

**Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία & Θεραπευτική»**

Διπλωματική Εργασία:

**«Σχεδιασμός Ειδικών Πεπτιδίων – Αναστολέων
της Αλληλεπίδρασης του Μεταγραφικού
Παράγοντα HIF-1α με τις MAP Κινάσες με
Πιθανές Φαρμακολογικές Εφαρμογές»**

Καραπέτσας Θανάσης

Επιβλέπων: Δρ. Αλ. Γαλάνης,

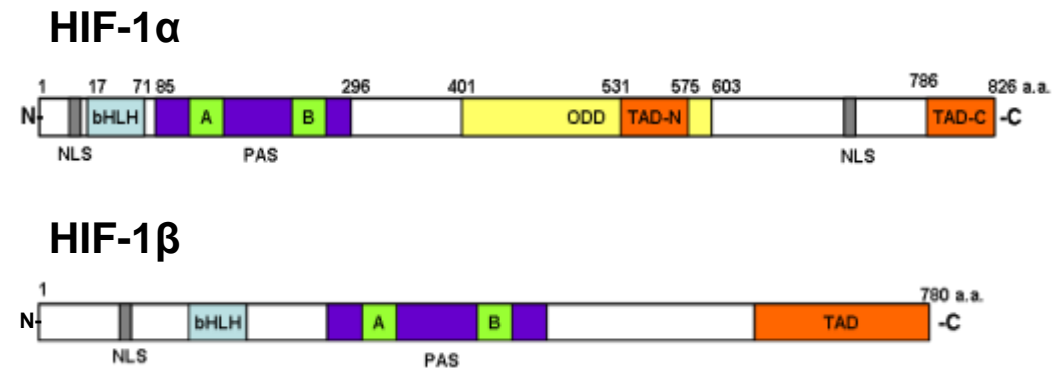
Λέκτορας Μορ. Βιολογίας,

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δ.Π.Θ.

Αλεξανδρούπολη 2010

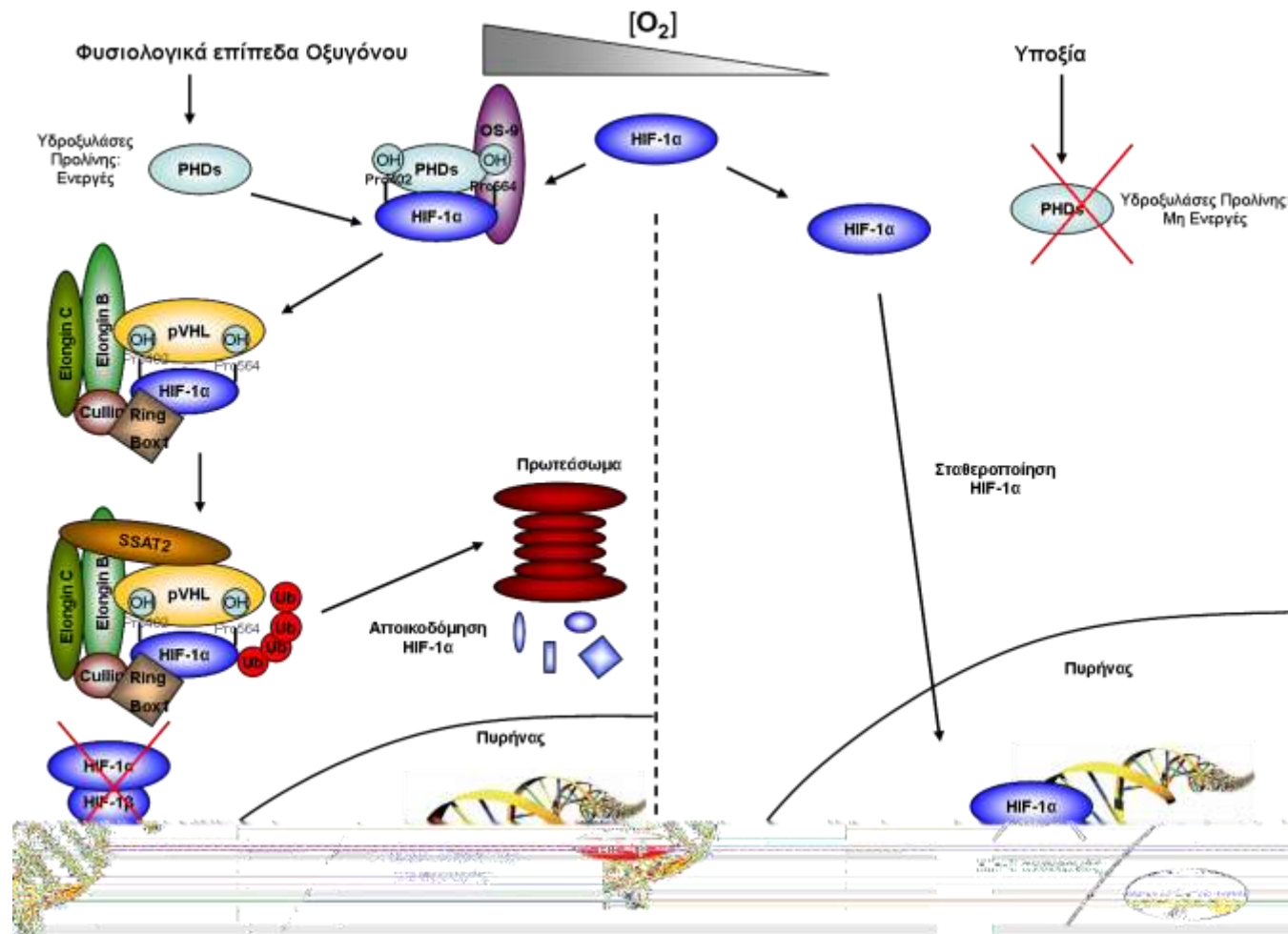
Υποξία και HIF-1

- **Υποξία:** Χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε ένα κύτταρο, ιστό, όργανο. Παρατηρείται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (π.χ. εμβρυογένεση, καρκίνος κ.α.) .
- **HIF-1** (Hypoxia Inducible Factor-1): Βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία.
- Ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη **γλυκόλυση** (π.χ. Glut), την **αγγειογένεση** (π.χ. VEGF), την **ερυθροποίηση** (π.χ. EPO) κ.α.
- Εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες.



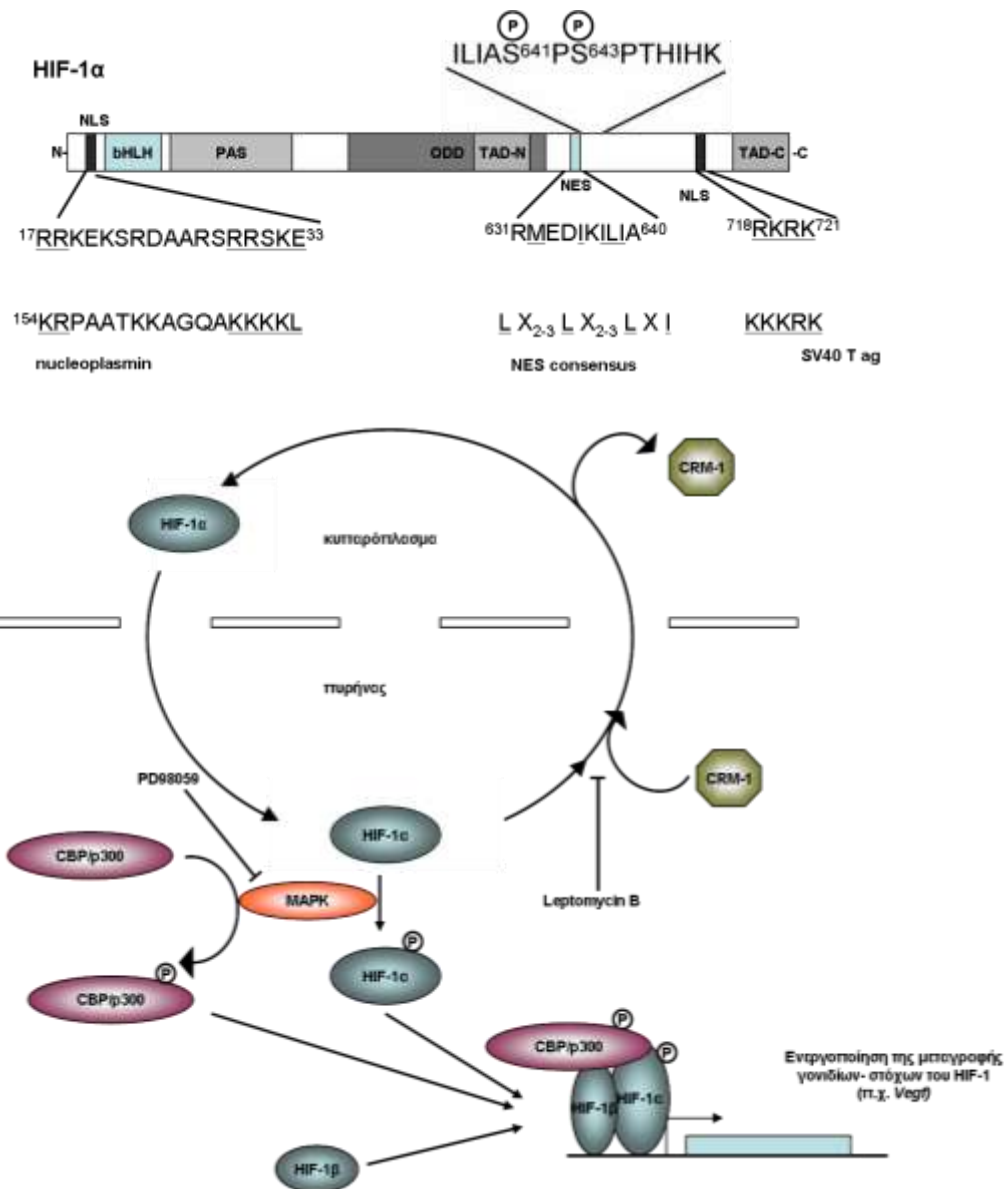
➔ **Σημαντικός θεραπευτικός στόχος.**

Ρύθμιση του HIF-1α



- Διάφορες άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. φωσφορυλίωση) επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

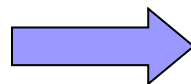
HIF-1α και MAP κινάσες



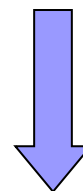
- Η υπομονάδα HIF-1α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από τις MAP κινάσες (*Richard et al 1999, Minet et al 2000, Sodhi et al 2001*).
- Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τη MAP κινάση ERK στις θέσεις Ser641 και Ser643 (*Mylonis et al 2006*).
- Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί σε συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και αύξηση της ενεργότητάς του (*Mylonis et al 2008*).
- Αναστολείς των MAP κινασών, (π.χ. PD98059) προκαλούν μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α (*Semenza 2002*).

Στόχος Μελέτης

- Οι MAP κινάσες φωσφορυλιώνουν τους στόχους τους μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες περιοχές των υποστρωμάτων (μοτίβα συναρμογής).

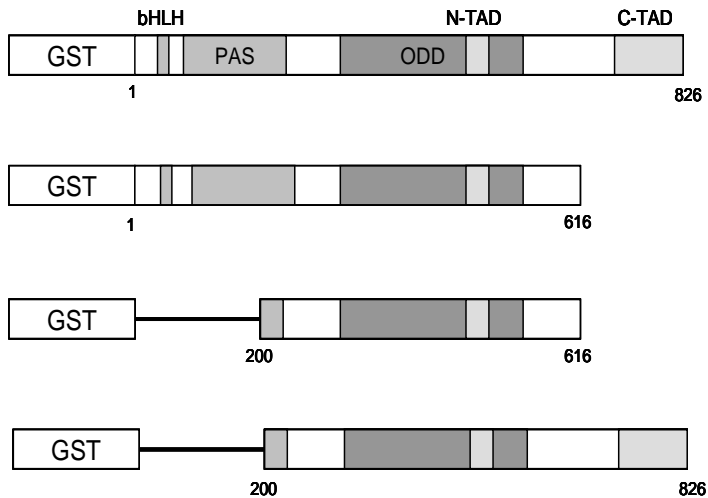


Ανίχνευση της αλληλεπίδρασης HIF-1α - MAP κινάση και ταυτοποίηση της περιοχής αλληλεπίδρασης.



Σχεδιασμός πεπτιδίων που θα αναστέλλουν την αλληλεπίδραση HIF-1α – MAPK.

A1. Κλωνοποίηση, Έκφραση, Απομόνωση και Καθαρισμός του HIF-1α και των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών ελλειμμάτων του

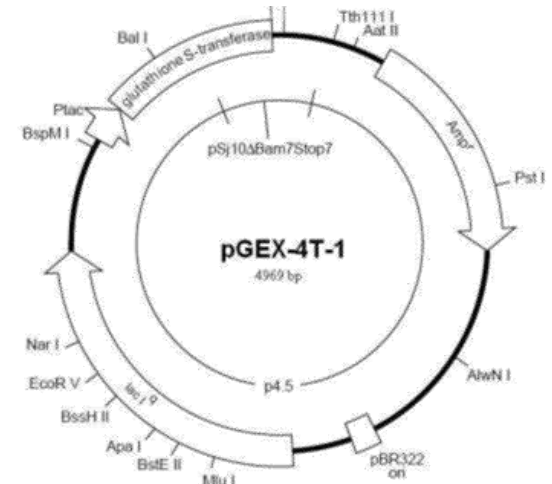


GST-HIF-1α 1-826

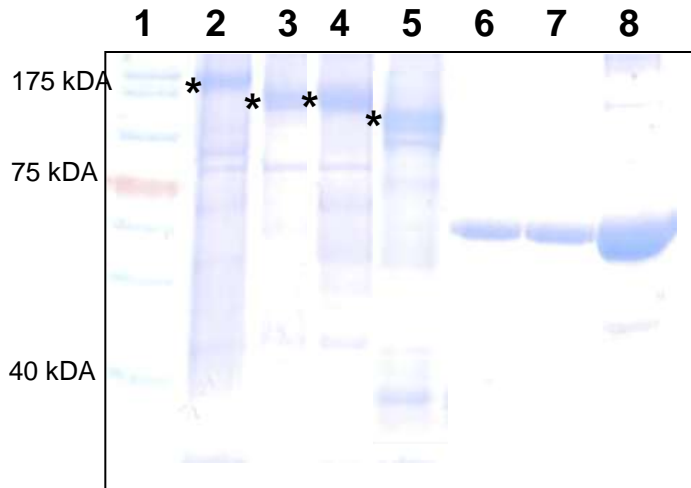
GST-HIF-1α 1-616

GST-HIF-1α 200-616

GST-HIF-1α 200-826



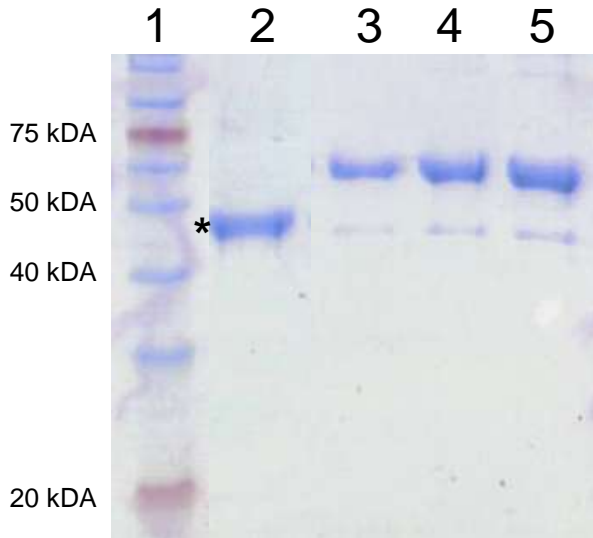
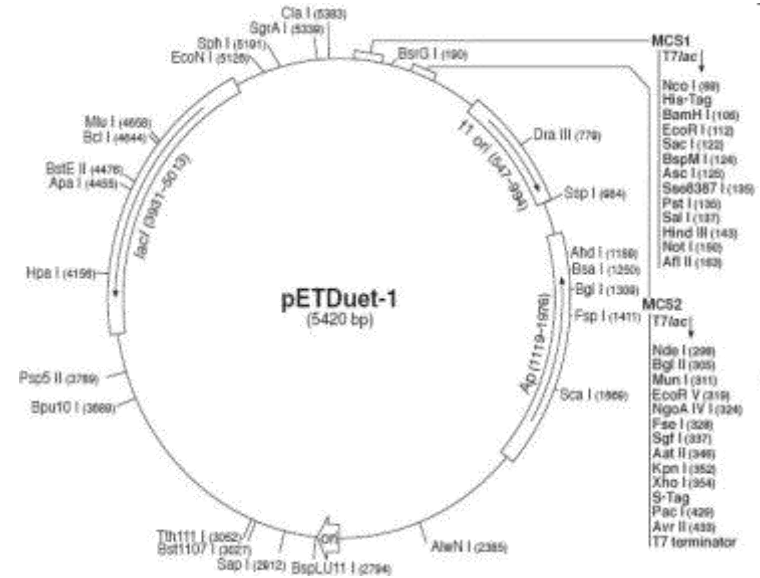
1. Protein ladder
 2. GST-HIF1α(1-826)
 3. GST-HIF1α(1-616)
 4. GST-HIF1α(200-826)
 5. GST-HIF1α(200-616)
 6. 0,5μg
 7. 1μg
 8. 5μg
- } BSA



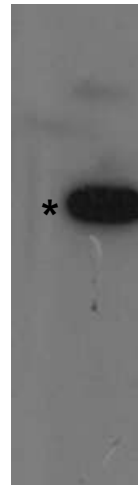
* οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

A2. Κλωνοποίηση, Έκφραση, Απομόνωση και Καθαρισμός της MAP κινάσης ERK2

FLAG peptide



Coomassie

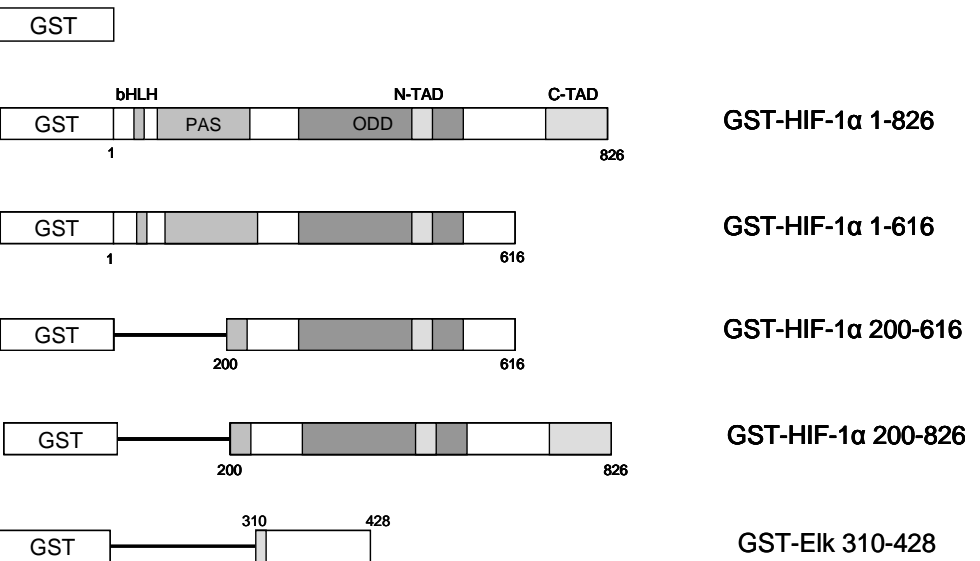


W.B.: anti-FLAG

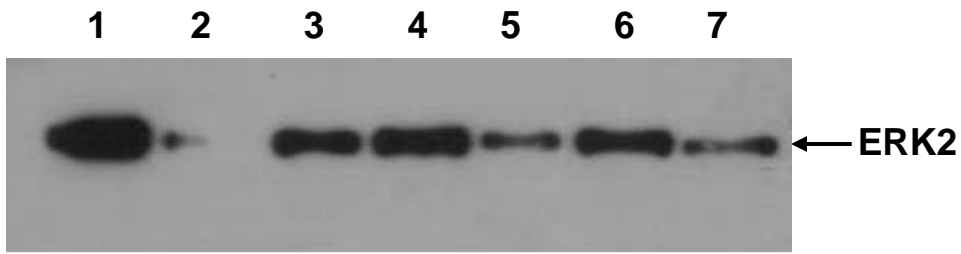
1. Protein ladder
 2. 6xHis ERK2
 3. 0,5µg
 4. 1µg
 5. 2µg
- } BSA

* οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

Γ. Εντοπισμός της περιοχής αλληλεπίδρασης του GST-HIF1α με την ERK2

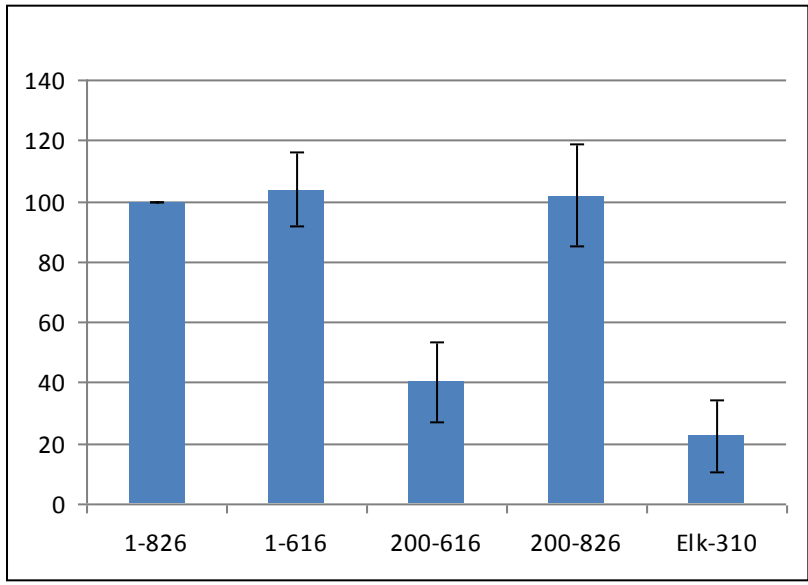


Στην αλληλεπίδραση του HIF-1α με την ERK2 συμμετέχουν δυο ξεχωριστές περιοχές.



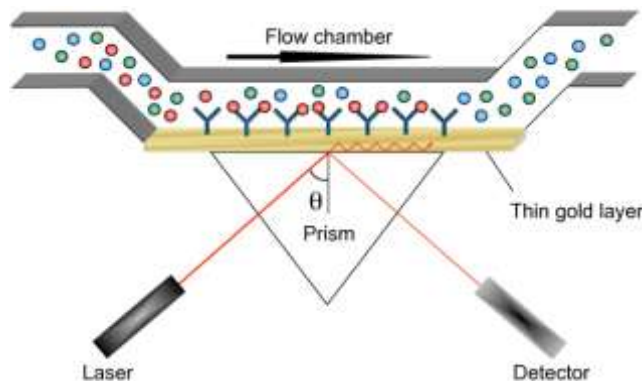
W.B. anti-FLAG

- 1. Input: 10%
- 2. GST
- 3. GST-HIF1α(1-826)
- 4. GST-HIF1α(1-616)
- 5. GST-HIF1α(200-616)
- 6. GST-HIF1α(200-826)
- 6. GST-EIk(310-428)

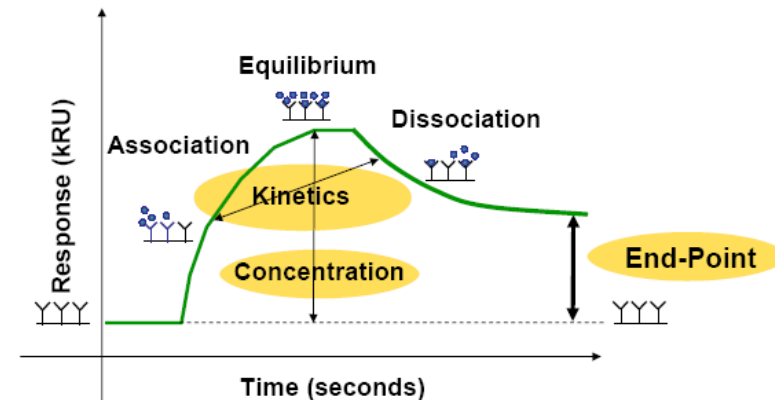


Δ. Μελέτη αλληλεπίδρασης του GST-HIF1α με την 6_{xHis} ERK2 με Φασματοσκοπία SPR (Surface Plasmon Resonance spectroscopy)

- Επιτρέπει τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μακρομορίων (π.χ. πρωτεϊνών, DNA κ.λπ.)
- Υπολογισμός σε πραγματικό χρόνο (real time data) σταθερών κινητικής (k_a , k_d και K_D), συγγένειας αλληλεπίδρασης κ.α.
- Δεν απαιτείται σήμανση των μακρομορίων.
- Βασίζεται στη μεταβολή του δείκτη διάθλασης λόγω της αλληλεπίδρασης ή/και της διάστασης μακρομορίων.

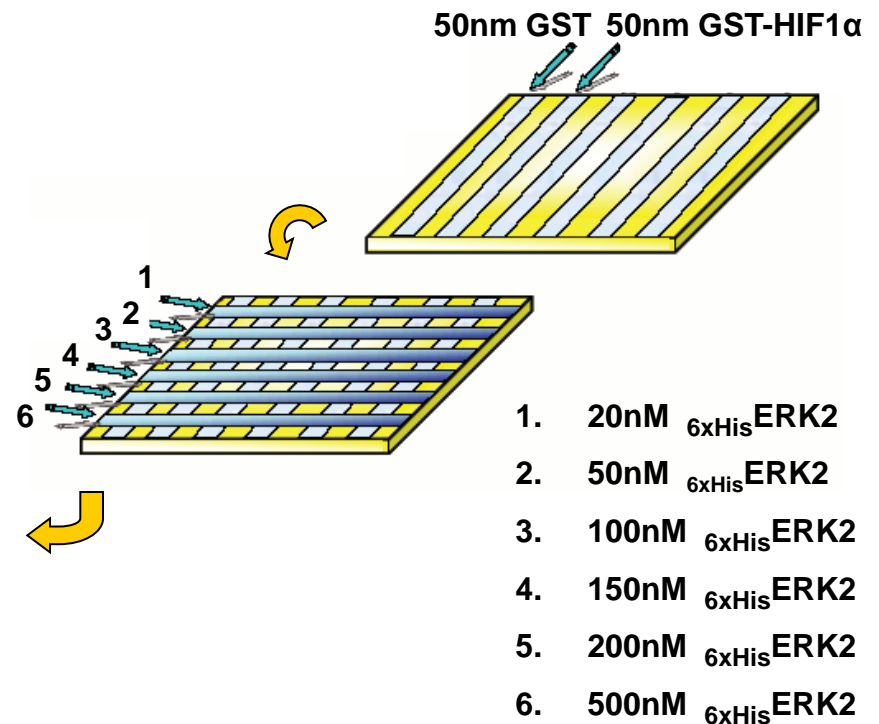
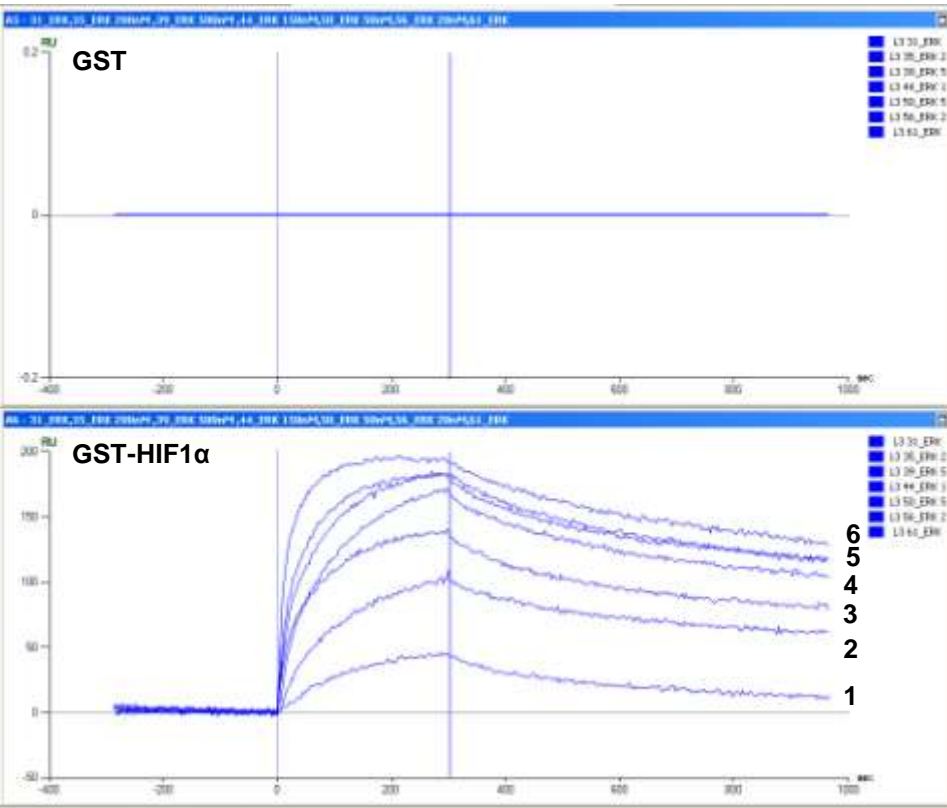


RU = Resonance Unit



(πηγή: www.BioRad.com)

Δ. Μελέτη αλληλεπίδρασης του GST-HIF1α με την $6xHis$ ERK2 με Φασματοσκοπία SPR (Surface Plasmon Resonance spectroscopy)

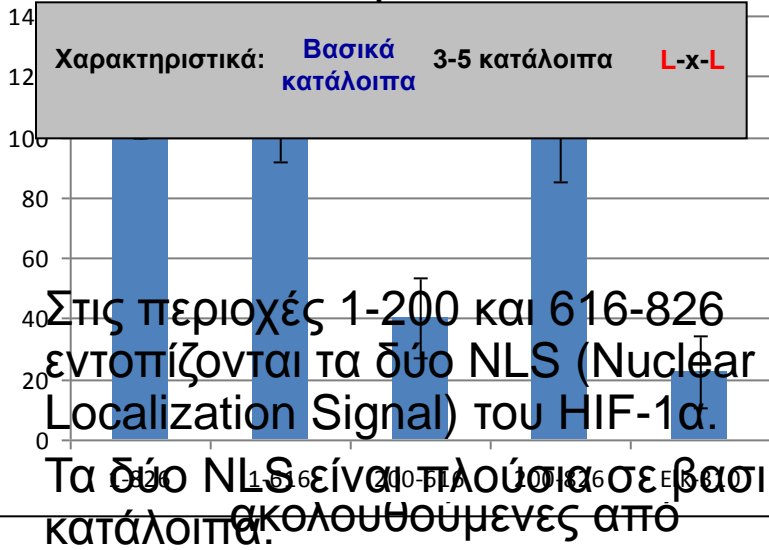


Parameter	Rmax	KD	Chi2
Units	RU	M	RU
Scope	Grouped	Grouped	
Type	Fitted	Fitted	N/A
Eqlib NO 150 NO 15T 100			
L2 - 31_ERK,35_ERK 200nM ,39_ERK 500nM ,44_ERK 150nM,50_ERK 50nM,56_ERK 20nM,61_ERK	233.6	2.43E-07	46.82

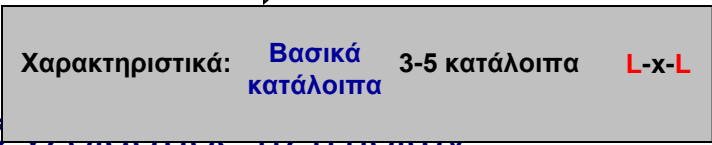
Ο HIF-1α αλληλεπιδρά ισχυρά με την ERK2

Δ. Σχεδιασμός Πεπτιδίων

Οι MAP κινάσες



Μη τυπικά μοτίβα



Σχεδιασμός πεπτιδίων.

NH₂- ERRKEKSRDAARSRRSKE -COOH

NH₂- LQNAQRKRKMEHD -COOH

	10	20	30	40	50	60
	MEGAGGANDK	KKISSIRRKE	KSRDAARSRR	SKESEVIFYEL	AHQLPLPHNV	SSHLDKASVM
	70	80	90	100	110	120
	RLTISYLRVR	KLLDAGDLDI	EDDMKAQMNC	FYLKALDGFV	MVLTDDGDMI	YISDNVNKYM
	130	140	150	160	170	180
Υπόστρωμα	GLTOFELTGH	SVFDFTHPCD	HEEMBRLTH	RNGLVKKGKE	QNTQSEFLR	MKCTLTSRGR
	190	200	210	220	230	240
JunB	TNIKSATSL	VLLKPSLA	YDTSNQDQ	QVWISMTCL	VLICEPIPH	SNIEIPLDSK
	250	260	270	280	300	
ATF4a	SRHSRHS	VHKHKHE	ELMATEP	QSP	QVWIS	JNK
	310	320	330	340	350	360
EIK1	QYRML	IGPKPRD	ATVLEKPK	SPVLCVNY	VVSGE	ERK / JNK
	370	380	390	400	410	420
LIN1	QVSESEMK	GMKPNP	EDSSDFDK	TEDELTL	APAAG	ERK
	430	440	450	460	470	480
SAP1	DQLEEV	RSKKPKG	ELGLAPT	LVI	PLRSS	ERK / p38
	490	500	510	520	530	540
MEF2A	ASLEL	NSRKKPD	PSDGSTG	PS PEPNSPSAYC	FYVDS	p38
	590	600				
Χαρακτηριστικά:	Βασικά Κατάλοιπα	L X L	Υδρόφοβα κατάλοιπα			
	650	660				
	VFQQTQIQEP	TANATTTTAT	TDELKTVTKD	RMEDIKILIA	SPSPTHIHKE	TTSATSSPYR
	670	680	690	700	710	720
	DTQSRASP	RAGKGVIEQT	EKSHPRSPNV	LSVALSQRTT	VPEEELNPKI	LALQNAQRKR
	730	740	750	760	770	780
	KNEHDGSLFQ	AVGIGITLLQ	PDDHAATTSL	SWKRVKGGKS	SEQNGMEQKT	IILIPSDLAC
	790	800	810	820		
	RLLGQSMDES	GLPQLTSYDC	EVNAPIQGS	NLLQGEELLR	ALDQVN	

Συμπερασματικά:

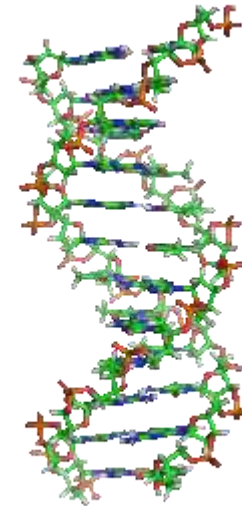
- Ο HIF-1α αλληλεπιδρά άμεσα και με μεγάλη συγγένεια με την MAP κινάση ERK2.
- Στην αλληλεπίδραση συμμετέχουν δυο ανεξάρτητες περιοχές του HIF-1α.
- Σε αυτές τις περιοχές εντοπίζονται τα δύο NLS , πλούσια σε βασικά κατάλοιπα.
- Ο σχεδιασμός των πεπτιδίων έγινε με βάση τα NLS.

Μελλοντικοί στόχοι

- Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων in vitro και in vivo.

Ευχαριστίες

- Επιβλέπων: **Γαλάνης Αλέξης**,
Λέκτορας Μορ. Βιολογίας,
Τμήμα Μορ. Βιολογίας & Γενετικής,
Δ.Π.Θ.
- **Ραφαήλ Σανδαλτζόπουλος**,
Αναπλ. Καθηγητής Μορ. Βιολογίας,
Τμήμα Μορ. Βιολογίας & Γενετικής,
Δ.Π.Θ.
- **Μαρία Παυλάκη**, PhD.
Senior Scientist, C.I.B.I.T. Facility,
Τμήμα Μορ. Βιολογίας & Γενετικής,
Δ.Π.Θ.



Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δ.Π.Θ.

