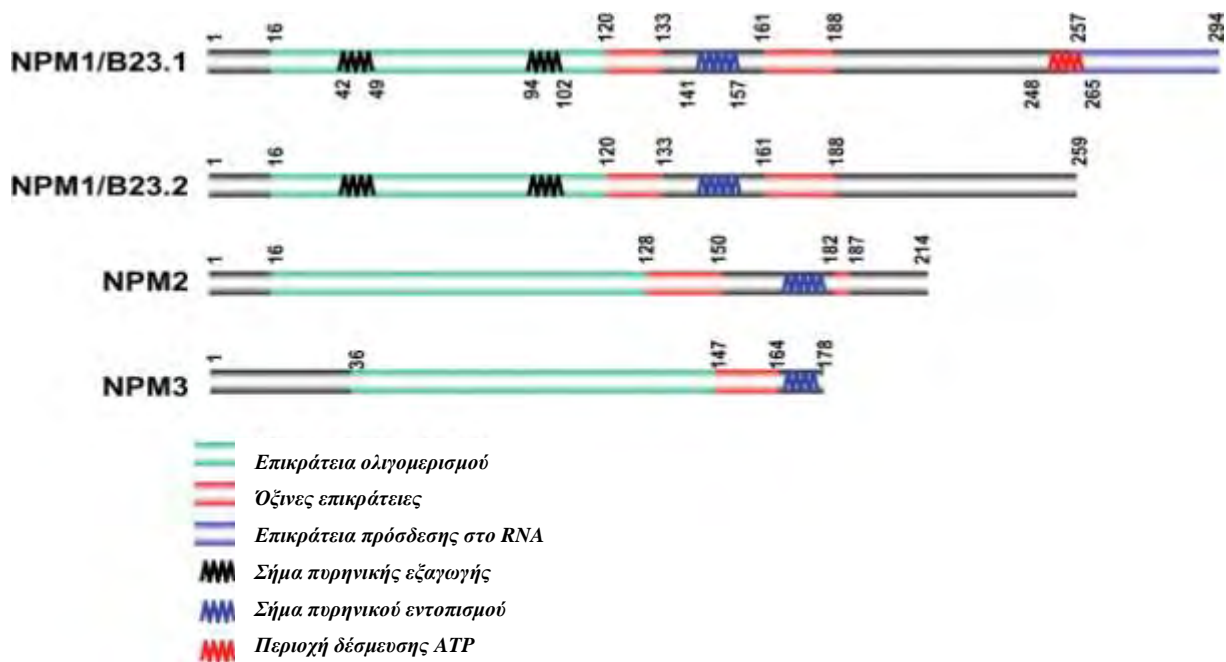
1.6 ΝΟΥΚΛΕΟΦΩΣΜΙΝΗ

Η νουκλεοφοσμίνη (NPM1, B23) είναι μια πολυλειτουργική, όξινη, φωσφοπρωτεΐνη του πυρηνίσκου, που εκφράζεται σε αφθονία σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε έντονα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα [89]. Αποτελεί μέλος της οικογένειας μοριακών συνοδών, που είναι γνωστή ως νουκλεοφοσμίνη/νουκλεοπλασμίνη (NPM) και στα κύτταρα θηλαστικών περιλαμβάνει, εκτός από την NPM1, τις NPM2 και NPM3 [90]. Η NPM2 εκφράζεται ιστοειδικά στα ωοκύτταρα όπου έχει δράση μοριακού συνοδού των ιστονών και αναδιαμόρφωσης του DNA [91], ενώ η NPM3 είναι το πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένο μέλος και εκφράζεται παντού ρυθμίζοντας τη λειτουργία των άλλων μελών της οικογένειας [92]. Ωστόσο η νουκλεοφοσμίνη (NPM1) είναι το καλύτερα μελετημένο μέλος των NPM, με μεγάλο εύρος λειτουργιών σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.

1.6.1 Δομή

Η νουκλεοφοσμίνη είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό μέγεθος 35 kDa. Εμφανίζει δύο ισομορφές εναλλακτικού ματίσματος τις B23.1 και B23.2 που αποτελούνται 294 και 259 αμινοξέα, αντίστοιχα. Οι δύο ισομορφές διαφέρουν στη καρβοξυτελική περιοχή, καθώς στη B23.1 εντοπίζεται μια βασική επικράτεια 35 επιπλέον αμινοξέων που σχετίζεται με την πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων, ενώ είναι σημαντική και σε πολλές ακόμα λειτουργίες [89].

Στη περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα από δύο όξινες επικράτειες, υπάρχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας NPM και εντός της επικράτειας ολιγομερισμού η νουκλεοφοσμίνη διαθέτει δύο σήματα πυρηνικής εξαγωγής που είναι εξαρτώμενα από τη CRM-1. Έτσι, ενώ η νουκλεοφοσμίνη είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στις κοκκιώδεις δομές (granules) του πυρηνίσκου, έχει την δυνατότητα να μετατοπίζεται από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα και κυτταρόπλασμα. Αυτό γίνεται στο πλαίσιο συγκεκριμένων λειτουργιών και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ενώ σχετίζεται και με τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης, καθώς έχει προταθεί ότι στον πυρηνίσκο εντοπίζεται κυρίως η πενταμερής δομή ενώ, το μονομερές εντοπίζεται κυρίως στο νουκλεόπλασμα [93].



Εικόνα 1. 7 Αναπαράσταση των δομικών υποπεριοχών των μελών της οικογένειας NPM [89]

1.6.2 Λειτουργία

Η νουκλεοφοσμίνη συμμετέχει σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες και έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη βιογένεση του ριβοσώματος και τη μεταφορά των ριβοσωμικών υπομονάδων στο κυτταρόπλασμα, με την ακεραιότητα του γενετικού υλικού [94] και την αναδιοργάνωση της χρωματίνης [95], το διπλασιασμό του κεντροσώματος [96], την p-53 εξαρτώμενη απόπτωση και την απόκριση του πυρηνίσκου σε συνθήκες στρες [97].

- Βιογένεση του ριβοσώματος

Το ριβοσωμικό DNA μεταγράφεται στον πυρηνίσκο και κωδικοποιεί τις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 5.8S και 18S rRNAs. Η νουκλεοφοσμίνη έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής, μέσω της ιδιότητας της να δεσμεύεται στα νουκλεϊκά οξέα, αλλά και ως μοριακή συνοδός των ιστονών ωστόσο τα δεδομένα γύρω από την επίδρασή της στο μηχανισμό της μεταγραφής του rDNA είναι ασαφή [95]. Επιπλέον η νουκλεοφοσμίνη φέρει ενδογενή ενεργότητα ριβονουκλεάσης, που ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό από την καρβοξυτελική επικράτεια της B23.1 και έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην ωρίμανση των pre-rRNAs [98]. Οι ιδιότητες της B23.1 μέσω της C-τελικής της επικράτειας να δεσμεύει νουκλεϊκά οξέα και να δρα ως ριβονουκλεάση εξαρτώνται από τη δομή ολιγομερισμού της και το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα η λειτουργική ομο-πενταμερής δομή, μπορεί να ανασταλλεί όταν ολιγομερίζεται με την B23.2 ισομορφή και την NPM3 που δεν φέρουν την C-τελική επικράτεια [92]. Την ίδια επίδραση στην ενεργότητα της C-τελικής επικράτειας έχει η φωσφορυλίωση της από την cdc2/Cyclin B κινάση κατά την έναρξη της μίτωσης [99]. Επιπλέον, φαίνεται ότι η νουκλεοφοσμίνη παίζει ενεργό ρόλο στη μεταφορά των ριβοσωμικών υπομονάδων στο

κυτταρόπλασμα. Έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την ριβοσωμική πρωτεΐνη-συνοδό L5 και βοηθά στην εξαγωγή της από τον πυρήνα μέσω ενός CRM1-εξαρτώμενου σήματος πυρηνικής εξαγωγής [100].

- Διπλασιασμός του κεντροσώματος

Πειραματικά δεδομένα φανερώνουν ότι η νουκλεοφοσμίνη βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με τα μη διπλασιασμένα κεντροσώματα και η CDK2/Cyclin E εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της, κατά την έναρξη της φάσης S οδηγεί στην απομάκρυνση της και την έναρξη του διπλασιασμού των κεντροσωμάτων [96].

- Ρύθμιση της μεταγραφής

Η νουκλεοφοσμίνη φαίνεται πως εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής με διάφορους τρόπους. Ως πρωτεΐνη μοριακή συνοδός βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι αλληλεπιδρά με ακετυλ-τρανσφεράσες και προωθεί την ακετυλίωση τόσο των ιστονών όσο και της ίδιας. Η ακετυλιωμένη μορφή της νουκλεοφοσμίνης έχει αυξημένη αγκιστεία για τις ακετυλιωμένες ιστόνες συμβάλλοντας, έτσι, στην αποδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων και την ενίσχυση της μεταγραφής [101]. Επιπρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι η ακετυλίωση αυτή γίνεται ειδικά από την ακετυλ-τρανσφεράση p300 και, τελικά, οδηγεί στην συσσώρευση της νουκλεοφοσμίνης στο νουκλεόπλασμα, όπου συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ενεργό σύμπλοκο της μεταγραφής και την RNA πολυμεράση II στις περιοχές υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον παράγοντα νέκρωσης καρκινικού όγκου TNF- α . Αποσιώπηση της p300 και μετάλλαξη των θέσεων ακετυλίωσης μείωσε σημαντικά την μεταγραφή του TNF γονιδίου, ενώ τα αντίθετα αποτελέσματα είχε η υπερέκφραση της νουκλεοφοσμίνης ή η αποσιώπηση της απακετυλάσης SIRT1, τονίζοντας τη σημασία της ακετυλίωσης της νουκλεοφοσμίνης για την επαγωγή του μεταγραφικού της ρόλου [102].

- Νουκλεοφοσμίνη και υποξία

Σύμφωνα με μια μελέτη σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, η νουκλεοφοσμίνη επάγεται από την υποξία και βρέθηκε ότι ο υποκινητής του γονιδίου *NPM1* φέρει ένα λειτουργικό HRE ειδικό για τον HIF-1. Μάλιστα προτάθηκε ότι η επαγόμενη από την υποξία νουκλεοφοσμίνη προστατεύει το κύτταρο από την p53-εξαρτώμενη απόπτωση, καθώς αλληλεπιδρά με την p53 και την αναστέλλει, αποτρέποντας την φωσφορυλίωση της στη σερίνη-15 [103].

- Νουκλεοφοσμίνη και καρκίνος

Η νουκλεοφοσμίνη έχει συνδεθεί τόσο με την προστασία από τον καρκίνο όσο και με την προώθησή του. Στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται υπερεκφρασμένη και θεωρείται καρκινικός δείκτης για όγκους όπως αυτοί του του προστάτη, των ωοθηκών, του στομάχου και του παχέος εντέρου. Το γονίδιο *NPM1* έχει βρεθεί ότι αποτελεί στόχο του ογκογονιδίου *c-Myc*, ενώ

μεταλλάξεις του είναι πολύ συχνές σε καρκίνους του αιμοποιητικού συστήματος όπως η οξεία προμυελοτική λευκαμία [104].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνεται ειδικά από τις ERK1/2 και ότι η φωσφορυλίωση αυτή επάγει την πυρηνική του συσσώρευση και τη μεταγραφική του ενεργότητα σε συνθήκες υποξίας. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας για την επίδραση που έχει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2, στην αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα με άλλες πρωτεΐνες και πως αυτές, με τη σειρά τους, επηρεάζουν τις λειτουργίες του HIF-1α.

Προηγούμενα πειράματα συγκατακρήμισης από κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας ως δόλωμα τις μεταλλαγμένες μορφές ενός πεπτιδίου του HIF-1α και ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας έδειξε ότι μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α μπορεί να είναι η νουκλεοσομίνη (NPM1).

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και νουκλεοσομίνης, της εξάρτησης της από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2, καθώς και της επίδρασης που έχει στην κυτταρική λειτουργία του HIF-1α. Η επίτευξη του παραπάνω στόχου προϋποθέτει επαλήθευση του αποτελέσματος της φασματοσκοπίας μάζας με ανοσοαποτύπωση και τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης με μεγαλύτερου μεγέθους μορφές του HIF-1α. Ακολούθως, την μελέτη της επίδρασης της ενεργοποίησης του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση των ενδογενών HIF-1α/νουκλεοσομίνης με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και δοκιμές ανοσοκατακρήμισης. Τέλος, την διερεύνηση του ρόλου της νουκλεοσομίνης στην δράση του HIF-1α.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα BL21-RIL (Invitrogen). Τα κύτταρα αυτά έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη. Χρησιμοποιήθηκαν για υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκινικά κύτταρα του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας.

3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Από την εταιρεία BIOCHROME (Biochrome, U.K.) χρησιμοποιήθηκαν

- Θρεπτικά υγρά DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) high glucose
- οροί βόειου εμβρύου (FBS)
- αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη

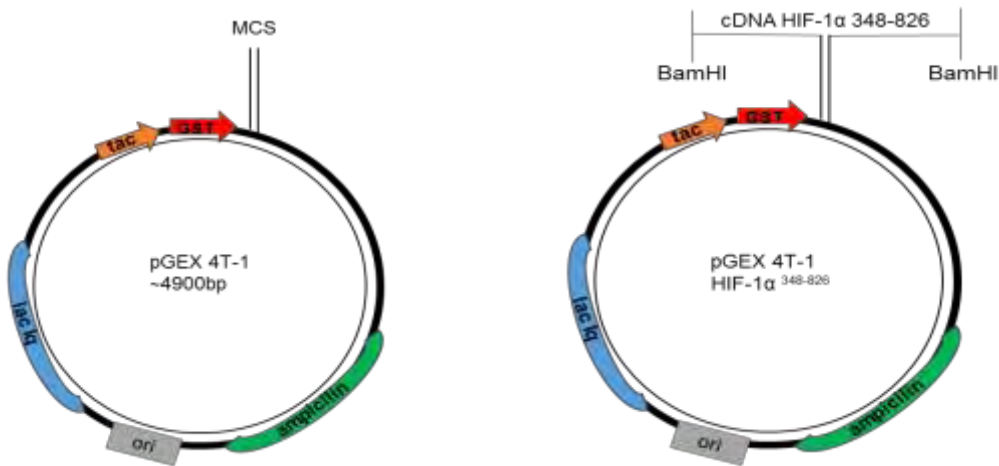
3.1.4 Χημικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma Aldrich (USA), AppliChem (USA), Merck (Germany), Biosolve (France), Becton Dickinson and Company (USA).

3.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς

- pGEX-4T-1

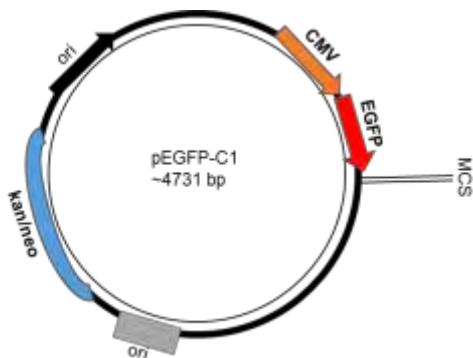
Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 φέρει τον υβριδικό υποκινητή tac και εκφράζει ανασυνδυασμένη S τρानσφεράση της γλουταθειόνης (GST) του οργανισμού *Schistosoma japonicum*. Χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST και τμημάτων του HIF-1α (αμινοξέα 348-826) σε σύντηξη με την GST σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL. Τα cDNA ενθέματα HIF-1α (348-826) είτε ήταν της αγρίου τύπου μορφής, είτε έφεραν μεταλλάξεις που κωδικοποιούσαν για τις μορφές HIF-1α (348-826) SA (σερίνη 641 και 643 σε αλανίνη) και SE (σερίνη 641 σε γλουταμινικό). Ο πλασμιδιακός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικιλίνη. Οι πλασμιδιακές κατασκευές και τα μεταλλάγματα δημιουργήθηκαν σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες αυτού του εργαστηρίου [73].



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGEX 4T-1 και του κλωνοποιημένου cDNA.

- pEGFP- C1

Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του κλωνοποιημένου cDNA του HIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Φέρει τον ιικό υποκινητή CMV και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη και στην νεομυκίνη, για επιλογή σε κύτταρα θηλαστικών. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε σύντηξη με την GFP (green fluorescent protein). Τα cDNA ενθέματα του HIF-1α κωδικοποιούσαν είτε για την αγρίου τύπου μορφή, είτε φέροντας μεταλλάξεις, κωδικοποιούσαν για τις μορφές HIF-1α IA/SA (ισολευκίνη 637, λευκίνη 638, ισολευκίνη 639 σε αλανίνες και σερίνη 641, 643 σε αλανίνες) και SE (σερίνη 641 σε γλουταμινικό). Οι πλασμιδιακές κατασκευές και τα μεταλλάγματα δημιουργήθηκαν σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου [74].



Εικόνα 3. 2 Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1

3.1.6 Υλικά χρωματογραφίας

- Σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης (Macherey-Nagel). Τα σφαιρίδια αυτά φέρουν ανηγμένη γλουταθειόνη που αποτελεί υπόστρωμα για την S-τρασνφεράση της γλουταθειόνης (GST). Χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των GST χμαιοτικών

πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας και πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down assays).

- Σφαιρίδια protein G. Τα σφαιρίδια αυτά αποτελούνται από αγαρόζη και φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένη πρωτεΐνη G του στρεπτόκοκκου και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για μεγάλο εύρος ανοσοσφαιρινών. Χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.
- Σφαιρίδια GFP-Trap (Chromotek). Τα σφαιρίδια αυτά αποτελούνται από αγαρόζη και έχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένη πάνω τους μια τροποποιημένη επικράτεια της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος έναντι της GFP. Χρησιμοποιούνται για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης GFP-χμαιοκικών πρωτεϊνών.

3.1.7 Εκκινητές

Στα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA με RT-PCR του γονιδίου *P4HA1-1* που είναι στόχος του HIF-1 χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

Νοηματικός: 5'-AGGGGTTGCTGTGGATTACC-3'

Αντινοηματικός: 5'-GTCATGTACTGTAGCTCGGC-3'

3.1.8 Αντισώματα

Πίνακας 1. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Προέλευση
anti-HIF-1α	κουνέλι	1:1000	Πολυκλωνικό	[42]
anti-NPM1	κουνέλι	1:2000 1:1000	Πολυκλωνικό	EMD Millipore
anti-HIF-1α	ποντίκι	1:500	Μονοκλωνικό	BD Bioscience
anti-GST	κουνέλι	1:10000	Πολυκλωνικό	[73]
anti-ARNT	ποντίκι	1:500	Μονοκλωνικό	BD Bioscience
anti-GFP	κουνέλι	1:10000	Πολυκλωνικό	[73]
anti-p44	κουνέλι	1:1000	Πολυκλωνικό	Cell Signaling
Anti-Pp44	ποντίκι	1:1000	Μονοκλωνικό	Cell Signaling

3.1.9 Απομόνωση RNA(kit)

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoZol της εταιρείας Macherey-Nagel.

3.1.10 Μέσα παροδικής επιμόλυνσης

Το χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική επιμόλυνση τόσο με πλασμιδιακό DNA όσο και με siRNA ήταν το jetPRIME reagent της εταιρείας Polyplus-transfection.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τη δημιουργία βακτηριακών κυττάρων που μπορούν εύκολα να προσλάβουν πλασμιδιακούς φορείς με κλωνοποιημένο ένθεμα ετερόλογου DNA. Κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων με κατιόντα ασβεστίου Ca^{2+} εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης. Το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA μπορεί πλέον να πλησιάσει το βακτήρια και με κατάλληλο θερμικό σοκ να εισαχθεί σ'αυτά.

Αρχικά εμβολιάστηκαν 5ml διαλύματος TYM (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0,1 M NaCl, 10mM $MgSO_4$) με βακτήρια *E.Coli* BL21-RIL (βρίσκονται σε διάλυμα αποθήκευσης με γλυκερόλη στους $-80^{\circ}C$), παρουσία χλωραμφενικόλης (100 μ g/ml). Η καλλιέργεια επωάστηκε για 12-16 ώρες στους $37^{\circ}C$ υπό ανάδευση. Από αυτήν την καλλιέργεια εμβολιάστηκαν 5 ml θρεπτικού υλικού TYM ώστε να επιτευχθεί αραιώση 1:100. Η νέα καλλιέργεια επωάστηκε για 2-3 ώρες στους $37^{\circ}C$ υπό ανάδευση. Κατόπιν εμβολιάστηκαν με 1 ml από την καλλιέργεια αυτή 50 ml θρεπτικού μέσου TYM, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επωάστηκε στους $37^{\circ}C$ μέχρις ότου η οπτική της πυκνότητα φτάσει $OD_{600} = 0.35 - 0.4$. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση 4000 x g για 5 λεπτά στους $4^{\circ}C$ και αιωρήθηκαν σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-I (100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% γλυκερόλη και 100 mM CH_3COOK με pH 7), και επωάστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4000 x g και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη με pH 7). Το αιώρημα επωάστηκε σε πάγο για 60 min και τελικά μοιράστηκε σε κλάσματα των 100 μ l σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου erendorff) που αποθηκεύτηκαν στους $-80^{\circ}C$.

3.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων

Η πρόσληψη πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα αποτελεί φυσιολογική τους ιδιότητα. Η στοχευμένη είσοδος πλασμιδιακού φορέα κλωνοποιημένου με επιθυμητή αλληλουχία DNA βρίσκει εφαρμογή στη Βιοτεχνολογία και στοχεύει στην έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα.

Στη παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL. Σε 50 μ l του αιωρήματος των δεκτικών βακτηρίων προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA (50-100 ng DNA). Τα κύτταρα επωάστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για 2 λεπτά στους $42^{\circ}C$. Κατόπιν προστέθηκε θρεπτικό υλικό 0,5 ml L.B. (LURIA BROTH-Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και ακολούθησε επώαση των βακτηρίων για τουλάχιστον 1 ώρα στους $37^{\circ}C$. Μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις 5000 x g αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και στο εναπομείναν έγινε επαναιώρηση

των κυττάρων. Το 1/10 του αρχικού αιωρήματος μετασχηματισμού (~500μl), στο παρόν πείραμα 50 μl, επιστρώθηκε στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (2% άγαρ) που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

Την επόμενη μέρα εμβολιάστηκαν 25 ml L.B. με μια αποικία παρουσία αντιβιοτικών αμπικιλίνης και χλωραμφαινικόλης. Τα κύτταρα *E. coli* συνθέτουν το ένζυμο ακετυλτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης, ενώ τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα φέρουν πλέον γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Η υγρή καλλιέργεια επωάστηκε στους 37°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm).

3.2.3 Επαγωγή της υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στόχου βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του καταστολέα lac, του υβριδικού tac υποκινητή (παράγραφος 3.1.5.). Η βάση, πάνω στην οποία επιτυγχάνεται η επαγωγή της έκφρασης, αφορά την προσθήκη στη καλλιέργεια ενός χημικού ανάλογου της λακτόζης/αλλολακτόζης, του IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Το IPTG έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται και να σταματάει τη δράση του καταστολέα lac, χωρίς όμως να μεταβολίζεται από τα ένζυμα του lac οπερονίου, παραμένοντας έτσι σταθερό στη συγκέντρωση που το προσθέσαμε στη καλλιέργεια.

Από την αρχική καλλιέργεια των 25 ml εμβολιάστηκαν 4 ml σε 400 ml L.B. και επωάστηκαν στους 37°C για 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm). Η επώαση διακόπηκε όταν η ανάπτυξη των βακτηρίων έφτασε στο μέσο της φάσης εκθετικής αύξησης ($O.D._{600} = 0.4-0.6$). Κρατήθηκε 1 ml δείγμα ελέγχου πρωτεϊνοσύνθεσης προ της επαγωγής των γονιδίων που ελέγχονται από το υποκινητή tac (-IPTG). Στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστέθηκαν 40 μl IPTG (0.1 mM) και ακολούθησε επώαση στους 28°C υπό ανακίνηση για 1.5 ώρα. Κρατήθηκε 1 ml δείγμα ελέγχου της επαγωγής της έκφρασης (+IPTG). Τα δείγματα - και + IPTG φυγοκεντρήθηκαν 4 λεπτά 5000 x g. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επανααιωρήθηκε σε 40 μl αποστειρωμένου H₂O. Προστέθηκε 4x Sample buffer (200mM Tris-HCl pH 6.8, 400mM DTT, 8% SDS, 0.4% bromophenol blue, 40% glycerol, EDTA) και DTT και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο για 20 λεπτά 5000 x g 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επανααιωρήθηκε με αποστειρωμένο H₂O. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε 15 λεπτά 5000 x g 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -20°C.

3.2.4 Καθαρισμός ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών.

3.2.4.1 Λύση βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος.

Τα ιζηματοποιημένα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρούνται σε 8 ml διάλυμα λύσης (Lysis buffer), έτσι ώστε να διαρρηχθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και να είναι δυνατός ο διαχωρισμός του διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος.

Lysis Buffer: 20 mM Tris pH 7.6
 137 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 0.1% Triton X-100
 5 mM DTT
 1 mM PMSF

Τα αιωρημένα κύτταρα, επωαζόμενα σε πάγο, υποβάλλονται σε κατεργασία με υπερήχους για 5 λεπτά (20 sec/min, amplitude 60). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο 10.000 rpm 4°C για 30 λεπτά. Κρατείται 20 μl δείγμα υπερκειμένου (supernatant) για ανάλυση πρωτεϊνών και το υπόλοιπο χρησιμοποιείται για απομόνωση της υπερεκφρασμένης ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης. Στο ίζημα προστίθενται 1 ml διαλύματος λύσης και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επαναιωρείται και κρατείται δείγμα 20 μl για ανάλυση πρωτεϊνών.

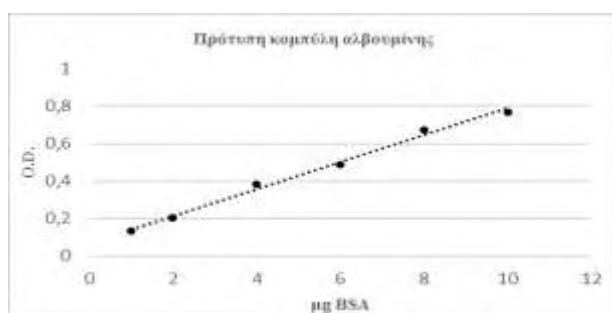
3.2.4.2 Καθαρισμός ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγγιστείας.

Ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης από ένα πρωτεϊνικό διάλυμα μπορεί να επιτευχθεί με βάση την εξειδικευμένη και αντιστρεπτή δέσμευση της, πάνω σε μόρια προσδέτες (ligands) που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω σε κάποιο αδρανές υλικό χρωματογραφίας. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τη στήλη επιτυγχάνεται είτε με τη διαβίβαση του ίδιου του ligand ή μιας δομικά ανάλογης ένωσης του από τη στήλη προκαλώντας έτσι την εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του καθηλωμένου προσδέτη και της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Στην παρούσα μελέτη ο καθαρισμός της πρωτεΐνης σύντηξης γίνεται με στήλη αγγιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Έτσι, ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα γίνεται δυνατός χάρη στην αλληλεπίδραση της δεσμευμένης γλουταθειόνης με την GST που βρίσκεται σε σύντηξη με τις πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με την διαβίβαση διαλύματος γλουταθειόνης σε περίσσεια. Σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης εξισορροπήθηκαν στο ίδιο Lysis Buffer που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Σφαιρίδια 150 μl με 5 ml διαλύματος λύσης με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Έγιναν 3 πλύσεις εξισορρόπησης των 10 λεπτών ακολουθούμενες από φυγοκεντρήσεις 3 λεπτών 3.000 rpm και αλλαγή διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε όλο το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα στην

εξισοροπημένη στήλη σφαιριδίων γλουταθειόνης σεφαρόζης και το μείγμα επωάστηκε για 1 ώρα με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ίδιο διάλυμα λύσης και ακολούθησε η έκλουση των πρωτεϊνών. Για τις εκλούσεις παρασκευάστηκε διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 10 mM σε διάλυμα Tris-HCl pH=8,0. Προστέθηκαν 400 μl διαλύματος γλουταθειόνης στα σφαιρίδια και επωάστηκαν για 3 λεπτά στους 4°C με ανάδευση κυκλικής τροχιάς. Μετά από φυγοκέντρηση 3 λεπτών 3.000 rpm το υπερκείμενο αποτελεί το έκλουσμα που περιέχει την καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να παραληφθεί και δεύτερο έκλουσμα.

3.2.4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Η μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Η χρωστική αυτή κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Biorad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μl αραιωμένα με νερό σε τελικό όγκο 1 ml είτε σαν τυφλό, είτε με προσθήκη 2 μl διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm, όπου το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παραμένει σταθερός για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μας με βάση την μετρούμενη οπτική πυκνότητα (O.D.). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).



$$y = 0.0719x + 0.0694 (R^2 = 0.993)$$

Εικόνα 3.3 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

3.2.5 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) καλλιεργούνται με θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο προστίθενται αντιβιοτικά (100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη) και 10% ορός εμβρύου βοός (FBS), μέσα σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm ή 60 mm. Επωάζονται σε υγρανόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂.

Τα κύτταρα επωάζονται και ανακαλλιεργούνται όταν το τρυβλίο κορεστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Καθώς τα κύτταρα HeLa διπλασιάζονται κάθε 14-16 ώρες αραιώνονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να χρειάζονται ανακαλλιέργεια κάθε 48 ώρες. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το κορεσμένο τρυβλίο όπου τα κύτταρα είναι προσκολλημένα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Για την αποκόλλησή τους γίνεται επίδραση με το ένζυμο θρυψίνη για 5-10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη αραιώση, και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων. Από το αιώρημα μεταφέρονται 1 ml κυττάρων σε νέα τρυβλία στα οποία έχουν προστεθεί 7 ml θρεπτικού μέσου. Η όλη κατεργασία των κυττάρων γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.2.6 Δοκιμές συγκατακρήμνισης (in vitro pull down assay) πρωτεϊνών.

Η τεχνική της συγκατακρήμνισης είναι μια μέθοδος μελέτης της in vitro πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αποτελεί το «δόλωμα» προσδένεται σε σφαιρίδια λόγω αγχιστείας του χμιαϊρικού επιτόπου που φέρει και έτσι δημιουργείται μια σταθερή φάση. Επώαση διαλυτού κυτταρικού εκχυλίσματος με το σύμπλοκο σταθερής φάσης έχει σαν αποτέλεσμα να συγκαθιζάνουν στα σφαιρίδια πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

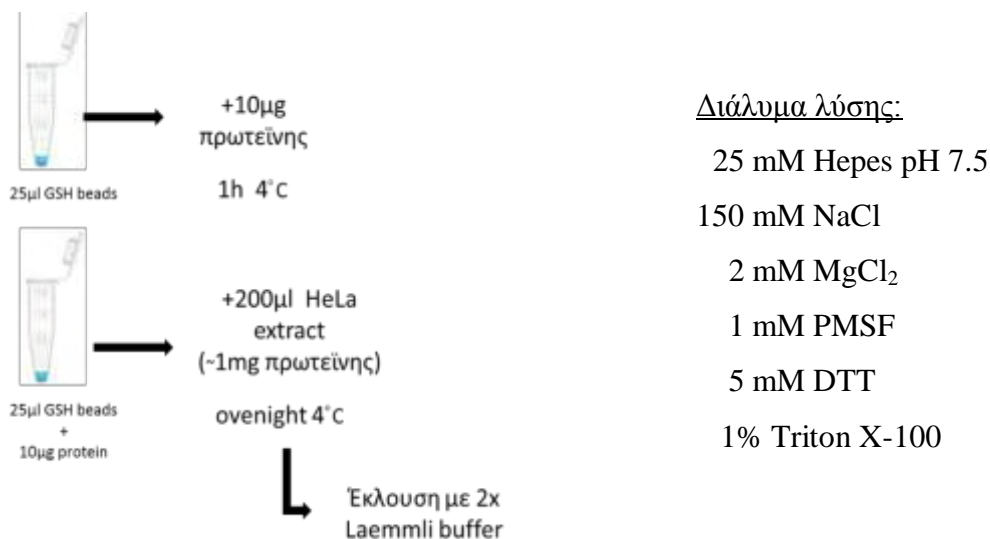
Στην παρούσα εργασία η υπό μελέτη πρωτεΐνη HIF-1α (348-826) σε διάφορες μορφές (wt, SA, SE), εκφρασμένη σε σύντηξη με GST επίτοπο, προσδέθηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης. Συγκεκριμένα 25 μl GSH σφαιριδίων εξισορροπήθηκαν με 3 πλύσεις των 10 λεπτών, με 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF), σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και η πρόσδεση στα σφαιρίδια της στήλης 10 μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με επώαση για 1 ώρα με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις.

- *Πρωτεϊνικό διάλυμα κυττάρων HeLa*

Καρκινικά κύτταρα HeLa καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm κορεσμένα κατά 90%. Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο και ξεπλένουμε με PBS 1x. Στη συνέχεια προσθέτουμε 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF), τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου και επωάζονται για μισή ώρα στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13.000 rpm 4°C για 15 λεπτά.

Στο υπερκείμενο υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και μεταφέρονται 2 mg πρωτεΐνης στους σωλήνες μικροφυγοκέντρου που περιέχουν τα σφαιρίδια με

την προσδεδεμένη σε αυτά πρωτεΐνη GST-HIF-1α (348-826). Προστίθενται 600 μl lysis buffer, το μείγμα αναδεύεται (vortex) και επωάζεται σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C για 16 ώρες.



Εικόνα 3.4 Συνοπτική αναπαράσταση του πειράματος συγκατακρήμνισης GST-HIF-1α 348-826 με HeLa extract

Την επόμενη μέρα γίνονται 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα λύσης. Μετά τις πλύσεις αφαιρείται όλο το διάλυμα λύσης με λεπτή σύριγγα έπειτα από μια επιπλέον φυγοκέντρηση 12000 rpm για 1 λεπτό. Για την έκλυση προστίθενται 2x Laemmli Buffer, γίνεται ισχυρή ανάδευση με vortex ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση 12000 rpm 2 λεπτά. Με την κατεργασία αυτή η GST αποσυνδέεται από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης και οι απομονωμένες πρωτεΐνες εμφανίζονται στο υπερκείμενο. Αυτό συλλέγεται και προετοιμάζεται για ηλεκτροφόρηση με 1 λεπτό βρασμό στους 97°C και φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση αδιάλυτων συστατικών.

3.2.7 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Ο αναλυτικός διαχωρισμός μακρομορίων που επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρηση, βασίζεται σε συγκεκριμένες αρχές της κίνησης φορτισμένων μακρομορίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) μακρομορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (q) και το συντελεστή τριβής (f).

$$v = E \cdot q / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη $E \cdot q$ που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα (ιξώδες) του μέσου. Το πηκτωμα σαν μέσο ηλεκτροφόρησης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, διευκολύνοντας τον

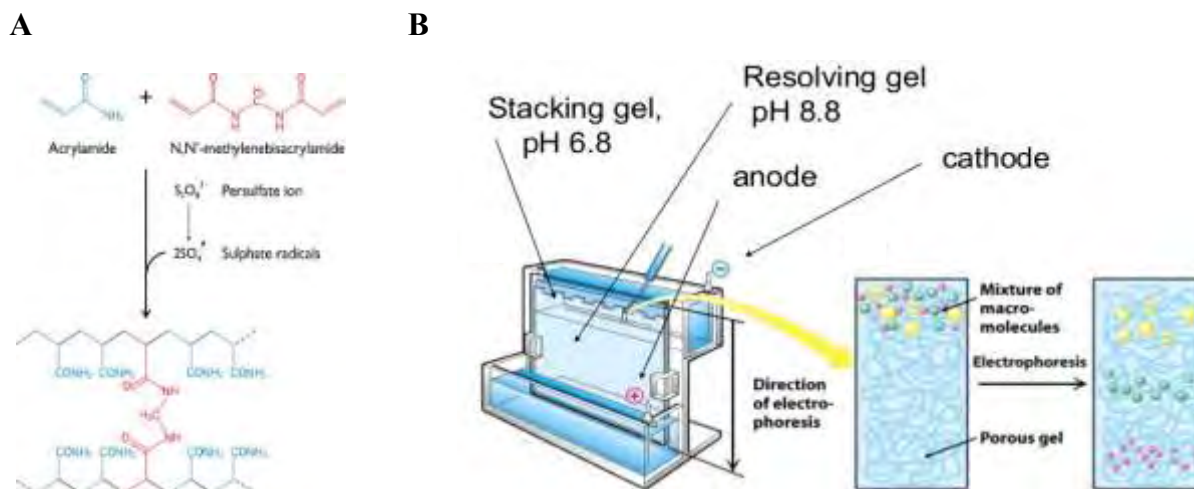
διαχωρισμό με βάση το μοριακό βάρος και το σχήμα των μακρομορίων. Επίσης ο στερεός του χαρακτήρας αποτρέπει την τυρβώδη ροή που μπορεί να δημιουργηθεί από μικρές τοπικές μεταβολές της θερμοκρασίας.

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δι-ακρυλαμίδιο (MBA) (3.5 A). Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Poly AcrylamideGel Electrophoresis, SDS-PAGE) και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που σχηματίζει υδρόφοβους δεσμούς με τις πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες κατά βάρος ποσότητες (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει επίμηκες σχήμα και καθαρό αρνητικό φορτίο. Το συνολικό φορτίο είναι ανάλογο του μοριακού βάρους ωστόσο, λόγω της ισοκατανομής του SDS, το φορτίο ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι κοινό. Προστίθεται επίσης διθειοθρεϊτόλη (DTT) που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση 5 λεπτά στους 97°C. Μετά από αυτή την κατεργασία η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται αποκλειστικά από το μοριακό τους μέγεθος. Έτσι, οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικόνα 3. 5 B).

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού – separating gel (7.5 cm ύψος, 1 mm πάχος) και το πήκτωμα επιστοιβάξης – stacking gel (2.5 cm ύψος). Οι θέσεις εισαγωγής δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό της πηκτής. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθενται πρώτα 5ml πηκτής διαχωρισμού με 10% πυκνότητα σε

πολυακρυλαμίδιο, pH 8.8. Ακολούθως παρασκευάζεται και στοιβάζεται διάλυμα πηκτώματος επιστοιβαξης 4 ml, 4.5% πυκνότητας πολυακρυλαμίδης, pH 6.8.



Εικόνα 3. 5 Α) Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. Β) Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Ανατύπωση από: Jeremy M Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, Jr. & Lubert Stryer : BIOΧΗΜΕΙΑ , Έβδομη έκδοση ©2012 Freeman and Company

Αφού πήξει, το πηκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλύπτεται πλήρως με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Τα δείγματα και δείγμα μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών πριν φορτωθούν στις θέσεις εισαγωγής δείγματος του πηκτώματος επιστοιβαξης, θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 97°C και φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V.

Παρατίθεται η χημική σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων:

Διάλυμα Διαχωρισμού:

0.375 M Tris-HCL pH 8.8
2 mM EDTA
0.1% SDS

Πήκτωμα Διαχωρισμού 10%:

Ακρυλαμίδιο 10%	1.25 ml
Διάλυμα Διαχωρισμού 1x	1.25 ml
Αποστειρωμένο H ₂ O	2.5 ml
0.04 % APS	20 μl
TEMED 1:500	10 μl

Διάλυμα Επιστοιβαξης:

0.125 M Tris-HCL pH 6.8
2 mM EDTA
0.1 % SDS

Πήκτωμα Επιστοιβαξης 4,5%:

Ακρυλαμίδιο 4.5%	0.45 ml
Διάλυμα Επιστοιβαξης 1x	1 ml
Αποστειρωμένο H ₂ O	2.5 ml
0.0625 % APS	25 μl
TEMED 1:333	12.5 μl

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

0.25 M Tris
1.92 M γλυκίνη
0.5 % SDS

Εξερχόμενες από τις θέσεις εισαγωγής δείγματος, οι πρωτεΐνες διασχίζουν 2.5 cm πηκτής επιστοιβαξης. Η πηκτή αυτή, καθώς έχει μικρή συγκέντρωση σε πολυακρυλαμίδιο (4.5%), σχηματίζει μεγάλους πόρους και έτσι οι πρωτεΐνες δε διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Κατά τη ροή προς τον θετικό πόλο ανιόντα χλωρίου Cl⁻ παρουσιάζουν υψηλή κινητικότητα και προπορεύονται των πρωτεϊνών του δείγματος, ενώ συγκρατούνται από αυτές μέσω αλληλεπιδράσεων με θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Από την άλλη, η γλυκίνη, που περιέχεται στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, στο πήκτωμα επιστοιβαξης βρίσκεται σε ένα περιβάλλον με pH 6.8, αρκετά κοντά στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI~6). Ως αποτέλεσμα παρουσιάζει χαμηλή κινητικότητα και ακολουθεί το δείγμα πρωτεϊνών. Έτσι όλες οι πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, στοιβάζονται και σχηματίζουν μια ζώνη στο τέλος του πηκτώματος επιστοιβαξης περνώντας ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Εκεί, σε βασικό περιβάλλον (pH 8.8) τα μόρια γλυκίνης ιοντίζονται και κινούνται ταχύτατα προς το θετικό πόλο, προσπερνώντας τις πρωτεΐνες οι οποίες, λόγω των μικρών πόρων που σχηματίζονται από την υψηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης (10%), διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανιχνεύονται στη παρούσα εργασία με:

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

3.2.8 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση.

Η ανοσοαποτύπωση είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη και τον εντοπισμό τους με ειδικά για αυτές αντισώματα. Η ηλεκτρομεταφορά βασίζεται στη κίνηση των αρνητικά φορτισμένων (υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS) πρωτεϊνών από τη πηκτή προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Κατά τη κίνηση αυτή οι πρωτεΐνες παγιδεύονται και αποτυπώνονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι διάφορες καθηλωμένες πρωτεΐνες φέρουν αντιγονικούς επίτοπους που αναγνωρίζονται από εξειδικευμένα αντισώματα. Αφού συνδεθεί το πρώτο αντίσωμα στη πρωτεΐνη, γίνεται χρήση ενός δευτερεύοντος αντισώματος που αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ανοσοσφαιρίνες του πρώτου. Επιπλέον το αντίσωμα αυτό είναι τροποποιημένο ώστε να βρίσκεται σε σύνδεση με ένα ένζυμο-δείκτη, όπως η υπεροξειδάση, το οποίο όταν δρα πάνω σε ένα εξωγενώς χορηγούμενο υπόστρωμα δίνει μια αντίδραση χημειοφωταύγειας, φανερώνοντας έτσι τη ζώνη της πρωτεΐνης-αντιγόνου).

Η ηλεκτρομεταφορά της πρωτεΐνης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται σε ένα σχεδόν υγρό περιβάλλον, όπου όλα τα επιμέρους υλικά έχουν εμποτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα

μεταφοράς (Transfer Buffer). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, πάνω στη πλάκα όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος, τοποθετούνται με τη σειρά:

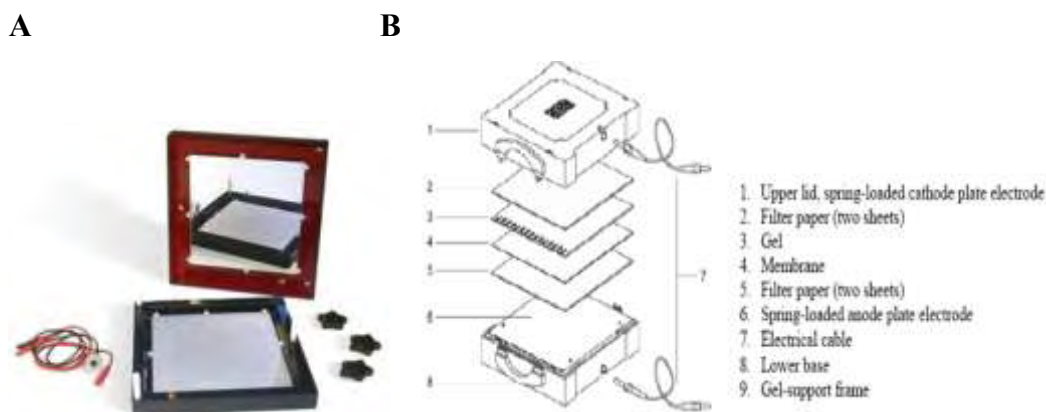
- 2 χαρτιά Whatman 3MM
- η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- η πηκτή
- 2 χαρτιά Whatman 3MM.

Transfer Buffer:

125 mM Tris-Borate (pH 8.5)

0.2% SDS

0.5 mM DTT



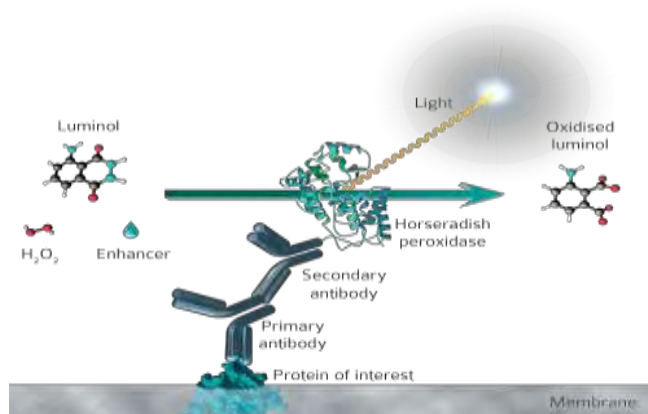
Εικόνα 3. 6 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε σχεδόν υγρό περιβάλλον (Semi-Dry Transfer). Α) Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε reqlab® Semi-Dry Blotter. Β) Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανατύπωση από: www.thermofisher.com

Καθένα από τα παραπάνω μέρη επιστρώνεται το ένα πάνω στο άλλο με ιδιαίτερη προσοχή στο να μη δημιουργούνται φυσαλίδες μεταξύ τους, καθώς αυτό θα παρεμπόδιζε τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος. Η πηκτή τοποθετείται προσανατολισμένη προς τον αρνητικό πόλο. Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται σε συνθήκες 10 V για 70 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο reqlab® Semi-Dry Blotter (VWR).

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S, έτσι ώστε να ελεγχθεί η αποτύπωση. Σημειώνονται οι ζώνες του μάρτυρα με μολύβι και ξεβάφουμε τη μεμβράνη με απεσταγμένο νερό και διάλυμα 1x PBS- 0.1% Tween 20.

Για την μέθοδο της ανοσοανίχνευσης η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις αποτυπωμένες πρωτεΐνες εμβαπτίζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού. Αυτό αποτελείται από 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20. Η καζεΐνη του γάλακτος προσδένεται σε βαθμό κορεσμού στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθά στην αποφυγή όλων των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με τη μεμβράνη. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού ή σκέτο 1x PBS – 0.1% Tween 20. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση στους 4°C για 16 ώρες. Μετά την επίδραση του 1^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 10

λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με 1x PBS – 0.1% Tween 20. Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το 2^ο αντίσωμα έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού ή ποντικού σε αραιώση 1:10000 σε διάλυμα κορεσμού. Τα δεύτερα αντισώματα, που είναι συνδεδεμένα με την Horseradish peroxidase, προέρχονται από την εταιρία Cell Signaling. Μετά τη σύνδεση του 2^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 5 λεπτών. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών προϋποθέτει την αντίδραση χημειοφωταύγειας κατά την οποία η υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων (Εικόνα 3.7). Προετοιμάζεται διάλυμα που περιέχει 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1.25 mM λουμινόλης σε Tris-Cl pH 8.5), 30 μl H₂O₂ και 100 μl κουμαρικό οξύ (6.8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) που δρα σαν ενισχυτής της αντίδρασης. Το διάλυμα επωάζεται για 1-2 λεπτά με τη μεμβράνη για να γίνει η αντίδραση. Στη συνέχεια το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού της Uvitec Alliance.



Εικόνα 3.7 Αναπαράσταση της ανοσοανίχνευσης βάση χημειοφωταύγειας. Ανατύπωση από <http://www.covalab.com>

3.2.9 Ανοσοκατακρήμνιση

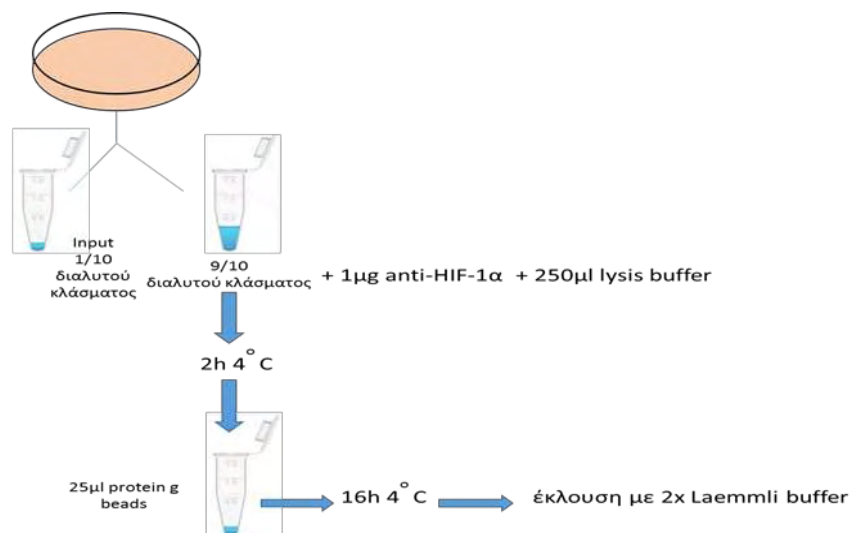
Η ανοσοκατακρήμνιση (IP) είναι μια μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνών που βασίζεται στη σχέση αντιγόνου αντισώματος. Το ειδικό για την «πρωτεΐνη-δολώμα» αντίσωμα είτε είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο, είτε έχει συγγένεια σύνδεσης για μια σταθερή φάση καθλώνοντας εκεί την πρωτεΐνη-αντιγόνο και βοηθώντας έτσι στην απομόνωση της από ένα πρωτεϊνικό κυτταρικό εκχύλισμα. Η πρωτεΐνη-αντιγόνο απομονώνεται σαν σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά φυσιολογικά στο υποκυτταρικό περιβάλλον. Έτσι, η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιείται και για τη μελέτη των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης-δολώματος.

Στη παρούσα εργασία έγιναν 2 πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Η πρωτεΐνη-δολώμα ήταν είτε ο ενδογενής HIF-1α, είτε ο GFP επίτοπος ανασυνδυασμένου HIF-1α αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων. Ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αγαρόζης. Στην καθίζηση

ενδογενούς HIF-1α έγινε χρήση σφαιριδίων με ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη G (πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή των IgG ανοσοσφαιρινών). Στην IP του GFP-χμαιοτικού HIF-1α τα σφαιρίδια αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα GFP-Trap της Chromotek τα οποία φέρουν ομοιοπολικά προσδεσμένη τη μεταβλητή επικράτεια της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος έναντι της GFP.

Σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου τοποθετούνται 25 μl σφαιριδίων-protein g ή 15 μl σφαιριδίων-anti- GFP γίνονται 3 πλύσεις εξισορρόπησης της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Hepes pH=7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) και ανάδευση κυκλικής τροχιάς. Ακολούθως, γίνεται λύση κυττάρων HeLa όπως περιγράφηκε στη μέθοδο συγκατακρήμνισης (παράγραφος 3.2.6).

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α αναπτύχθηκαν για 16 ώρες, είτε σε νορμοξία (control), είτε σε υποξία (1% O₂) στους 37°C. Μετά τη λύση τους κρατείται το 1/10 του διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος ως δείγμα ελέγχου (input) και τα υπόλοιπα 9/10 αραιώνονται με 250 μl διαλύματος λύσης και επωάζονται με 1 μg πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α για 2 ώρες στους 4°C. Έτσι προσδένεται πρώτα το αντίσωμα στη πρωτεΐνη-αντιγόνο και στη συνέχεια όλο το μείγμα μεταφέρεται στην εξισοροπημένη στήλη. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, έτσι ώστε να προσδεθεί το αντίσωμα στην protein G των σφαιριδίων αγαρόζης. Την επόμενη μέρα γίνονται τρεις πλύσεις των 10 λεπτών όπως έχουν περιγραφεί και αφού αφαιρεθεί και η τελευταία γίνεται μια φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 rpm για να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα. Η έκλυση γίνεται με προσθήκη 2x Laemli buffer, ισχυρή ανάδευση (vortex) για 30 sec και ακολουθεί φυγοκέντρηση 2 min 12000 rpm. Οι πρωτεΐνες εκλύονται στο υπερκείμενο και συλλέγονται σε νέους σωλήνες μικροφυγοκέντρου, όπου γίνεται προσθήκη 4 μl Sample buffer και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν με SDS-PAGE. Τα δείγματα αυτά δε βράζονται και δεν προστίθεται DTT για να μην αποδιαταχθούν οι ανοσοσφαιρίνες IgG του anti-HIF-1α και παρεμποδίσουν την ανάλυση των πρωτεϊνών στη πηκτή.



Εικόνα 3.8. Συνοπτική αναπαράσταση της ανοσοκατακρήμισης ενδογενούς HIF-1α.

Στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμιση ανασυνδυασμένου GFP-HIF-1α είχε γίνει παροδική επιμόλυνση με pEGFP-C1 (Εικόνα 3.10). Στη περίπτωση αυτή το αντίσωμα βρίσκεται εξ αρχής ομοιοπολικά προσδεδεμένο στα σφαιρίδια και έτσι τα 9/10 του διαλυτού κλάσματος των εκχυλισμένων κυττάρων επωάζεται κατευθείαν με τα σφαιρίδια για 3 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Οι πλύσεις και η έκλυση είναι παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν, μόνο που εδώ μετά την προσθήκη 2x Laemmli buffer και την ανάδευση 30 sec (vortex) ακολουθεί βράσιμο 2 λεπτών στους 97°C καθώς το αντίσωμα παραμένει σταθερά προσκολλημένο στα σφαιρίδια. Στις εκλουσμένες πρωτεΐνες προστίθεται 4μl 4x sample buffer και 1μl DTT φυγοκεντρώνται και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν με SDS-PAGE.

3.2.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική αυτή καθιστά εφικτή την παρατήρηση πρωτεϊνών και τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού τους. Σε κύτταρα που έχουν σταθεροποιηθεί σε καλυπτρίδες και οι μεμβράνες τους έχουν γίνει διαπερατές, γίνεται επίδραση με αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνης-αντιγόνου. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με δευτερεύον αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και φέρει συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος το οποίο προσπίπτει κάθετα στο επίπεδο των δειγμάτων. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου που φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και της νουκλεοφωσμίνης, ενώ στη συνέχεια έγινε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του συνεντοπισμού τους. Τα κύτταρα αρχικά αναπτύχθηκαν για 24 ώρες και προσκολλήθηκαν στις

καλυπτρίδες. Ακολούθως έγινε αλλαγή θρεπτικού και σε διαφορετικές συνθήκες επώαστηκαν για 16 ώρες, είτε σε νορμοξία (control), είτε σε υποξία (1% O₂) στους 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x και στερεώνονται με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με PBS 1x και έπειτα οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επίδραση 1x PBS - 0.1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C. Επαναλαμβάνονται τρεις πλύσεις με PBS 1x και στη συνέχεια γίνεται κατεργασία με διάλυμα κορεσμού 1% BSA σε 1x PBS – 0.1% Tween 20 για να καλυφθούν πιθανές θέσεις μη ειδικής αλληλεπίδρασης με το αντίσωμα. Στη συνέχεια γίνεται επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα από ορό ποντικού έναντι του HIF-1α σε αραιώση 1:500 για 16 ώρες στους 4°C. Την επόμενη μέρα γίνονται τρεις πλύσεις των 3 λεπτών με 1x PBS και ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της νουκλεοφοσμίνης σε αραιώση 1:1000 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 3 λεπτών με 1x PBS – 0.1% Tween 20. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με τα δεύτερα αντισώματα που αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες κουνελιού ή ποντικού και φέρουν φθορίζουσες ομάδες Cy3 (εκπέμπει στα 564 nm) ή FITC (εκπέμπει στα 488 nm) αντίστοιχα. Τα δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:500 και επωάζονται για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα γίνεται μια πλύση με 1x PBS – 0.1% Tween 20, μια με PBS 1x και μια με αποστειρωμένο H₂O. Εν συνεχεία οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma) στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) που δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι επιτυγχάνεται ο καθορισμός πυρήνα των κυττάρων. Οι καλυπτρίδες επωάζονται στο σκοτάδι για 20 λεπτά για να στερεοθούν στις αντικειμενοφόρους και στη συνέχεια μπορούν να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

3.2.11 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού.

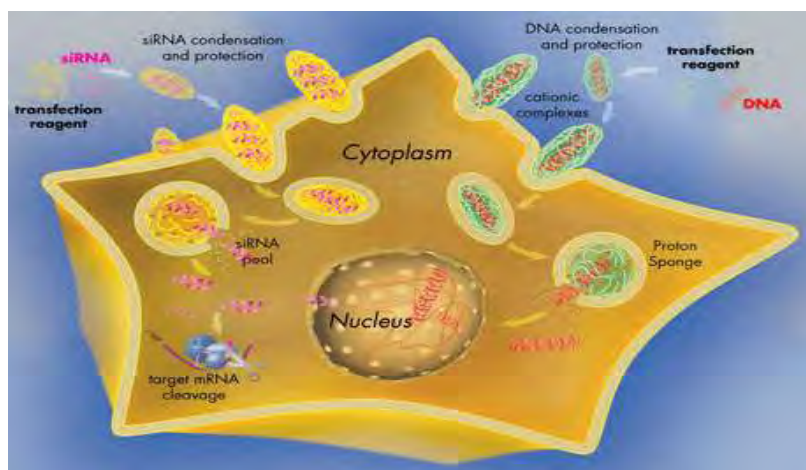
Για την ανάλυση του συνεντοπισμού των σημάτων ανοσοφθορισμού της νουκλεοφοσμίνης και του HIF-1α χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Διενεργούνται έλεγχοι που εξετάζουν την συνεπικάλυψη των δύο σημάτων φθορισμού (σε διαφορετικά κανάλια) και εκφράζονται με βάση τους συντελεστές συνεντοπισμού των Pearson και Manders και σαν ένα διάγραμμα διασποράς (scatter plot). Ο συντελεστής Pearson είναι ένας αριθμός που κυμαίνεται από την τιμή -1 έως +1 και μαρτυρά αν δύο σήματα φθορισμού επικαλύπτονται (-1: Αρνητική επικάλυψη, 0: Τυχαία επικάλυψη, +1: Θετική επικάλυψη). Ο συντελεστής Manders είναι μια επέκταση του συντελεστή Pearson και εκφράζει ποσοτικά το ποσοστό επικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού και κυμαίνεται από το 0 έως το +1 (π.χ. τιμή=0.5 σημαίνει ποσοστό συνεντοπισμού δύο πρωτεϊνών κατά 50%). Οι έλεγχοι βασίστηκαν στα πρόσθετα εργαλεία (plugin) του Image J: Colocalization

Threshold και JACoP. Οι τιμές των συντελεστών Manders που αφορούσαν ένα σύνολο 30 κυττάρων ανά συνθήκη εισήχθησαν στο πρόγραμμα SigmaPlot για τη ποσοτικοποίηση της συνεπικάλυψης των δύο καναλιών. Οι στατιστικές διαφορές των τριών ομάδων δεδομένων υπολογίστηκαν με το στατιστικό κριτήριο t. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

3.2.12 Παροδική επιμόλυνση

Η τεχνική της παροδικής επιμόλυνσης χρησιμοποιείται για την εισαγωγή εξωγενούς DNA (ή και RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα γονίδια που εισάγονται δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου, αλλά εκφράζονται για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Η μέθοδος βασίζεται στη κατεργασία του αρνητικά φορτισμένου DNA με ένα αντιδραστήριο που θα δημιουργήσει ένα θετικά φορτισμένο λιπόφιλο πλέγμα γύρω από το DNA, που θα του επιτρέψει την ενδοκύτωση διαμέσου της αρνητικά φορτισμένης εξωτερικής μεμβράνης. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι συνήθως είτε κατιονικά σύμπλοκα λιπιδιακής φύσης, είτε κατιονικά πολυμερή όπως το αντιδραστήριο jetPRIME reagent της (Polyplus-transfection, France) που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την εργασία.

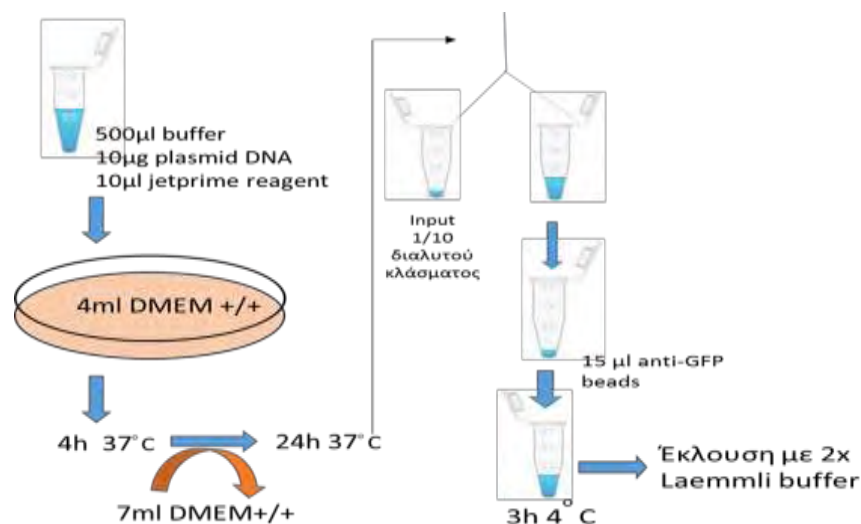
Τα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης που διεξήχθησαν στη παρούσα εργασία αφορούσαν την εισαγωγή σε κύτταρα HeLa αφενός πλασμιδιακού DNA που εκφράζει ανασυνδυασμένο HIF-1α σε σύντηξη με την GFP (Green fluorescence protein) και αφετέρου δίκλωνου προσχεδιασμένου Chimera RNAi της εταιρίας Abnova για την αποσιώπηση του γονιδίου της νουκλεοσομίνης (*NPM1*).



Εικόνα 3.9 Αναπαράσταση παροδικής επιμόλυνσης DNA και siRNA με τη χρήση κατιονικών συμπλόκων πολυμερών. Ανατύπωση από www.polyplus-transfection.com

Για την επιμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια pEGFP με κλωνοποιημένο cDNA που κωδικοποιεί για HIF-1α αγρίου τύπου μορφής (wt) και τα μεταλλάγματα HIF-1α IA/SA (ισολευκίνη 637, λευκίνη 638, ισολευκίνη 639 σε αλανίνη και σερίνες 641, 643 σε αλανίνη) και SE (σερίνη 641 σε γλουταμινικό). Η καλλιέργεια των

κυττάρων πριν την επιμόλυνση πρέπει να καταλαμβάνει το 50-60% της επιφάνειας του τρυβλίου. Δουλεύοντας στον θάλαμο νηματικής ροής, σε 500 μl jetPRIME buffer προστίθενται 10 μg πλασμιδιακού DNA και ανάδευση με την πιπέτα. Προστίθενται 10 μl jetPRIME reagent, ανάδευση με vortex 10 sec και φυγοκέντρηση μικρής διάρκειας. Το μίγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από την κυτταροκαλλιέργεια και τα κύτταρα ξεπλένονται με 1x PBS. Προστίθενται 4-5 ml πλήρες θρεπτικό μέσο και μετά τη δεκάλεπτη επώαση το μίγμα επιμόλυνσης μεταφέρεται σταγόνα-σταγόνα στο τρυβλίο με την κυτταροκαλλιέργεια. Τα κύτταρα επωάζονται για 4 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, γίνεται μια πλύση με PBS 1x, προστίθενται 7 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες ώστε να εκφραστούν οι επιθυμητές πρωτεΐνες που θα υποβληθούν σε ανοσοκατακρήμνιση.

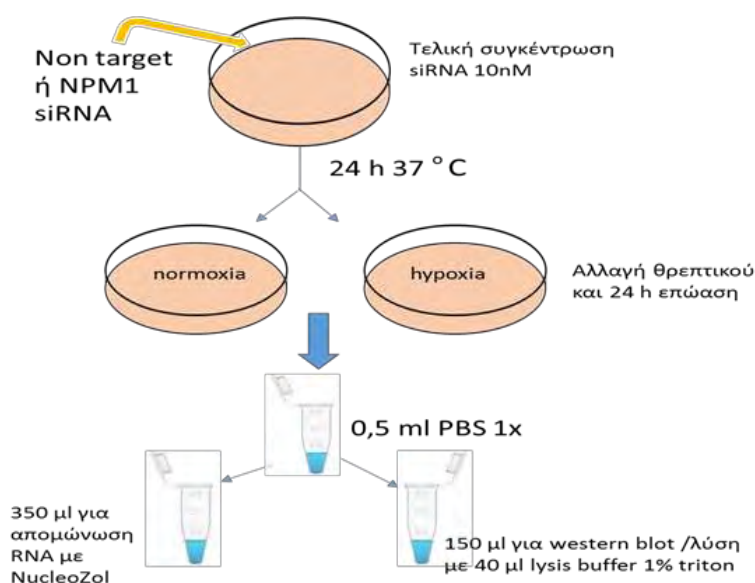


Εικόνα 3.10 Επιμόλυνση HeLa με pEGFP-C1 με ένθεμα HIF-1α wt, IA/SA, SE και ανοσοκατακρήμνιση με anti-GFP

Η αποσιώπηση της νουκλεοσομίνης μέσω επιμόλυνσης με siRNA επιτυγχάνεται μέσω της αποικοδόμησης των mRNAs της νουκλεοσομίνης στο κυτταρόπλασμα. Μετά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το δίκλωνο RNAi πέπτεται από το ένζυμο dicer σε μικρότερα δίκλιωνα τμήματα. Αυτά αναγνωρίζονται και προσδένονται από τη πρωτεΐνη Argonaute η οποία καταλύει την απομάκρυνση της μιας αλυσίδας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο που παραμένει και ονομάζεται RISC (RNA Induced Silencing Complex) εντοπίζει και συνδέεται βάση συμπληρωματικότητας του παραμένοντα κλώνου με την αλληλουχία των mRNAs του γονιδίου-στόχου. Η σύνδεση αυτή ακολουθείται από την αποικοδόμηση του mRNA από εξονουκλεάσες του κυτταροπλάσματος.

Στη παρούσα εργασία 10 μl siRNA αρχικής συγκέντρωσης 20 μM αραιώθηκαν σε 200 μl jetPRIME buffer και στη συνέχεια προστέθηκαν 4 μl jetPRIME reagent. Έγινε ανάδευση με vortex 10 sec, φυγοκέντρηση και το μίγμα επωάστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε καλλιέργεια HeLa σε τρυβλία των 60 mm καλυμμένο κατά 50-60% αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο, έγινε πλύση με PBS 1x και προστέθηκαν 2 ml πλήρες θρεπτικό. Στη συνέχεια το επωασμένο μίγμα μεταφέρθηκε σταγόνα σταγόνα στα κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C. Ακολούθως έγινε αφαίρεση θρεπτικού μέσου, πλύση με PBS 1x και προσθήκη 3 ml πλήρους θρεπτικού. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Για συνθήκη ελέγχου ταυτόχρονα με το siRNA της νουκλεοφοσμίνης επιμολύνθηκαν κύτταρα με μη ειδικό (non target) RNA. Από τα επιμολυσμένα κύτταρα ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση ολικού RNA ενώ ένα μέρος για SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση για να ελεγχθεί η επιτυχία της αποσιώπησης και η επίδρασή της στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α.



Εικόνα 3.11. Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με siRNA για την NPM1 ή non target RNA και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και για απομόνωση ολικού RNA.

3.2.13 Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας

3.2.13.1 Απομόνωση ολικού RNA

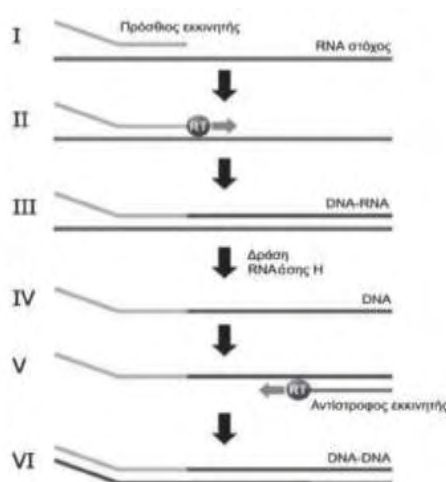
Στα κύτταρα που έγινε αποσιώπηση της νουκλεοφοσμίνης γίνεται απομόνωση ολικού RNA με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης στα επίπεδα mRNA γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α. Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία με μικρές παραλλαγές. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA.

Σε άσηπτες συνθήκες έγινε προσθήκη 400 μl NucleoZOL σε κύτταρα που ιζηματοποιήθηκαν μετά την αιώρησή τους σε κρύο PBS. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 160 μl RNase free H₂O. Παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και

στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 30 s. Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 12000 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης ~500 μl μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου ependorf και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά 12000 x g. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 400 μl 75% αιθανόλης και φυγοκέντρηση τριών λεπτών 12000 x g. Αφαιρείται η αιθανόλη και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 12000 x g για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 25 μl ελεύθερο ριβονουκλεασών H₂O. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA στα δείγματα βασίστηκε στη τεχνική της φασματοφωτομετρίας. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή NanoDrop της εταιρίας Thermo Scientific.

3.2.13.2 Σύνθεση cDNA, RT-PCR

Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Αυτή η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από ρετροϊούς, χρειάζεται τη προσθήκη κατάλληλων εκκινήτων για να ξεκινήσει τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Στη συνέχεια η RNA αλυσίδα καταβόλιζεται σε πολλά σημεία από τη δράση RNάσης. Τελικά, μια DNA πολυμεράση και συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο DNA, ενώ μια λιγάση ενώνει τα κομμάτια με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA.



Εικόνα 3.12 Αναπαράσταση της ανάστροφης μεταγραφής. Ανατύπωση από: www.mednet.gr.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το SensiFAST cDNA Synthesis Kit της εταιρίας BIOLINE και εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα 1 μg RNA εκμαγείου προστέθηκε σε DNase/RNase free υδατικό διάλυμα με 4 μl 5x TransAmp Buffer και 1μl

ανάστροφης μεταγραφάσης σε τελικό όγκο 20 μ l, ενώ παρασκευάστηκαν και δείγματα ελέγχου χωρίς το ένζυμο για τις συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση των εκκινητών)
- 42°C για 15 λεπτά (ανάστροφη μεταγραφή)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C – ψύξη

Στο τέλος του κύκλου τα δείγματα cDNA φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.13.3 PCR πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός αρχικού δείγματος DNA μέσω της συνεχούς ανίχνευσης της ενίσχυσής του. Η ενίσχυση του αρχικού δείγματος βασίζεται στη κλασική PCR με τα διαδοχικά στάδια της αποδιάταξης των δύο κλώνων, της σύνδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης από μια DNA πολυμεράση. Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται στη πρόσδεση στα ενισχυόμενα μόρια DNA μιας φθορίζουσας ουσίας και ανίχνευση της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος στο δίκλωνο DNA. Η φθορίζουσα ουσία μπορεί να είναι ειδική για μια ενισχυόμενη αλληλουχία επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό της από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών. Στην παρούσα εργασία, η σήμανση μπορεί να είναι μη ειδική βασιζόμενη σε μια ουσία που ενσωματώνεται στη δομή διπλής έλικας όλων των μορίων DNA που παράγονται κατά την αντίδραση.

Στη παρούσα εργασία η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) με τη χρήση του αντιδραστήριου Syber Green mix (KapaBiosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, $MgCl_2$, dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου *P4HA1-1* (prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1), αλλά και αυτό της β -ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα mRNA της τελευταίας δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

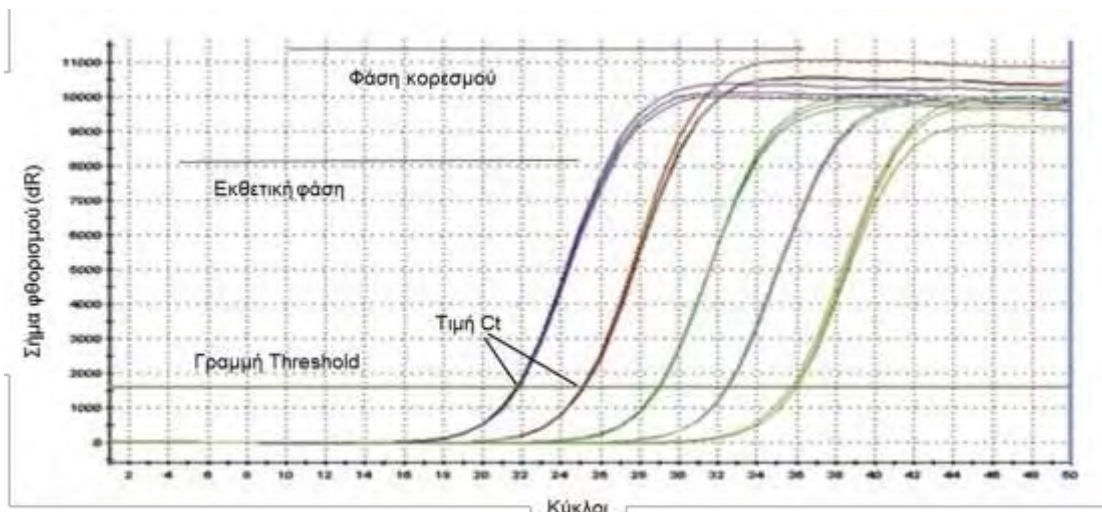
Παρασκευάζονται δύο μείγματα για τα δύο διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.5 pMol/ μ l ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H_2O απαλλαγμένο από RNάσες και DNάσες (ThermoFisher Scientific). Σε 9 μ l μείγματος προσθέτουμε 1 μ l cDNA. Κάθε συνθήκη

ελέγχθηκε εις τριπλούν, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA που έγινε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης και αφετέρου δείγμα με H₂O αντί για cDNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

1. 50°C για 2 λεπτά – ενεργοποίηση του SYBR Green.
2. 95°C για 10 λεπτά – ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης.
3. 95°C για 15 δευτερόλεπτα – αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA.
4. 60°C για 1 λεπτό – σύνδεση εκκινητών και επιμήκυνση.
5. Επανάληψη σταδίων 3 και 4 για 39 φορές.
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης – αποδιάταξη των προϊόντων.

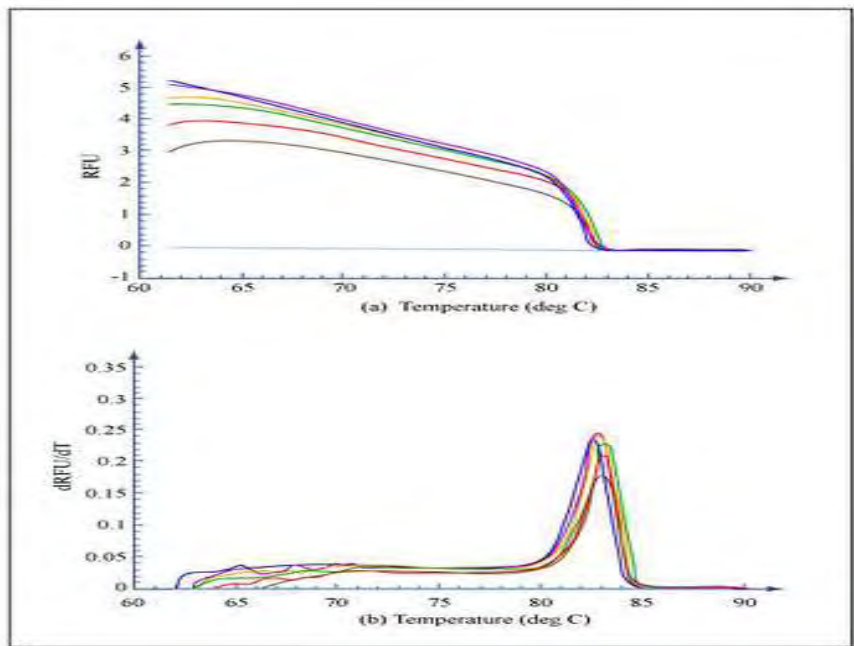
3.2.13.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει σε πραγματικό χρόνο την αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε: εκθετική φάση και τη φάση κορεσμού. Η μεταβολή των φάσεων σχετίζεται με την σταδιακή εξάντληση των αντιδραστηρίων (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) και τη συσσώρευση μορίων που δρουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Έτσι ενώ στην εκθετική φάση ο διπλασιασμός του αρχικού προϊόντος γίνεται ιδανικά, ακολούθως η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της, και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).



Εικόνα 3.13 Καμπύλη ενίσχυσης cDNA δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR. Ανατύπωση και προσαρμογή στα ελληνικά: από www.bioline.com

Η ενίσχυση των προϊόντων ακολουθείται από την αποδιάταξή τους σε ένα στάδιο αυξανόμενης θερμοκρασίας. Καθώς η θερμοκρασία τήξης των δίκλωνων μορίων επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, το σημείο τήξης T_m (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος. Από την άλλη με την αποδιάταξη των κλώνων, η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης των προϊόντων της Real-Time PCR μέσω μιας καμπύλης τήξης. Η καμπύλη αυτή εμφανίζει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και σε επόμενο στάδιο τον λόγο της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ($-dF/dT$). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βοηθάει στον έλεγχο της ειδικότητας και της καθαρότητας των προϊόντων αντίδρασης ενίσχυσης, καθώς αποκαλύπτει πιθανό διμερισμό εκκινητών ή επιμόλυνση με ξένο DNA. Τα μόρια DNA που ενισχύθηκαν στοχευμένα κατά την αντίδραση, αναμένονται να συμβαδίζουν και να συσσωρεύονται σε κοινή κορυφή στη καμπύλη τήξης. Αντίθετα, επιμολύνσεις θα δώσουν μεταβολή φθορισμού σε πολλαπλά σημεία τήξης.



Εικόνα 3.14 Αναπαράσταση τυπικής καμπύλης τήξης με χρήση της SYBR Green, πάνω: μονάδες φθορισμού σε συνάρτηση με θερμοκρασία, κάτω: λόγος μεταβολής φθορισμού/μεταβολή θερμοκρασίας σε συνάρτηση με θερμοκρασία. Ανατύπωση από: MIT OpenCourseWare

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA γίνεται με τη μέθοδο της $\Delta\Delta C_t$ (διαφορά της διαφοράς των κύκλων). Για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά C_t (ΔC_t) του γονιδίου στόχου (*P4HA1*) και της β -ακτίνης και στη συνέχεια από το ΔC_t κάθε δείγματος αφαιρείται το ΔC_t του δείγματος μάρτυρα. Στη συνέχεια υπολογίζεται η δύναμη με βάση το δύο $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ που εκφράζει τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

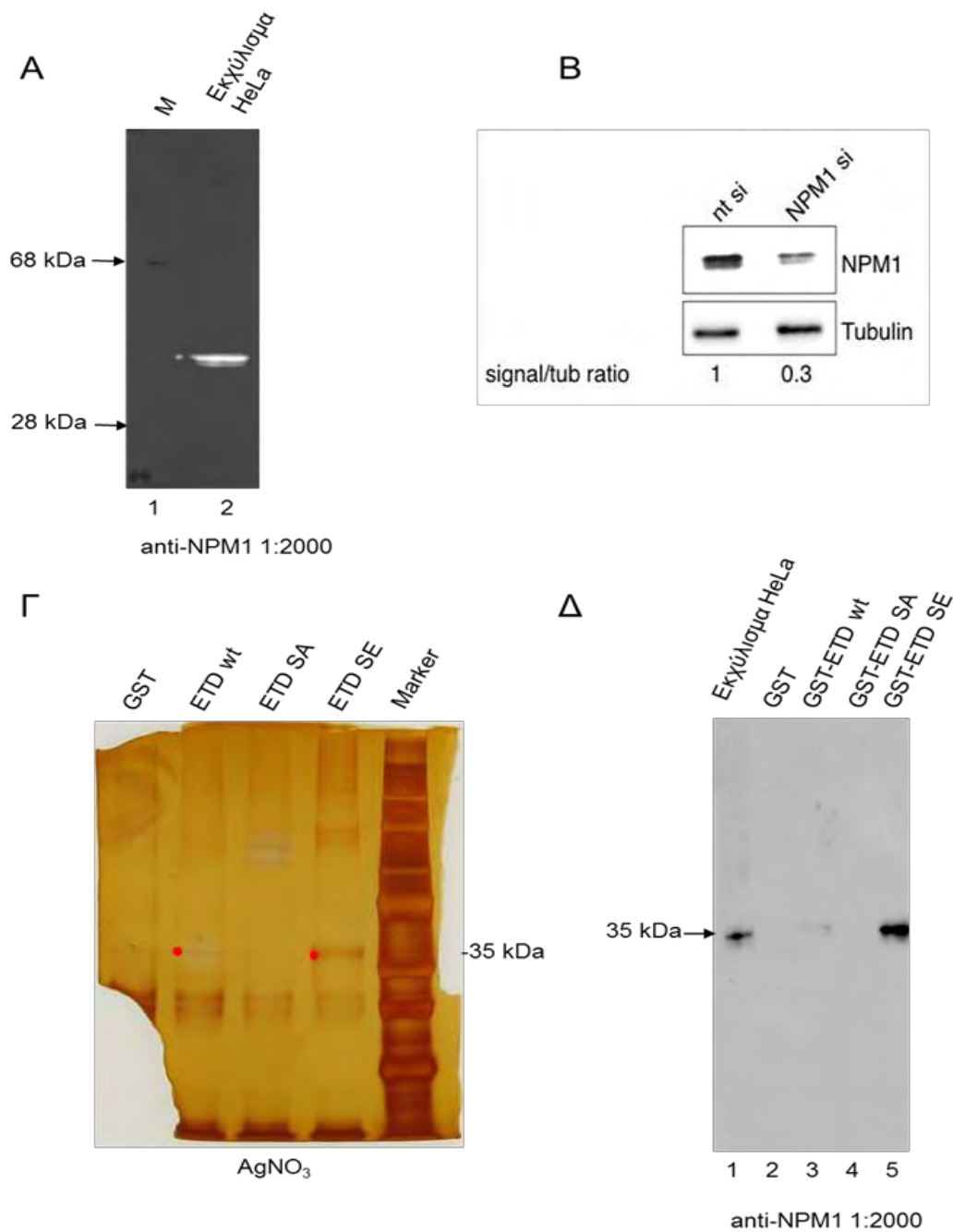
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος αρχικού πειράματος συγκατακρήμνισης.

Σε πειράματα που προηγήθηκαν της παρούσας εργασίας έχει γίνει συγκατακρήμνιση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα HeLa με χημικά πεπτίδια GST- HIF-1α ETD (ERK-targeted Domain, 42 αμινοξέα μήκος) στις μορφές αγρίου τύπου, SA και SE (παράγραφο 3.2.6). Δείγμα των εκλουσμάτων αναλύθηκε με SDS-PAGE και στο πήκτωμα έγινε χρώση με νιτρικό άργυρο AgNO₃. Η χρώση έδειξε μια πρωτεϊνική ζώνη στη περιοχή των 35 kDa, η οποία φαίνεται να συγκατακρημνίζεται κατά κύριο λόγο με το φωσφομιμητικό μετάλλαγμα ETD SE και σε μικρότερη ποσότητα με την αγρίου τύπου μορφή wt (Εικόνα 4. 1 Γ). Ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι η νουκλεοσομίνη (NPM1).

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων του παραπάνω πειράματος χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της νουκλεοσομίνης. Ελέγχθηκε εάν το αντίσωμα ανιχνεύει εξειδικευμένα την νουκλεοσομίνη. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. 1Α εμφανίζεται μια κύρια ζώνη στα 35 kDa που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της νουκλεοσομίνης. Παρατηρείται, όμως, και μια μικρότερης έντασης ζώνη σε ελάχιστα μικρότερο μοριακό βάρος από την βασική. Για να διευκρινισθεί εάν και οι δύο ζώνες ανήκουν στη νουκλεοσομίνη διεξήχθη πείραμα αποσιώπησης της νουκλεοσομίνης με siRNA όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.12. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα, και οι δύο ζώνες που εντοπίζονται με το αντίσωμα της νουκλεοσομίνης μειώνονται κατά 70% στο δείγμα που η NPM1 αποσιωπήθηκε, άρα και οι δύο ζώνες αντιστοιχούν σε διαφορετικές ισομορφές της νουκλεοσομίνης (Εικόνα 4. 1B).

Η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του GST-HIF-1α ETD με τη νουκλεοσομίνη έγινε με SDS-PAGE των αρχικών εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι της νουκλεοσομίνης (αραίωση 1:2000). Στη μεμβράνη ανιχνεύεται μια ζώνη που αντιστοιχεί στην νουκλεοσομίνη (35 kDa), η οποία είναι έντονη όταν η κατακρήμνιση γίνεται από το πεπτίδιο που φέρει φωσφομιμητική μετάλλαξη (HIF-1α-ETD SE). Αντίθετα, είναι σημαντικά πιο αδύναμη στο δείγμα κατακρήμνισης με αγρίου τύπου μορφής HIF-1α-ETD και απουσιάζει από το δείγμα συγκατακρήμνισης με το πεπτίδιο HIF-1α-ETD SA που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις ERK1/2 (Εικόνα 4. 1 Δ). Τα παραπάνω αποτέλεσαν μια πρώτη ένδειξη ότι η πιθανή αλληλεπίδραση HIF-1α/νουκλεοσομίνης εξαρτάται από την φωσφορυλίωση.



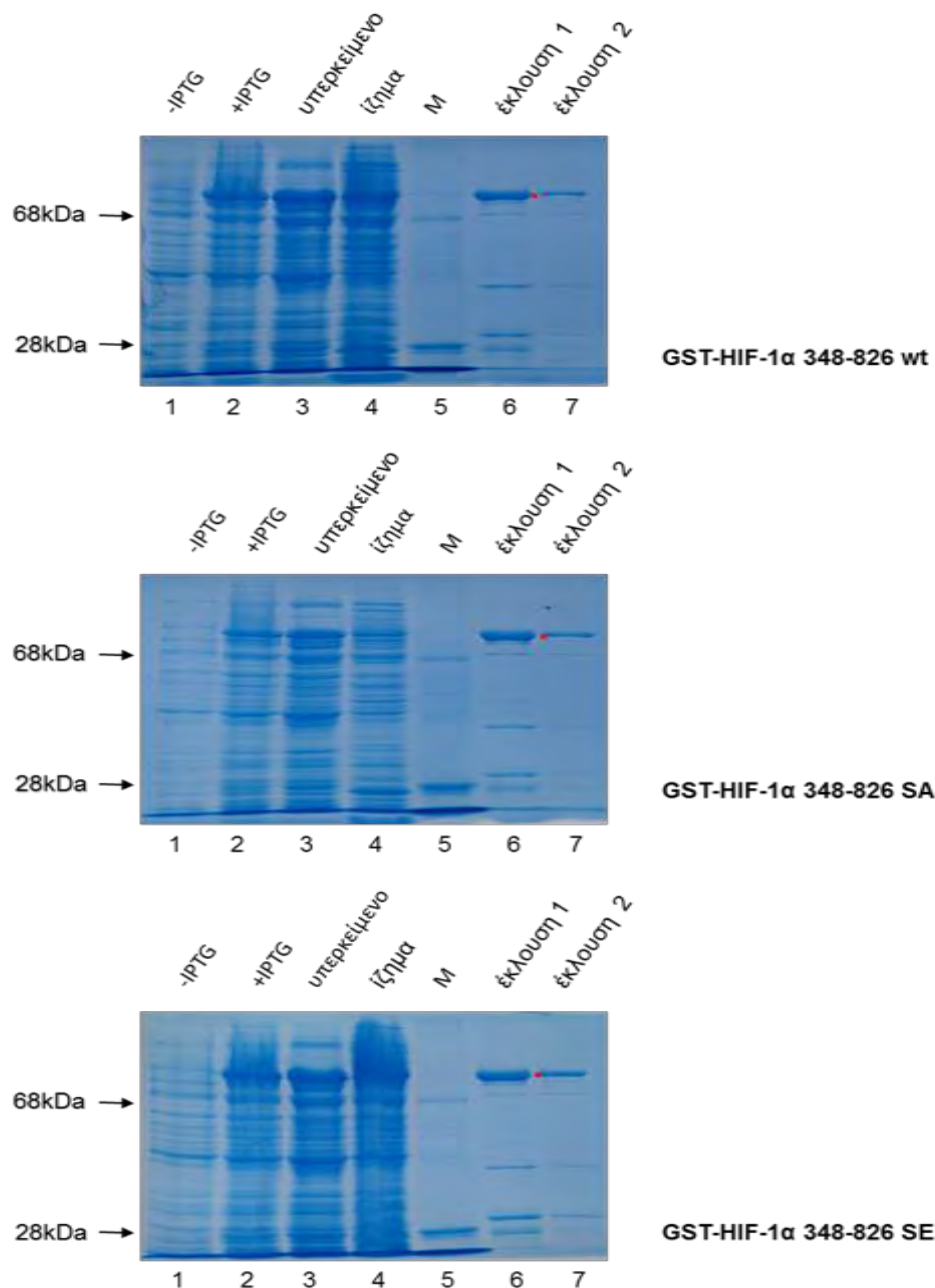
Εικόνα 4. 1 A) Έλεγχος κατά Western αντισώματος έναντι της νουκλεοσομίνης σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa. B) Έλεγχος κατά Western της αποσίωσης της νουκλεοσομίνης και ποσοτικοποίηση με βάση την τουμπουλίνη. Γ),Δ) Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa υποβλήθηκαν σε συγκατακρήμιση με διάφορες μορφές ανασυνδυασμένων GST-ETD πεπτιδίων. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με AgNO₃ (Γ) ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της νουκλεοσομίνης (Δ). Η ζώνη που αναλύθηκε με φασματοσκοπία μάζας δεικνύεται με κόκκινες τελείες.

4.2 Υπερέκφραση των μορφών GST-HIF-1α (348-826) σε βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* BL21-RIL και καθαρισμός των πρωτεϊνών.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση της νουκλεοφωσμίνης με τον HIF-1α παρήχθησαν μορφές μεγαλύτερου τμήματος του HIF-1α για να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα συνκατακρήμνισης. Βακτηριακά στελέχη *E. Coli* BL21-RIL μετασχηματίστηκαν με τα κατάλληλα πλασμίδια όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.2. Τα κλωνοποιημένα γονίδια που κωδικοποιούν τις μορφές GST-HIF-1α (348-826) αγρίου τύπου wt, SA και SE υπερεκφράστηκαν με την προσθήκη 0.1 mM IPTG για μιάμιση ώρα όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.3. Στη συνέχεια η υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες, καθαρίστηκαν με χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης μετά από λύση των βακτηριακών κυττάρων, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.4.

Στην Εικόνα 4. 2 παρουσιάζεται ο καθαρισμός των διαφόρων μορφών του GST-HIF-1α (348-826) μετά από ανάλυση με SDS-PAGE: Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (Διαδρομές 1 και 2), δείγματα του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος λύσης των βακτηριακών κυττάρων (Διαδρομές 3 και 4) και δείγματα των δύο εκλούσεων των GST-χμαιρικών πρωτεϊνών (Διαδρομές 6 και 7). Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε (M στήλη 5) δίνει δύο πρωτεϊνικές ζώνες στο μέγεθος 28 και 68 kDa. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται στο πήκτωμα με χρώση Coomassie brilliant blue.

Στα δείγματα που έγινε υπερέκφραση μετά την προσθήκη 0.1 mM IPTG εντοπίζεται, σε όλες τις περιπτώσεις, μια έντονη ζώνη που αντιστοιχεί στις διάφορες μορφές της χμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826 στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~77 kDa). Η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων. Από το διαλυτό κλάσμα έγινε απομόνωση των πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης και στα εκλούσματα με γλουταθειόνη διακρίνεται σημαντική ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης. Επιπλέον στις εκλούσεις εντοπίζονται, σε μικρότερα μοριακά βάρη, πρωτεϊνικές ζώνες που συνιστούν γνωστά προϊόντα πρωτεόλυσης του HIF-1α [74].



Εικόνα 4. 2 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων χημικών πρωτεϊνών GST-HIF-1α 348-826 στις μορφές αγρίου τύπου και μεταλλάγματα SA (σερίνη 641 και 643 σε αλανίνη) και SE (σερίνη 641 σε γλουταμινικό). Οι μορφές αυτές υπερεκφράστηκαν σε βακτηριακά στελέχη *E. Coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (στήλες 1 και 2), διαλυτού και μη κλάσματος λύσης των βακτηριακών κυττάρων (στήλες 3 και 4) και δείγματα των δύο εκλούσεων των GST-χημικών πρωτεϊνών (στήλες 6 και 7) επεξεργάστηκαν με SDS Sample buffer και DTT, θερμάνθηκαν για 1 λεπτό στους 97°C και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue.

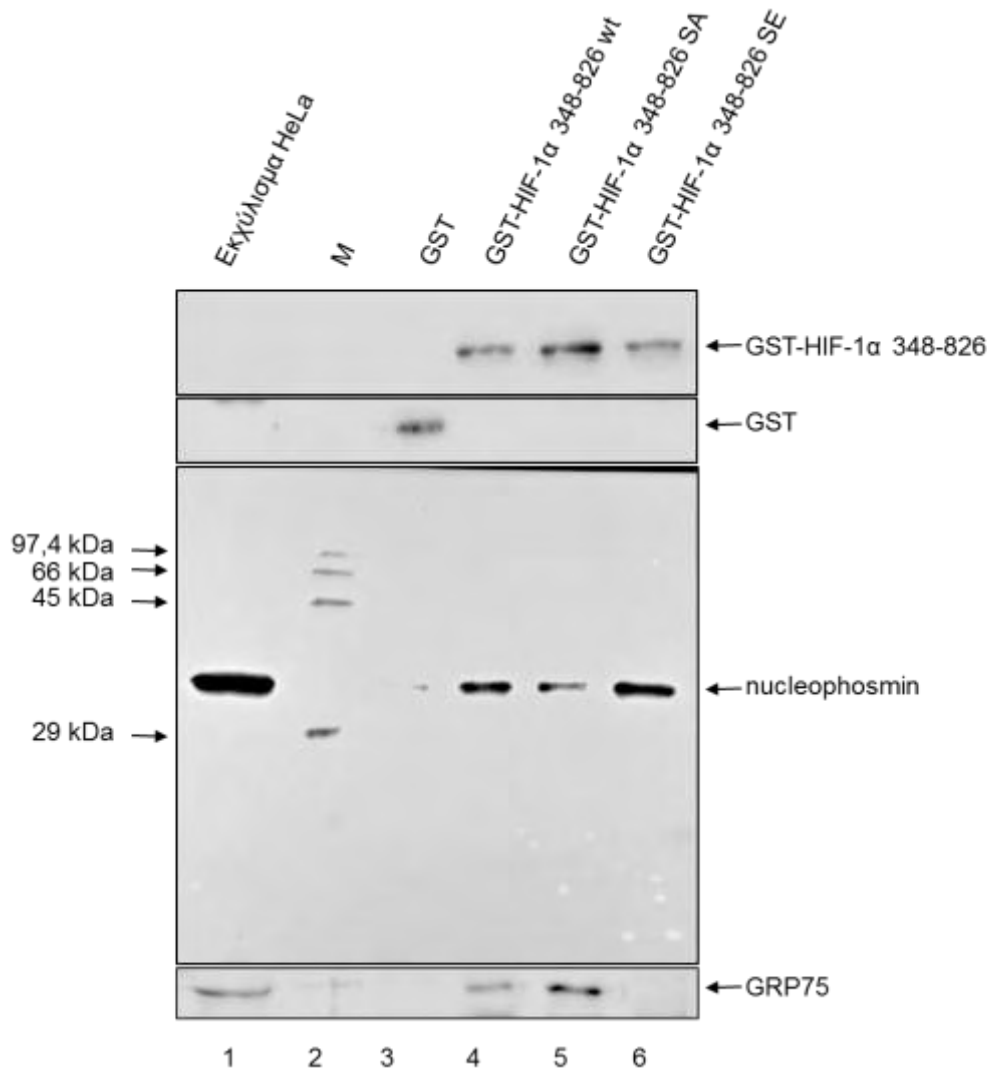
4.3 Συγκατακρήμιση πρωτεϊνών κυττάρων HeLa από τις χιμαιρικές πρωτεΐνες GST-HIF-1α 348-826 wt, SA και SE.

Για να ελεγχθεί η ικανότητα ενός μεγαλύτερου τμήματος του HIF-1α να αλληλεπιδρά με την νουκλεοφωσμίνη, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, λύθηκαν και το 1/10 του διαλυτού κλάσματος κρατήθηκε ως δείγμα ελέγχου (input). Το υπόλοιπο διαλυτό κλάσμα υποβλήθηκε σε δοκιμασία συγκατακρήμισης με 10 µg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST (δείγμα ελέγχου) και GST-HIF-1α(348-826) στις μορφές αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων SA και SE. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δημιουργήθηκαν μεταξύ του, προσδεδεμένου σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, GST-HIF-1α(348-826) και των πρωτεϊνών των κυττάρων HeLa εκλούστηκαν με 2x Laemmli buffer και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση κατά western.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της GST, της νουκλεοφωσμίνης και της GRP75 ενώ σαν μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε προϊόν της εταιρείας Sigma που εμφανίζει πρωτεϊνικές ζώνες στα 29 kDa (Carbonyl Anhydrase, bovine), 45 kDa (Ovalbumin, chicken), 66 kDa (Albumin, bovine), 97.4 kDa (Phosphorylase B, rabbit).

Μετά από την ανοσοανίχνευση με anti-GST (Εικόνα 4. 3), ανιχνεύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια και εκλούστηκαν επιτυχώς (Διαδρομές 3-6). Διακρίνεται ελαφρώς μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης στην περίπτωση του μεταλλάγματος SA (Διαδρομή 5). Για το έλεγχο του πειράματος συγκατακρήμισης τα εκλούσματα ελέγχθηκαν για την παρουσία της πρωτεΐνης GRP-75 (mortalin). Επαληθεύτηκε, έτσι, για το κομμάτι 348-826 το πρότυπο αλληλεπίδρασης της mortalin με τον HIF-1α, που έχει βρεθεί σε πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου (Mylonis et al., αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Όπως γίνεται διακριτό το μετάλλαγμα SA (Διαδρομή 5) συγκατακρημνίζει μεγαλύτερη ποσότητα mortalin από την αγρίου τύπου μορφή, ενώ το μετάλλαγμα SE δεν αλληλεπιδρά με την mortalin.

Ανάλυση των εκλουσμάτων για την παρουσία σε αυτά της νουκλεοφωσμίνης δείχνει την απουσία αλληλεπίδρασης με το δείγμα ελέγχου κατακρήμισης με GST (Διαδρομή 3). Αντίθετα, το τμήμα του HIF-1α 348-826 αλληλεπιδρά με την νουκλεοφωσμίνη και μάλιστα με διαφορετική αγχιστεία ανάλογα με τη μορφή του τμήματος που χρησιμοποιείται για την καθίζηση. Συγκεκριμένα το μετάλλαγμα SE, που μιμείται το φορτίο της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, συγκατακρημνίζει ισχυρά την νουκλεοφωσμίνη. Η αγρίου τύπου μορφή κατακρημνίζει μειωμένη ποσότητα νουκλεοφωσμίνης, ενώ σημαντικά λιγότερη πρωτεΐνη κατακρημνίζεται με το μετάλλαγμα SA που έχει απωλέσει την ικανότητα φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, επιβεβαιώνοντας, έτσι, το προηγούμενο αποτέλεσμα.

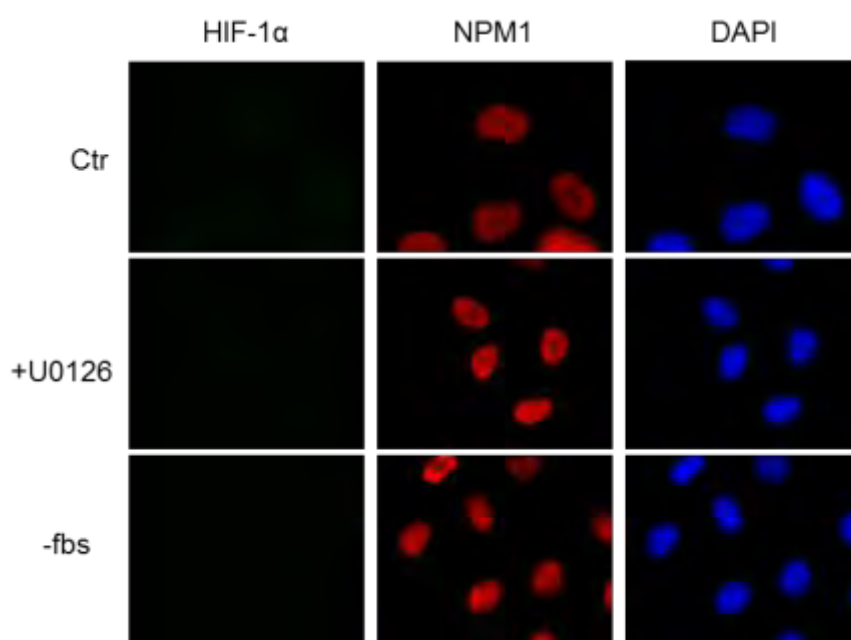


Εικόνα 4. 3 Ποσότητες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST (διαδρομή 3) και GST-HIF-1α 348-826 wt, SA και SE (διαδρομές 4,5,6) χρησιμοποιήθηκαν ως δόλωμα, για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών από εκχύλισμα κυττάρων HeLa (στήλη 1). Οι πρωτεΐνες που εκλούστηκαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Διακρίνεται από πάνω προς τα κάτω επίδραση με αντισώματα έναντι της GST, της νουκλεοφοσμίνης και της GRP-75 (όπως υποδεικνύεται). Αριστερά εμφανίζονται τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών ζωνών του μάρτυρα (διαδρομή 2).

4.4 Ανάλυση με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού των ενδογενών HIF-1α και νουκλεοφοσμίνης και έλεγχος του συνεντοπισμού τους.

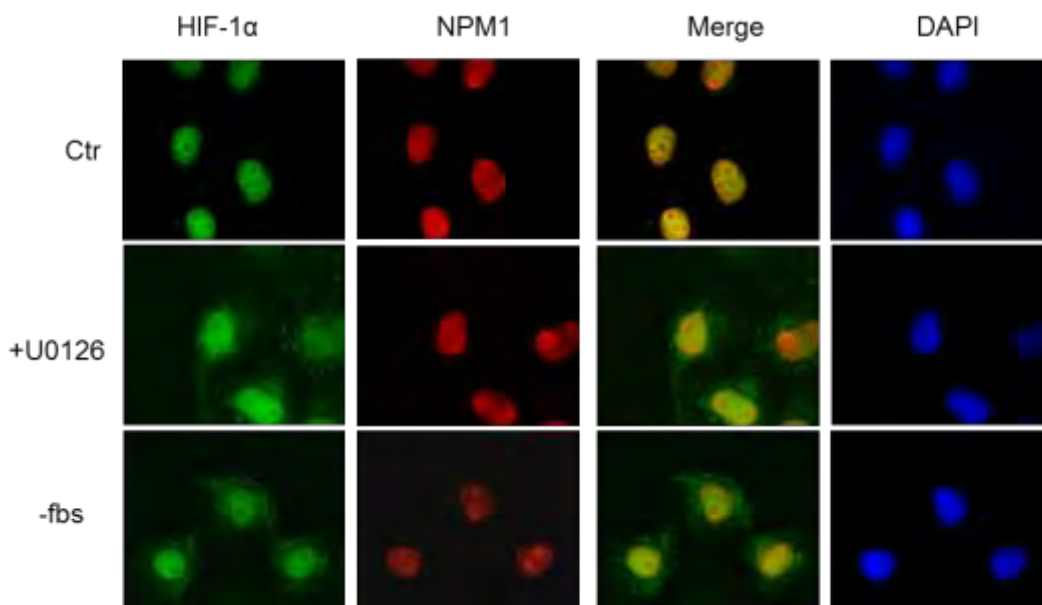
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο HIF-1α και η νουκλεοφοσμίνη εντοπίζονται στην ίδια υποκυτταρική περιοχή έγιναν πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού σε συνθήκες υποξίας και σε συνδυασμό με συνθήκες οι οποίες αναστέλουν το μονοπάτι των ERK. Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν για 24 ώρες έτσι ώστε να προσκολληθούν σε καλυπτρίδες. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν για 16 ώρες σε υποξία (1% O₂) ή νορμοξία στους 37°C. Εκτός από τις συνθήκες πλήρους θρέψης (ctr) για να επιτευχθεί η αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης των ERK κινασών έγινε επώαση των κυττάρων είτε με τον αναστολέα των MEK, U0126, σε τελική συγκέντρωση 10 μM ή ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης από το οποίο αφαιρείται ο ορός εμβρύου βοός (-FBS).

Για τη μελέτη του εντοπισμού του HIF-1α και της νουκλεοφοσμίνης ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.10. Ο HIF-1α εντοπίζεται με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, με φθορισμό της χρωστικής FITC στα 488 nm (πράσινο κανάλι), ενώ η νουκλεοφοσμίνη εντοπίζεται με φθορισμό της χρωστικής Cy3 στα 564 nm (κόκκινο κανάλι). Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α απουσιάζει λόγω αποικοδόμησης του (Εικόνα 4. 4), ενώ, η νουκλεοφοσμίνη (NPM1) εντοπίζεται στον πυρήνα με αυξημένο σήμα στην περιφέρεια των πυρηνίσκων. Κάτω από την επίδραση, κατά κύριο λόγο, της συνθήκης έλλειψης ορού από το θρεπτικό (-fbs) και σε μικρότερο βαθμό με αναστολής των ERK (+U0126), παρατηρείται περαιτέρω συσσώρευση της νουκλεοφοσμίνης στη περιοχή περιμετρικά του πυρηνίσκου.



Εικόνα 4. 4 Έλεγχος εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών HIF-1α και νουκλεοφοσμίνης σε περιβάλλον 20% O₂ σε συνθήκες πλήρους θρέψης (Ctr), αναστολής του μονοπατιού των ERK (+U0126) και έλλειψης ορού από το θρεπτικό (-fbs). Στη πρώτη στήλη στο πράσινο κανάλι φθορισμού ο HIF-1α απουσιάζει λόγω οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης. Στο κόκκινο κανάλι φθορισμού ανιχνεύεται η νουκλεοφοσμίνη ενώ στο μπλε εμφανίζονται οι πυρήνες μετά από χρώση με την φθορίζουσα DAPI.

Στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε περιβάλλον 1% O₂ (Εικόνα 4. 5) η νουκλεοφοσμίνη παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο εντοπισμού όπως στη νορμοξία. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σταθεροποιούνται. Σε συνθήκες πλήρους θρέψης ο HIF-1α εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα (Ctr). Στις συνθήκες αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2, ο HIF-1α εντοπίζεται στον πυρήνα αλλά εκτοπίζεται σε σημαντικό ποσοστό και σε περιοχές του κυτταροπλάσματος.

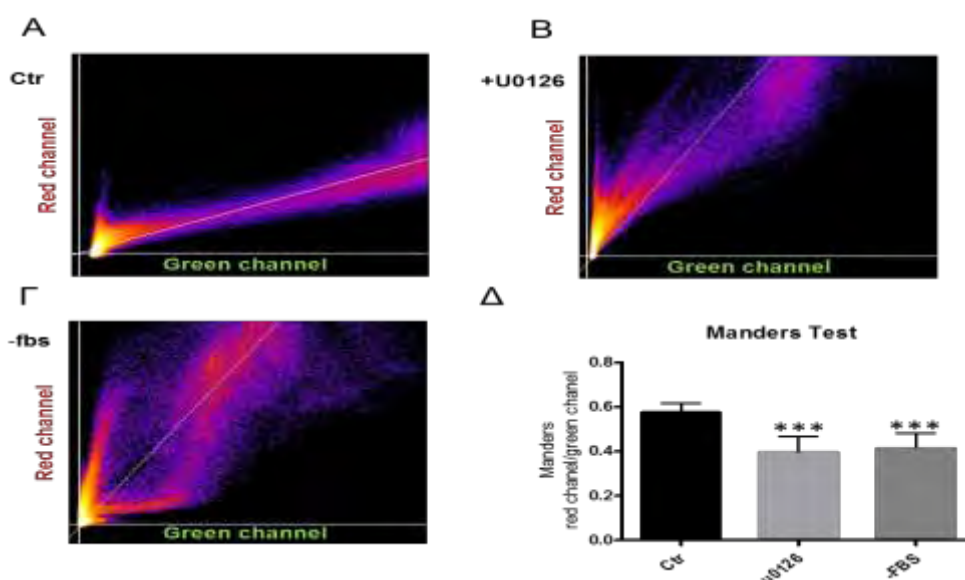


Εικόνα 4. 5 Έλεγχος εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών HIF-1α και νουκλεοφωσμίνης σε περιβάλλον 1% O₂ σε συνθήκες πλήρους θρέψης (Ctr), αναστολής των MEK (+U0126) και έλλειψης ορού από το θρεπτικό (-fbs). Στο πράσινο κανάλι εμφανίζεται ο HIF-1α και στο κόκκινο κανάλι η νουκλεοφωσμίνη. Στη τρίτη στήλη παρατίθεται η επικάλυψη των δύο καναλιών σαν ένδειξη συνεντοπισμού των πρωτεϊνών. Στο μπλε κανάλι εμφανίζονται οι πυρήνες μετά από χρώση με την χρωστική DAPI.

Στην 3^η στήλη της εικόνας 4.5 (Merge) παρατίθεται το αποτέλεσμα της μίξης των καναλιών πράσινου και κόκκινου. Οι περιοχές όπου συνεντοπίζονται οι δύο πρωτεΐνες παίρνουν μια πορτοκαλοκίτρινη χροιά. Γίνεται φανερό ότι σε συνθήκες πλήρους θρέψης (Ctr) η κίτρινη χροιά είναι πιο έντονη κάτι που μαρτυρά ότι ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών είναι ευρύτερος απ' ό τι στις συνθήκες +U0126 και -fbs.

Επειδή ο παραπάνω τρόπος εκτίμησης του συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών βασίζεται στην υποκειμενική κρίση του παρατηρητή για την καλύτερη ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του συνεντοπισμού τους, διεξήχθησαν έλεγχοι με τη χρήση του προγράμματος ImageJ όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.11. Ο εντοπισμός δύο πρωτεϊνών που φθορίζουν σε δύο διαφορετικά κανάλια μπορεί να αποδοθεί σε ένα διάγραμμα διασποράς (εικόνα 4.6 Α-Γ). Έτσι, γίνεται φανερό ότι οι δύο πρωτεΐνες στις συνθήκες ελέγχου (εικόνα 4.6Α, Ctr) οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται λόγω της σύμπτωσης της έντασης των σημάτων φθορισμού με την ευθεία. Αντίθετα στις δύο συνθήκες αναστολής του μονοπατιού των ERK αποκλίνουν από την ευθεία προς τους άξονες που αντιπροσωπεύουν την ένταση του σήματος στα διαφορετικά κανάλια, άρα ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών ελλατώνεται.

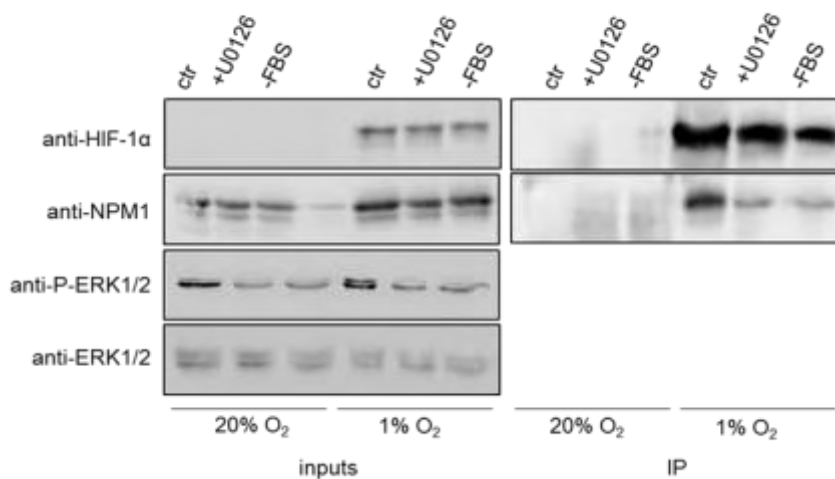
Οι τιμές του συντελεστή Manders, που συλλέχθηκαν από τον έλεγχο συνεντοπισμού στο ImageJ, για 30 κύτταρα ανά συνθήκη, εισάγονται στο λογισμικό GraphPad Prism και ποσοτικοποιούνται. Στην εικόνα 4.6 Δ φαίνεται ότι σε συνθήκες υποξίας, τα σήματα φθορισμού του HIF-1α και της νουκλεοφωσμίνης συνεπικαλύπτονται σε ένα ποσοστό 60%, ενώ και στις δύο συνθήκες περιορισμού της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 η επικάλυψη αυτή μειώνεται σημαντικά κατά 20% επιβεβαιώνοντας, έτσι, την οπτική παρατήρηση.



Εικόνα 4. 6 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος συνεπικάλυσης δύο καναλιών φθορισμού, κόκκινου (φθορισμός νουκλεοφωσμίνης) και πράσινου (φθορισμός HIF-1α). Α-Γ: Διαγράμματα διασποράς των σημάτων φθορισμού. Τα σήματα συγκλίνουν σε μία περιοχή που ορίζεται από ευθεία σε συνθήκες ελέγχου (Α), και στις συνθήκες +U0126 (Β) και -fbs (Γ). Δ) Ποσοτικοποίηση συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών σε δείγμα 30 κυττάρων ανά συνθήκη, βασισμένη στις τιμές της μεταβλητής Manders. Οι στατιστικές διαφορές των τριών ομάδων δεδομένων υπολογίστηκαν με το στατιστικό κριτήριο t. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

4.5 Αλληλεπίδραση HIF-1α και νουκλεοφωσμίνης μετά από ανοσοκατακρήμνιση.

Το πείραμα του έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξε την πιθανότητα να εντοπίζονται μαζί ο HIF-1α και η νουκλεοφωσμίνη για να δειχθεί, όμως, η άμεση αλληλεπίδραση τους έγινε πείραμα ανοσοκαθίζησης. Για την ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α, κύτταρα HeLa που αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες ακριβώς συνθήκες με τον ανοσοφθορισμό και απομονώθηκε το διαλυτό τους κλάσμα. Το 1/10 αυτού κρατήθηκε ως δείγμα ελέγχου (input) και τα 9/10 επώαστηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του HIF-1α, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.9.



Εικόνα 4. 7 Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία σε συνθήκες πλήρους θρέψης (ctr), μετά την προσθήκη 10 μ M αναστολέα +U0126 και απουσία ορού (-FBS). Μετά τη λύση τους και απομονώθηκε το διαλυτό κλάσμα του

εκχυλίσματος. Το 1/10 αναλύθηκε SDS-PAGE (inputs) και τα 9/10 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση (IP) με αντίσωμα έναντι του HIF-1α σε σφαιρίδια αгарόζης-protein G. Με ανοσοαποτύπωση ελέγχθηκαν με αντισώματα έναντι του HIF-1α και της νουκλεοφοσμίνης (anti-NPM1) τα inputs και τα εκλούσματα, ενώ στα inputs έγινε και έλεγχος με αντισώματα έναντι των κινασών ERK1/2 σε φωσφορυλιωμένη (anti-P-ERK1/2) ή μη μορφή.

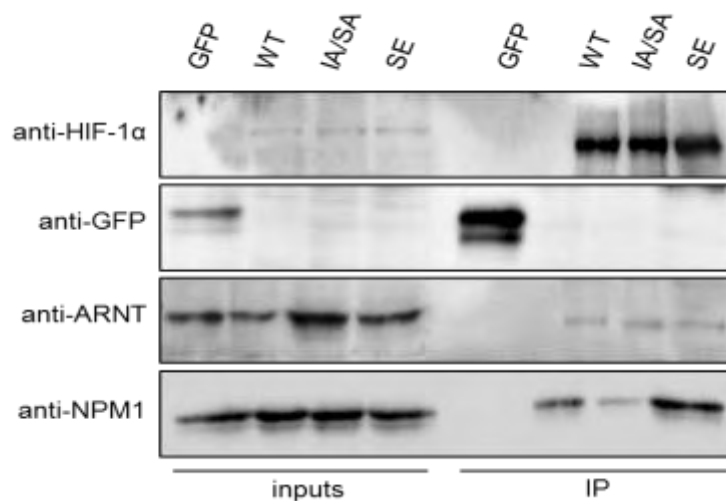
Στα αποτελέσματα (Εικόνα 4. 7) παρατηρείται αρχικά στα δείγματα (inputs) ότι ο HIF-1α στην υποξία εκφράζεται χωρίς να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα από τις διάφορες συνθήκες. Ακόμη η νουκλεοφοσμίνη εκφράζεται σε όλες τις συνθήκες χωρίς να επηρεάζεται από τις συνθήκες αναστολής των ERK κινασών, ωστόσο τα πρωτεϊνικά της επίπεδα αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, στα inputs με αντίσωμα έναντι των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 (anti-P-ERK1/2) βλέπουμε ότι οι συνθήκες +U0126 και -FBS αναστέλλουν σημαντικά την φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση των ERK1/2 χωρίς να επηρεάζουν τα ολικά πρωτεϊνικά τους επίπεδα (ERK1/2).

Το αποτέλεσμα της ανοσοκατακρήμισης (IP), δείχνει ότι ο HIF-1α εκλούεται σε σχετικά ίσες ποσότητες στις τρεις διαφορετικές συνθήκες. Ελέγχοντας τα εκλούσματα με αντίσωμα έναντι της νουκλεοφοσμίνης (anti-NPM1) γίνεται εμφανές ότι ο ενδογενής HIF1-α αλληλεπιδρά με την νουκλεοφοσμίνη. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στις συνθήκες αναστολής των ERK κινασών (+U0126, -FBS). Υποδεικνύεται έτσι ότι η φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α αλληλεπιδρά με την νουκλεοφοσμίνη και η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλεται όταν μειώνεται η ενεργότητα των ERK1/2.

4.6 Αλληλεπίδραση με την νουκλεοφοσμίνη GFP χιμαιρικών πρωτεϊνών, από κύτταρα που εκφράζουν GFP-HIF-1α wt , IA/SA, SE μετά από ανοσοκατακρήμιση.

Επειδή όπως έδειξε το πείραμα ανοσοφθορισμού η αναστολή του μονοπατιού των ERK οδηγεί ένα σημαντικό ποσοστό του HIF-1α εκτός πυρήνα, υπήρχε η πιθανότητα η μειωμένη αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-1α με τη νουκλεοφοσμίνη να οφείλεται στην αυξημένη έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα και όχι στην ίδια τη μείωση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α. Έτσι έγινε πείραμα ανοσοκατακρήμισης των διαφόρων μορφών του πλήρους μεγέθους HIF-1α σε σύντηξη με την GFP, με τις μορφές HIF-1α wt που μπορεί να φωσφορυλιωθεί, HIF-1α SE που το γλουταμινικό μιμείται την φωσφορυλίωση και τη μεταλλαγμένη μορφή HIF-1α IA/SA που εκτός από την μετάλλαξη που καταστρέφει τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK έχει καταστραφεί και το NES και έτσι η μορφή αυτή παγιδεύεται στον πυρήνα [74]. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τις διάφορες πλασμιδιακές κατασκευές όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.12 για 4 ώρες και μετά από αλλαγή θρεπτικού αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας στους 37°C. Στη συνέχεια όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.9 έγινε δοκιμασία ανοσοκατακρήμισης χρησιμοποιώντας σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα GFP.

Τα δείγματα ελέγχου (inputs) και αυτά της ανοσοκατακρήμνισης (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση (Εικόνα 4. 8). Διακρίνεται ότι στα inputs ότι η διαμόλυνση ήταν επιτυχής καθώς η GFP και όλες οι μορφές του HIF-1α εκφράστηκαν σε ίδια επίπεδα. Στα κύτταρα επίσης εκφράζονται κανονικά οι ARNT και νουκλεοσομίνη. Στην ανοσοκατακρήμνιση είναι εμφανές ότι οι διάφορες μορφές HIF-1α που εκφράστηκαν, κατακρημνίστηκαν σε ίσες ποσότητες. Επιπλέον συγκατακρήμνισαν παρόμοιες ποσότητες ARNT δείχνοντας ότι οι μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκου με τον ARNT. Ωστόσο, είναι εμφανές ότι διαφέρουν στην ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με την νουκλεοσομίνη. Συγκεκριμένα η νουκλεοσομίνη αλληλεπιδρά ισχυρά με την φωσφομιμητική μορφή HIF-1α SE, ενώ αλληλεπιδρά σε μικρότερο βαθμό με την αγρίου τύπου μορφή HIF-1α wt, ενώ σημαντικά μικρότερη ποσότητα συγκατακρημνίζεται με το μετάλλαγμα HIF-1α IA/SA, που δε φωσφορυλιώνεται από τις ERK ενώ παραμένει πυρηνικό. Συμπερασματικά, δείχτηκε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 παίζει άμεσο ρόλο στην αλληλεπίδραση HIF-1α/νουκλεοσομίνης και είναι η αναστολή της, και όχι η αλλαγή εντοπισμού του HIF-1α, αυτή που ευθύνεται για την μείωση της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών.



Εικόνα 4. 8 Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν για 4 ώρες με πλασμιδιακές κατασκευές pEGFP-C1, pEGFP-C1-HIF-1α wt, IA/SA και SE. Αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία στους 37°C, λύθηκαν και απομονώθηκε το εκχύλισμα. Το 1/10 χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου έκφρασης πρωτεϊνών (inputs) και τα 9/10 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση (IP) με anti-GFP. Τα εκλούσματα ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του HIF-1α, της GFP, του ARNT και της νουκλεοσομίνης (anti-NPM1).

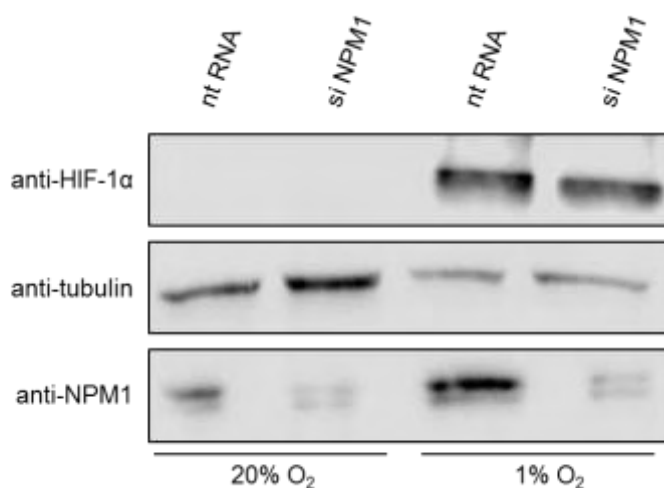
4.7 Η αποσιώπιση της έκφρασης της νουκλεοσομίνης δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αλλά μειώνει την μεταγραφική του ενεργότητα.

Έχοντας δείξει ότι η νουκλεοσομίνη αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, και μάλιστα σε συνθήκες που ευνοούν την φωσφορυλίωση του από τις ERK, έγιναν πειράματα αποσιώπισης της έκφρασης της νουκλεοσομίνης για να διερευνηθεί η επίδραση της στη λειτουργία του HIF-1α.

Για την αποσιώπηση, κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία 37°C , διαμολύνθηκαν με siRNA ή μη ειδικό RNA (non target) για 24 ώρες και μετά από αλλαγή θρεπτικού αναπτύχθηκαν σε νορμοξία ή υποξία για ακόμα 24 ώρες στους 37°C. (παράγραφος 3.2.12.)

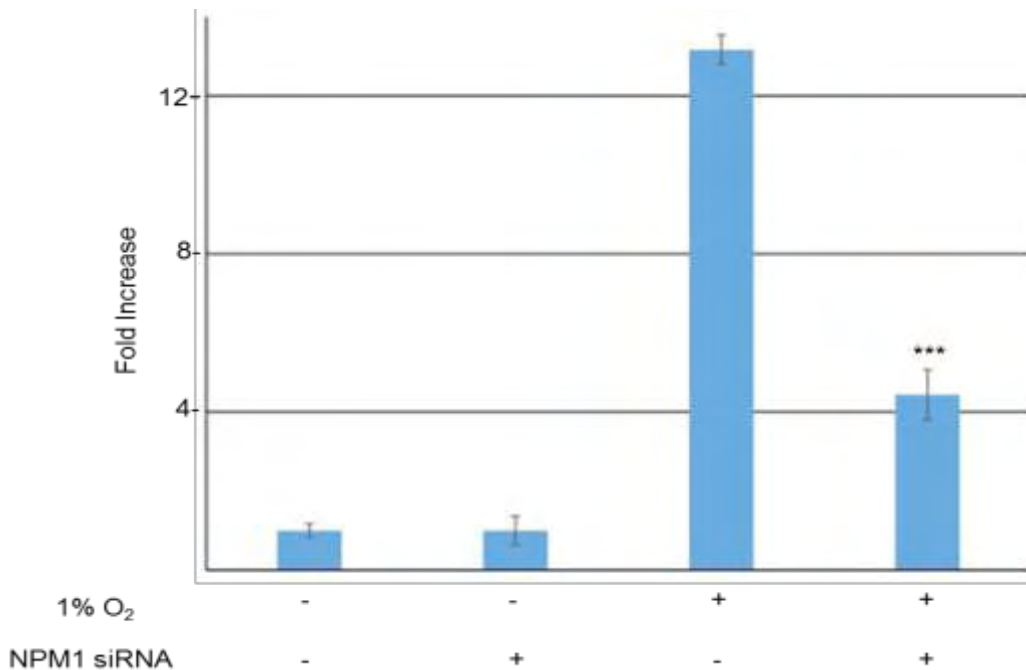
Μέρος των κυτταρολυμάτων (~1/4) χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση για τον έλεγχο της αποσιώπησης της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης και της επίδρασης της στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α. Το υπόλοιπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των επιπέδων mRNA γονιδίων στόχων του HIF-1α με Real-Time PCR, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.13. Το γονίδιο που ελέγχθηκε ήταν το P4HA1-1 (prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1) που αποτελεί γνωστό από τη βιβλιογραφία στόχο του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α [79], ενώ σαν γονίδιο ελέγχου για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών (Εικόνα 4. 9) έδειξε την επιτυχή αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Μετά από κανονικοποίηση του σήματος της νουκλεοφοσμίνης με βάση το αντίστοιχο της τουμπουλίνης η αποσιώπηση επιτεύχθηκε σε ποσοστό 70%. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νουκλεοφοσμίνης και σε αυτό το πείραμα επάγονται από την υποξία. Τέλος, η αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α στην υποξία.



Εικόνα 4. 9 Ανθρώπινα κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν για 16 h στους 37°C σε πιατάκια των 60 mm, διαμολύνθηκαν με siRNA για την αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης για 24 h στους 37°C και αναπτύχθηκαν για ακόμα 24 ώρες μετά από αλλαγή θρεπτικού μέσου σε νορμοξία 20% O₂ ή υποξία 1% O₂ στους 37°C. Γίνεται έλεγχος της αποσιώπησης με αντίσωμα έναντι της νουκλεοφοσμίνης (anti-NPM1) των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α (anti-HIF-1α) και της τουμπουλίνης (anti-tubulin) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής Real-Time PCR ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διαφοράς της διαφοράς των κύκλων ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) και εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (νορμοξία). Σύμφωνα με αυτά ο HIF-1 σε συνθήκες υποξίας επάγει πάνω από 12 φορές τα επίπεδα mRNA του P4HA1-1. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοσομίνης ενώ δεν επιδρά στα επίπεδα έκφρασης του mRNA στην νορμοξία, έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική μείωση (~70%) στα επίπεδα mRNA του P4HA1-1 που επάγεται στην υποξία και υποδεικνύει ότι η νουκλεοσομίνη επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 ανεξάρτητα από τα πρωτεϊνικά του επίπεδα (***: $P < 0,001$).



Εικόνα 4. 10 Έλεγχος της επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου *NPM1* στη ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *P4HA1-1* από τον HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μεταβολή (fold increase) σε σχέση με τη νορμοξία απουσία siRNA και αποτελούν μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, τριπλών δειγμάτων (n=6). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της β-ακτίνης. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση. (***: $P < 0.05$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες (HIFs). Ο HIF-1, έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει περιγραφεί η σημασία του σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ερυθροποίηση, η εμβρυική ανάπτυξη και η αγγειογένεση, ενώ ταυτόχρονα έχει επισημανθεί ο κρίσιμος ρόλος του σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως οι ισχαιμίες και ο καρκίνος. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο HIF-1 επηρεάζει τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, προϋποθέτει την αποσαφήνιση των μηχανισμών που τον ρυθμίζουν. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1 μέσω της άλφα υπομονάδας του, που φανερώνουν ένα μέρος της επίδρασης του πολυποίκιλου και μεταβαλλόμενου υποκυτταρικού περιβάλλοντος πάνω στη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα.

Ο HIF-1α εκφράζεται συνεχώς σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ωστόσο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η δράση δύο προλυλο-υδροξυλασών, των PHD και FIH, προωθεί την πρωτεολυτική του αποικοδόμηση και την αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας, αντίστοιχα. Κατά την υποξία ο HIF-1α σταθεροποιείται και καθίσταται μεταγραφικά ενεργός. Ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνωσης ο HIF-1α ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής και πρωτεϊνοσύνθεσης, σε επίπεδο σταθερότητας/αποικοδόμησης και σε επίπεδο υποκυτταρικού εντοπισμού και μεταγραφικής ενεργότητας [1]. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μεταξύ των οποίων σημαντική θέση κατέχει η φωσφορυλίωση [9].

Σε προηγούμενης μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αναδείχθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³, επάγοντας τη πυρηνική του συσσώρευση και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας [73]. Η φωσφορυλίωση στις θέσεις αυτές αποκρύπτει ένα άτυπο υδρόφοβο σήμα πυρηνικής εξαγωγής, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση της εξπορτίνης CRM1 στον HIF-1α. Ο πυρηνικός HIF-1α διμερίζεται με τον ARNT και επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων [74].

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 σε μια νέα πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της νουκλεοφοσμίνης. Επίσης, εξετάστηκε ο πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης αυτής. Η νουκλεοφοσμίνη είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνίσκο, ενώ έχει την ιδιότητα να μετακινείται μεταξύ πυρηνίσκου, πυρήνα και κυτταροπλάσματος [89].

Της παρούσας εργασίας προηγήθηκε μια μελέτη για την ανεύρεση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2. Για

το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως δολώματα πεπτίδια του HIF-1α που περιείχαν την περιοχή φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (ETD), στις μορφές αγρίου τύπου (wt), την φωσφομιμητική (SE) και το μετάλλαγμα που δεν φωσφορυλιώνεται (SA), σε σύντηξη με την GST, για τη συγκατακρήμνιση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa. Σε ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων, εμφανίστηκε μια πρωτεϊνική ζώνη ~35 kDa σε σύνδεση με την φωσφομιμητική μορφή, ενώ σημαντικά μικρότερη ήταν η σύνδεση της με την μορφή αγρίου τύπου. Ανάλυση μέρους του δείγματος με φασματοσκοπία μάζας υπέδειξε ότι η πρωτεϊνική αυτή ζώνη αντιπροσωπεύει κατά πάσα πιθανότητα την νουκλεοφοσμίνη.

Σε αυτήν την εργασία περαιτέρω πειράματα συγκατακρήμνισης επιβεβαίωσαν την ισχυρή *in vitro* αλληλεπίδραση της φωσφομιμητικής μορφής του πεπτιδίου GST-ETD SE, με τη νουκλεοφοσμίνη (Εικ. 4.1 Δ), ενώ το ίδιο επιτεύχθηκε και για το μεγαλύτερο πεπτίδιο GST-HIF-1α 348-826 SE (Εικ. 4.3). Στη συνέχεια μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η αλληλεπίδραση των ενδογενών πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa στην υποξία και σε συνδυασμό με συνθήκες αναστολής των ERK1/2. Η νουκλεοφοσμίνη σε νορμοξία και υποξία ακολουθεί το ίδιο πρότυπο εντοπισμού. Μάλιστα η κατανομή της μοιάζει με αυτήν σε πυρηνικά σωματίδια που έχει προταθεί ότι επάγεται από φωσφορυλίωση της Thr¹⁹⁹ από την CDK2/cyclin E [105]. Ακόμη πυρηνοπλασματικός εντοπισμός της νουκλεοφοσμίνης, έχει συνδεθεί με την ακετυλίωσή της από την p300 (101). Στις συνθήκες αναστολής των ERK εντοπίζεται πιο έντονα στην περιφέρεια του πυρηνίσκου κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες υπό την επίδραση έλλειψης θρεπτικού και αντικαρκινικών φαρμάκων [106]. Ο HIF-1α σε συνθήκες υποξίας σταθεροποιείται και εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα, ενώ υπό συνθήκες αναστολής των ERK1/2 μεγάλο μέρος του μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτό είναι σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου εργαστηρίου βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που περιέγραψαν την CRM1-εξαρτώμενη έξοδο του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α από τον πυρήνα [74]. Ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας αναλύθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με τεστ του ελεύθερου λογισμικού ImageJ (Εικ. 4.6) που έδειξαν υψηλό συνεντοπισμό (60%) των δύο πρωτεϊνών σε συνθήκες πλήρους θρέψης, ενώ αυτός μειώνεται σημαντικά κατά 20% στις δύο συνθήκες αναστολής των ERK1/2. Η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την νουκλεοφοσμίνη έγινε με ανοσοκατακρήμνιση ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (Εικ.4.7). Το αποτέλεσμα της ανοσοκατακρήμνισης έδειξε την ισχυρή αλληλεπίδραση HIF-1α/νουκλεοφοσμίνης όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ενεργό. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της νουκλεοφοσμίνης στην υποξία, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτη που περιγράφει την ύπαρξη HIF-1α-εξαρτώμενου HRE στον υποκινητή του γονιδίου *NPM1* [103].

Τόσο τα αποτελέσματα του συνεντοπισμού όσο και αυτά της ανοσοκατακρήμνισης οδήγησαν σε δύο πιθανά σενάρια. Είτε ότι η νουκλεοφοσμίνη αλληλεπιδρά με υψηλή συγγένεια με τον φωσφορυλιωμένο HIF-1α, είτε ότι η αλληλεπίδραση με HIF-1α είναι εντονότερη λόγω συνεντοπισμού στον πυρήνα, και μειώνεται όταν ο μη φωσφορυλιωμένος HIF-1α εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Για να δοθεί απάντηση σε αυτό το δίλημμα έγινε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων που είχαν επιμολυνθεί και υπερεκφράσει GFP-χμιαϊκό HIF-1α πλήρους μεγέθους σε μορφές wt, SE , αλλά και IA/SA ενός μεταλλάγματος που δε φωσφορυλιώνεται αλλά παραμένει πυρηνικό [74]. Δείχτηκε ότι οι μεταλλάξεις του HIF-1α δεν επηρεάζουν την δημιουργία συμπλόκου με τον ARNT αλλά την αλληλεπίδραση με την νουκλεοφοσμίνη.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση της νουκλεοφοσμίνης με τον HIF-1α είναι ειδική και εξαρτάται από την φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε καρκινικά κύτταρα HeLa.

Για να εξεταστεί η επίδραση αυτής της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης στη λειτουργία του HIF-1α ακολούθησαν πειράματα αποσιώπησης της νουκλεοφοσμίνης σε κύτταρα HeLa. Η νουκλεοφοσμίνη, που επάγεται από την υποξία, δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α (Εικ 4.9). Ωστόσο ανάλυση με qRT-PCR για το mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1, *PH4A1-1*, έδειξε μείωση της επαγωγής των επιπέδων mRNA, με αποσιώπηση της νουκλεοφοσμίνης (Εικ. 4.10). Δίνοντας, έτσι, μια πρώτη ένδειξη ότι η νουκλεοφοσμίνη επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

Προτείνεται λοιπόν, ότι η αλληλεπίδραση της νουκλεοφοσμίνης με τον φωσφορυλιωμένο από τις ERK1/2 HIF-1α, είναι σημαντική για την πλήρη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, χωρίς να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα αλλά και τον διμερισμό του με τον ARNT.

Μελλοντικά τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να επαληθευτούν με τα αντίστροφα πειράματα συγκατακρήμνισης και ανοσοκατακρήμνισης με τη νουκλεοφοσμίνη ως δόλωμα, να μελετηθούν περαιτέρω ως προς τις περιοχές αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και να βρεθεί αν η αλληλεπίδραση αυτή είναι ειδική για τον HIF-1α ή υφίσταται και με τον HIF-2α.

Ωστόσο μεγάλης σημασίας είναι και η επαλήθευση της επίδρασης της νουκλεοφοσμίνης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α και η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται. Ακόμη ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης μπορεί να δείξει σύνδεση της νουκλεοφοσμίνης στους υποκινητές γονιδίων στόχων του HIF-1. Είναι γνωστή η ιδιότητα της νουκλεοφοσμίνης να προσδένει νουκλεϊκά οξέα και μάλιστα πρόσφατες μελέτες δείχνουν τη προτίμησή της για δομές G-quadruplex [107] που έχουν βρεθεί στους υποκινητές αρκετών γονιδίων, μεταξύ των οποίων και το γνωστό γονίδιο στόχος του HIF-1α VEGF [108].

Όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά, η νουκλεοφοσμίνη έχει βρεθεί πως σχετίζεται με τη μεταγραφή την οποία μπορεί να επάγει ή να καταστείλει, ανάλογα με την αλληλεπίδρασή της με διαφορετικούς συμπαράγοντες. Ακετυλίωση της από την p300 την οδηγεί σε πυρηνοπλασματικό εντοπισμό όπου συνεντοπίζεται με την RNA πολυμεράση II στις περιοχές ευχρωματίνης, ενώ έχει προταθεί ότι η νουκλεοφοσμίνη αλληλεπιδρά με την p300 και επάγει την ακετυλίωση τόσο της ίδιας όσο και των ιστονών του πυρήνα του νουκλεοσώματος και εν συνεχεία παρουσιάζει αυξημένη ενεργότητα μεταφοράς των ακετυλιωμένων ιστονών και αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (101, 102). Από την άλλη ο HIF-1α ενεργοποιείται μεταγραφικά από την αλληλεπίδρασή του με τις (40). Έτσι, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η αλληλεπίδρασή του HIF-1α με τη νουκλεοφοσμίνη μπορεί να ενισχύει σημαντικά την αλληλεπίδραση του με τους συμπαράγοντες μεταγραφής p300/CBP αλλά και στη σύνδεση του σε υποκινητές γονιδίων, καθιστώντας τους προσιτούς μέσω της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης.

Τέλος, έχει ήδη αναφερθεί ο σημαντικός ρόλος των δύο πρωτεϊνών στον καρκίνο και η υπερέκφραση τους είναι χαρακτηριστικό πολλών τύπων καρκίνου. Καθώς, η νουκλεοφοσμίνη επάγεται στην υποξία με HIF-1-εξαρτώμενο τρόπο [103] και η ίδια ενεργοποιεί τον HIF-1α, η ταυτοποίηση της νέας αυτής αλληλεπίδρασης μπορεί να αποτελεί ένα νέο μηχανισμό θετικής επανατροφοδότησης σημαντικό για την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Έτσι η περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης μπορεί να προσφέρει νέα οπτική στους μηχανισμούς κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και της βιολογίας του καρκίνου, ενώ μπορεί να υποδείξει νέους στόχους στην παρασκευή αντικαρκινικών ουσιών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine *Cell* 148:399-408
2. Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 *Physiology (Bethesda)* 24:97-106
3. Dunwoodie SL (2009) The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo *Dev Cell* 17:755-73
4. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. (2010) Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells *Cell Stem Cell* 7:391-402
5. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. (2007) The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development *J Clin Invest* 117:1616-26
6. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5510-4
7. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A Novel bHLH-PAS Factor with Close Sequence Similarity to Hypoxia-Inducible Factor 1 α ; (HIF1 α) Regulates the VEGF, Expression and is Potentially Involved in Lung and Vascular Development *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4273-8
8. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α *Gene Expr* 7:205-13
9. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:1-15
10. Smirnova NA, Hushpulier DM, Speer RE, Gaisina IN, Ratan RR, Gazaryan IG (2012) Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases *Biochemistry (Mosc)* 77:1108-19
11. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M (2005) Human HIF-3 α is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma *FASEB J* 19:1396-406
12. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L (2000) Redox-Regulated Recruitment of the Transcriptional Coactivators CREB-Binding Protein and SRC-1 to Hypoxia-Inducible Factor 1 α *Mol Cell Biol* 20:402-15
13. Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ (2008) Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element *Clin Chim Acta* 395:6-13
14. Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation *Mol Cell Biol* 12:5447-54

15. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G (2012) Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression *J Cell Sci* 125:3485-93
16. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniossoglou S, et al. (2015) CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation *Cell Signal* 27:1129-40
17. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003) Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation *Mol Cell Biol* 23:9361-74
18. Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells *Genes Dev* 11:72-82
19. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs *FASEB J* 17:271-3
20. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-92
21. Semenza GL (2001) HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus *Cell* 107:1-3
22. Metzen E, Stiehl D P, Doege K, Marxsen J H, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W (2005) Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element *Biochem J* 387:711-7
23. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity *Genes Dev* 15:2675-86
24. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T (2005) Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription *J Cell Sci* 118:301-11
25. Kenneth Niall S, Rocha S (2008) Regulation of gene expression by hypoxia *Biochemical Journal* 414:19-29
26. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases *J Biol Chem* 279:9899-904
27. Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL, Reichner JS (2001) HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 281:C1971-C7
28. Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999) Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1 *Blood* 94:1561-7
29. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L (2003) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires

- receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation *Biochem J* 370:1011-7
30. van Uden P, Kenneth N S, Rocha S (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B *Biochem J* 412:477-84
 31. Bonello S, Zahringer C, Belaiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:755-61
 32. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells *Mol Biol Cell* 18:4691-7
 33. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. (2008) Signal Transducer and Activator of Transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells *Mol Cancer Res* 6:1099-105
 34. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. (2010) eIF2 α Kinase PKR Modulates the Hypoxic Response by Stat3-Dependent Transcriptional Suppression of HIF-1 α *Cancer Research* 70:7820-9
 35. Gorlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison *Biochem J* 412:e17-9
 36. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy *Nat Rev Cancer* 3:721-32
 37. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway *J Biol Chem* 277:29936-44
 38. Liu YV, Semenza GL (2007) RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization *Cell Cycle* 6:656-9
 39. Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL (2007) Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1 α *J Biol Chem* 282:33358-66
 40. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabeesh NJ (2009) SEPT9_v1 Up-regulates Hypoxia-inducible Factor 1 by Preventing Its J Biol Chem 284:11142-51
 41. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, et al. (2013) MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization *Biochim Biophys Acta* 1833:1378-87
 42. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. (2007) MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity *Cell Physiol Biochem* 20:995-1006
 43. Fels DR, Koumenis C (2005) HIF-1 α and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* 30:426-9
 44. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer *Nat Rev Cancer* 8:51-6

45. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation *Cell* 111:709-20
46. Wei W, Yu XD (2007) Hypoxia-inducible factors: crosstalk between their protein stability and protein degradation *Cancer Lett* 257:145-56
47. Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, et al. (2011) HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia *J Biol Chem* 286:38095-102
48. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW (2010) Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha *Mol Cell* 38:864-78
49. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, et al. (2012) HIF1 α Protein Stability Is Increased by Acetylation at Lysine 709 *J Biol Chem* 287:35496-505
50. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS (2003) S-nitrosylation in health and disease *Trends Mol Med* 9:160-8
51. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J (2007) Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2 *J Biol Chem* 282:1788-96
52. Yasinska IM, Sumbayev VV (2003) S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity *FEBS Lett* 549:105-9
53. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG (2007) Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha *FEBS Lett* 581:1542-8
54. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. (2004) Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity *Biochem Biophys Res Commun* 324:394-400
55. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ETH (2007) SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia *Cell* 131:584-95
56. Wang GL, Semenza GL (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia *J Biol Chem* 268:21513-8
57. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity *Int J Cancer* 117:764-74
58. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. (2004) Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity *Biochem J* 383:429-37
59. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ (2010) mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α *Mol Cell* 40:509-20
60. Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner *Mol Cell Biol* 27:3253-65

61. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W (2010) Plk3 Functions as an Essential Component of the Hypoxia Regulatory Pathway by Direct Phosphorylation of HIF-1 α J Biol Chem 285:38944-50
62. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G (2010) Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1 J Cell Sci 123:2976-86
63. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS (2013) CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth Cell Cycle 12:3689-701
64. Hubbi ME, Gilkes DM, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Semenza GL (2014) Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression Proc Natl Acad Sci U S A 111:E3325-34
65. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, et al. (2016) Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 Sci Signal 9:ra56
66. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. (2008) Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1783:394-404
67. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G (2009) Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7 Biochem Biophys Res Commun 390:235-40
68. Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades Curr Opin Cell Biol 8:205-15
69. Zhang J, Liu Q, Fang Z, Hu X, Huang F, Tang L, et al. (2016) Hypoxia induces the proliferation of endothelial progenitor cells via upregulation of Apelin/APLNR/MAPK signaling Mol Med Rep 13:1801-6
70. Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family Cell Signal 15:463-9
71. Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D (2001) Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways Oncogene 20:7624-34
72. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1 J Biol Chem 274:32631-7
73. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α J Biol Chem 281:33095-106
74. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK J Biol Chem 283:27620-7

75. Mylonis I, Simos G (2012) The Involvement of the ERK-Hypoxia-Angiogenesis Signaling Axis and HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma. *HEPATOCELLULAR CARCINOMA – BASIC RESEARCH* (Editor: Wan-Yee Lau):253-74
76. Liao D, Johnson RS (2007) Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer *Cancer Metastasis Rev* 26:281-90
77. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2007) Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation *Essays Biochem* 43:165-78
78. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia *Cell Metabolism* 3:177-85
79. Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W, et al. (2013) A nontranscriptional role for HIF-1 α as a direct inhibitor of DNA replication *Sci Signal* 6:ra10
80. Barnhart BC, Simon MC (2007) Metastasis and stem cell pathways *Cancer Metastasis Rev* 26:261-71
81. Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M (2007) Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues *Cancer Metastasis Rev* 26:273-9
82. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS (2007) Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is a Key Regulator of Metastasis in a Transgenic Model of Cancer Initiation and Progression *Cancer Research* 67:563-72
83. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW (2007) Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment *Cancer Metastasis Rev* 26:241-8
84. Shenoy N, Pagliaro L (2016) Sequential pathogenesis of metastatic VHL mutant clear cell renal cell carcinoma: putting it together with a translational perspective *Ann Oncol* 27:1685-95
85. Friedrich CA (1999) Von Hippel-Lindau Syndrome *Cancer* 86:2478-82
86. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase *Cancer Cell* 7:77-85
87. Lee HY, Lee T, Lee N, Yang EG, Lee C, Lee J, et al. (2011) Src activates HIF-1 α not through direct phosphorylation of HIF-1 α specific prolyl-4 hydroxylase 2 but through activation of the NADPH oxidase/Rac pathway *Carcinogenesis* 32:703-12
88. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy *Trends Pharmacol Sci* 33:207-14
89. Okuwaki M (2008) The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein *J Biochem* 143:441-8
90. Frehlick LJ, Eirin-Lopez JM, Ausio J (2007) New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones *Bioessays* 29:49-59

91. Dutta S, Akey IV, Dingwall C, Hartman KL, Laue T, Nolte RT, et al. (2001) The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly *Mol Cell* 8:841-53
92. Huang N, Negi S, Szebeni A, Olson MO (2005) Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis *J Biol Chem* 280:5496-502
93. Mitrea DM, Grace CR, Buljan M, Yun MK, Pytel NJ, Satumba J, et al. (2014) Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4466-71
94. Poletto M, Lirussi L, Wilson DM, Tell G (2014) Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins *Mol Biol Cell* 25:1641-52
95. Lindstrom MS (2011) NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling *Biochem Res Int* 2011:195209
96. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication *Cell* 103:127-40
97. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, et al. (2004) Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation *Cancer Cell* 5:465-75
98. Herrera JE, Savkur R, Olson MO (1995) The ribonuclease activity of nucleolar protein B23 *Nucleic Acids Res* 23:3974-9
99. Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K (2002) The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype *Mol Biol Cell* 13:2016-30
100. Yu Y, Maggi LB, Jr., Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, et al. (2006) Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export *Mol Cell Biol* 26:3798-809
101. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK (2005) Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription *Mol Cell Biol* 25:7534-45
102. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK (2009) Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation *Mol Cell Biol* 29:5115-27
103. Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q (2004) Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53 *J Biol Chem* 279:41275-9
104. Lim MJ, Wang XW (2006) Nucleophosmin and human cancer *Cancer Detect Prev* 30:481-90
105. Tarapore P, Shinmura K, Suzuki H, Tokuyama Y, Kim SH, Mayeda A, et al. (2006) Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing *FEBS Lett* 580:399-409

106. Smetana K, Busch R, Chan PK, Smetana K, Jr., Busch H (2001) Immunocytochemical localization of nucleophosmin and RH-II/Gu protein in nucleoli of HeLa cells after treatment with actinomycin D *Acta Histochem* 103:325-33
107. Scognamiglio PL, Di Natale C, Leone M, Poletto M, Vitagliano L, Tell G, et al. (2014) G-quadruplex DNA recognition by nucleophosmin: new insights from protein dissection *Biochim Biophys Acta* 1840:2050-9
108. Sun D, Guo K, Shin YJ (2011) Evidence of the formation of G-quadruplex structures in the promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene *Nucleic Acids Res* 39:1256-65