



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**«Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης στη
ρύθμιση και λειτουργία της πρωτεΐνης
EXOSC10 κατά την υποξία»**

Υπό
ΧΡΥΣΑΣ ΦΙΛΙΠΠΟΠΟΥΛΟΥ
Βιοχημικού-Βιοτεχνολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2023

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με την υποστήριξη του ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου ερευνητικού έργου «Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία.» (κωδ. 1460, Επιστημονική Υπεύθυνη Γ. Χαχάμη).

© 2023 Χρύσα Φιλιπποπούλου

Η έγκριση της διδακτορική διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932.

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (ΣΤΙ 4η/15.11.2023):

1^{ος} Εξεταστής	Γεωργία Χαχάμη
Επιβλέπουσα	Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Ηλίας Μυλωνής
	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Γεώργιος Σίμος
	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Παναγιώτης Λιάκος
	Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Ευφροσύνη Παρασκευά
	Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6^{ος} Εξεταστής	Αντώνιος Γιακουντής
	Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7^{ος} Εξεταστής	Νικόλαος Μπαλατσός
	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κυρίας Γεωργίας Χαχάμη.

Καταρχάς, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς την επιβλέπουσα μου, κα Χαχάμη, για την ευκαιρία που μου παραχώρησε αρχικά στις μεταπτυχιακές μου σπουδές και στη συνέχεια στη διδακτορική μου έρευνα να είμαι μέλος της ερευνητικής της ομάδας, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε προς εμένα. Εκτίμησα ιδιαίτερα το γεγονός ότι μέσα από τη συνεργασία και την επικοινωνία μας, προσέφερε έναν δημιουργικό χώρο για την ανάπτυξη μου υπό την συνεχή και προσεκτική καθοδήγηση της, βοηθώντας με να αποκτήσω αυτοπεποίθηση και να εξελιχθώ γρήγορα κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου έρευνας. Η υποστήριξη, η εμπειρία, οι συμβουλές και η καθοδήγηση της αποδείχθηκαν εξαιρετικά εποικοδομητικές όχι μόνο στην αντιμετώπιση διαφόρων προκλήσεων, αλλά και στην δική μου προσωπική εξέλιξη. Επιπλέον, δεν μπορώ παρά να εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση για τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Η δυνατότητα παρακολούθησης συνεδρίων, η συμμετοχή σε ερευνητικές συνεργασίες και η ευκαιρία να ταξιδέψω σε εξωτερικά εργαστήρια αποδείχθηκαν καταλυτικές για την προσωπική και ακαδημαϊκή μου ανάπτυξη.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο. Η ευκαιρία που μου παραχώρησε να γίνω μέλος αυτού του εργαστηρίου και η αμέριστη βοήθεια του αποδείχθηκαν καθοριστικές για την ανάπτυξη της διδακτορικής μου έρευνας, καθώς και για την δική μου εξέλιξη ως διδακτορικού φοιτητή. Οι συμβουλές, οι επισημάνσεις και οι πολύτιμες γνώσεις του συνέβαλαν ουσιαστικά στον τρόπο σκέψης και εργασίας μου, ενώ η συμβολή του ήταν καθοριστική στην παρακολούθηση, στον συντονισμό και στην διαμόρφωση της παρούσας διδακτορικής έρευνας.

Δεν θα ήταν πλήρες το μήνυμά των ευχαριστιών, χωρίς να αναφέρω τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας, κ. Η. Μυλωνή, κ. Π. Λιάκο, κ. Ε. Γεωργάτσου και την Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Ευφροσύνη Παρασκευά. Οι συζητήσεις και οι συμβουλές κατά την διεξαγωγή των ερευνητικών σεμιναρίων, καθώς και η άμεση βοήθεια κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου έρευνας είχαν μεγάλη σημασία για την εξέλιξη και την ολοκλήρωση αυτής. Επίσης, θα

ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα δύο μέλη ΔΕΠ της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ.Α.Γιακουντή και κ.Ν.Μπαλατσό για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και τον χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα υπόλοιπα μέλη που στελεχώνουν το εργαστήριο Βιοχημείας εκ των οποίων μετα-διδάκτορες, υποψήφιοι διδάκτορες, μεταπτυχιακοί και προπτυχιακοί φοιτητές για την αρμονική συνύπαρξη και συνεργασία.

Τέλος, το μεγαλύτερο και πιο πολύτιμο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς στην οικογένειά μου. Συγκεκριμένα, πρώτα στους γονείς μου, Νικόλαο και Θεοδώρα, καθώς και στα αδέρφια μου, Εύη και Φώτη, οι οποίοι πέρασαν τόσο τις δύσκολες όσο και τις χαρούμενες στιγμές στον ίδιο και εντονότερο βαθμό από εμένα και με συμβούλευαν διαρκώς να αντιμετωπίζω κάθε πρόβλημα ή εμπόδιο με ήθος και σοβαρότητα. Για την μεγάλη οικονομική στήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια στην πορεία μου λόγω της αμέριστης εμπιστοσύνης που τρέφουν προς το πρόσωπο και τις ικανότητές μου. Χωρίς την συντροφιά, την πίστη και την κάθε μορφής στήριξη τους δεν θα είχα καταφέρει να φτάσω στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής έρευνας.

Χρύσα Φιλιπποπούλου

Στους γονείς μου, Νίκο και Θεοδώρα,
που αποτελούν πάντα το μοναδικό μου στήριγμα σε ότι κι αν κάνω

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

12/2019 – 11/2023

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με τίτλο: "Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης στη ρύθμιση και λειτουργία της πρωτεΐνης EXOSC10 κατά την υποξία"

Τοποθεσία: Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα)

Επιβλέπουσα διδακτορικής διατριβής: Δρ. Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

11/2018–11/2019

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης με τίτλο "Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής" (Βαθμός: 9.8)

Τοποθεσία: Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα)

09/2014–10/2018

Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Βαθμός: 6.9)

Τοποθεσία: Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ – ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

06/2022–07/2022

Εκπαίδευση στο εργαστήριο του Καθηγητή Markus Bohnsack και της Δρ. Kate Bohnsack σε τεχνικές που αφορούν την μελέτη RNA

Τοποθεσία: Τμήμα Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν (UMG), Γερμανία

12/2018–10/2019

Εκπόνηση μεταπτυχιακής εργασίας με τίτλο "Μελέτη της σουμοϋλίωσης κατά την υποξία: Ο ρόλος της Exosc10" (Βαθμός: 10.0)

Τοποθεσία: Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα)

Επιβλέπουσα: Δρ. Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

03/2018–10/2018

Εκπόνηση πτυχιακής εργασίας με τίτλο: "Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου της
ιντερλευκίνης 17 σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό" (Βαθμός: 10.0)

Τοποθεσία: Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Λάρισα (Ελλάδα)

Επιβλέπουσα: Δρ. Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής
Φαρμακολογίας, TBB, ΠΘ

07/2017–09/2017

Τρίμηνη πρακτική άσκηση χρηματοδοτούμενη από το ΕΣΠΑ (Εταιρικό Σύμφωνο για
το Πλαίσιο Ανάπτυξης)

Τοποθεσία: Μικροβιολογικό και Βιοχημικό Εργαστήριο, Γενικό Νοσοκομείο Αιγίου,
Αίγιο (Ελλάδα)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

-Filippopoulou C, Thome CC, Perdikari S, Ntini E, Simos G, Bohnsack KE, Chachami
G. Hypoxia-driven deSUMOylation of EXOSC10 promotes adaptive changes in the
transcriptome profile. *biorxiv*.2023. <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546038>

Εγκρίθηκε προς δημοσίευση στο Cellular and Molecular Life Sciences, Νοέμβριος
2023

-Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response
to Hypoxia: An Overview. *Cells*. 2020; 9(11):2359

<https://doi.org/10.3390/cells9112359>

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Προφορικές ανακοινώσεις:

-Filippopoulou C, Thome CC, Perdikari S, Ntini E, Simos G, Bohnsack KE, Chachami
G. Deciphering the role of sumoylation in EXOSC10 function and its impact on cancer
cells adaptation during hypoxia, Proteocure COST action, 2nd annual meeting 12-16
June, Zagreb, Croatia.

-Filippopoulou C, Thome CC, Perdikari S, Ntini E, Simos G, Bohnsack KE, Chachami G. Regulation of EXOSC10 SUMOylation impacts on RNA metabolism during hypoxia. EMBO Workshop SUMOylation: From discovery to translation 25 – 28 September 2023 | Póvoa de Varzim, Portugal

-Filippopoulou C, Thome CC, Perdikari S, Ntini E, Simos G, Bohnsack KE, Chachami G. Hypoxia-triggered deSUMOylation of EXOSC10 affects promotes adaptive changes in the transcriptome profile of hypoxic cells. 1st RNA workshop “Enhancer transcription and RNA processing” Monday 23.10.23, IMBB FORTH

-Filippopoulou C, Thome C, Bohnsack K, Simos G, Chachami G. «The function of EXOSC10 sumoylation and its impact on cancer cell adaptation to hypoxia», 72^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Πάτρα (2–4 Δεκεμβρίου 2022)

-Filippopoulou C, Thome C, Bohnsack K, Simos G, Chachami G. «Investigation of Sumoylation in the cellular adaptation to hypoxia: the role of the exoribonuclease EXOSC10», 1^ο Ιπποκράτειο Συνέδριο του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα (2-4 Σεπτεμβρίου 2022).

Αναρτημένες ανακοινώσεις:

-Filippopoulou C, Thome C, Bohnsack K, Simos G, Chachami G. «The role of Sumoylation in the regulation and function of the Exosome catalytic subunit Exosc10 under hypoxia». FORUM νέων επιστημόνων 2022 και Παγκόσμιο Συνέδριο των εταιρειών IUBMB-FEBS-PABMB, Λισαβόνα (6-14 Ιουλίου 2022).

-Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. «Sumoylation of Exosc10 under hypoxia and its implication in cellular response». 8^ο Πανελλήνιο FORUM νέων επιστημόνων και 71^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα (25–28 Νοεμβρίου 2021)

-Kanoura A, Giakountis A, **Filippopoulou C**, Stamatakis G, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G and Chachami G. «Interplay between hypoxia and sumoylation in transcriptional regulation: the role of TFAP2A», 7^ο Διεθνές Συνέδριο Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets της Aegean Conferences, Κως (20-25 Σεπτεμβρίου 2021)

-Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. «SUMOylation under hypoxia: the role of Exosc10». 7^ο Πανελλήνιο FORUM νέων επιστημόνων και 70^ο Πανελλήνιο συνέδριο

της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα (28 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου 2019)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- Συμμετοχή στο Volos Summer School of Human Genetics 2023 που διοργανώνεται από το Institute of Translational Genomics (ITG), Helmholtz Munich σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος (12–15 Ιουνίου 2023)
- Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης από την EEBMB στο 72ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Πάτρα (2-4 Δεκεμβρίου 2022)
- Χρηματοδοτούμενη συμμετοχή από την EEBMB με προφορική ανακοίνωση στο 72ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Πάτρα (2-4 Δεκεμβρίου 2022)
- Υποτροφία μετακίνησης από την FEBS για συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση στο Παγκόσμιο Συνέδριο Βιοχημείας των εταιριών IUBMB-FEBS-PABMB, Λισαβόνα (9-14 Ιουλίου 2022)
- YSF υποτροφία από την FEBS για συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση στο Παγκόσμιο FORUM νέων επιστημόνων των IUBMB-FEBS-PABMB, Λισαβόνα (6-9 Ιουλίου 2022)
- Χρηματοδοτούμενη συμμετοχή από την EEBMB με αναρτημένη ανακοίνωση στο 8ο Πανελλήνιο FORUM νέων επιστημόνων και στο 71ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα (25-28 Νοεμβρίου 2021)
- Χρηματοδοτούμενη συμμετοχή από την EEBMB με αναρτημένη ανακοίνωση στο 7ο Πανελλήνιο FORUM νέων επιστημόνων και στο 70ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα (28 Νοεμβρίου– 1 Δεκεμβρίου 2019)
- Χρηματοδοτούμενη συμμετοχή από το Ίδρυμα Ωνάση στις διαλέξεις Ωνάση στη Βιολογία και τη Χημεία για το 2019 με θέμα “Genome Editing”, ITE, Ηράκλειο, Κρήτη (8-12 Ιουλίου 2019)
- Συμμετοχή στο πρόγραμμα κινητικότητας Erasmus+ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στην Ισπανία. Πραγματοποίηση του 7ου εξαμήνου των προπτυχιακών σπουδών στο Facultad de Ciencias y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

- Αρωγό μελος της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB) από το 2014 έως τώρα

ΛΟΙΠΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Ξένες γλώσσες

Αγγλικά : ECPE (Certificate of Proficiency in English), University of Michigan

Ισπανικά: Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας Ισπανικής γλώσσας στο επίπεδο Γ1

Γαλλικά : Niveau B1 DELF

Ψηφιακές δεξιότητες

Βασική γνώση προγραμματισμού: R/Rstudio, Python, UNIX

Άριστος χρήστης προγραμμάτων: Microsoft Office, Adobe photoshop, Graph Pad, ImageJ

«Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης στη ρύθμιση και λειτουργία της πρωτεΐνης EXOSC10 κατά την υποξία»

ΧΡΥΣΑ ΦΙΛΙΠΠΟΠΟΥΛΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γεωργία Χαχάμη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **Επιβλέπουσα**

2. Ηλίας Μυλωνής, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σουμοϋλίωση είναι μια δυναμική μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία πραγματοποιείται ομοιοπολική σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) στις πρωτεΐνες-στόχους. Μελέτες των τελευταίων ετών δείχνουν πως η σουμοϋλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή και επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες στρες όπως η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία). Ειδικότερα, η σουμοϋλίωση επηρεάζει τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστές του μονοπατιού της υποξίας HIFs (Hypoxia Inducible Factors) άμεσα (μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης) ή έμμεσα επηρεάζοντας τη δράση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ρύθμιση τους. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και φασματοσκοπίας μάζας έδειξαν πως η υποξία (1% O₂) προκαλεί την αποσουμοϋλίωση της πρωτεΐνης EXOSC10. Η EXOSC10 είναι μια καταλυτική υπομονάδα του πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου του RNA εξωσώματος, με δράση στην επεξεργασία και την αποικοδόμηση διαφόρων RNA. Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στη μελέτη της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 όσον αφορά πρώτον στην πλήρη αποσαφήνιση της επίδρασης της υποξίας στον μηχανισμό σουμοϋλίωσης της και δεύτερον στη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της σουμοϋλίωσης στην λειτουργία της EXOSC10 και της σημασίας της για την κυτταρική απόκριση στην υποξία. Συγκεκριμένα,δείχθηκε πως η σουμοϋλίωση της EXOSC10 μειώνεται αισθητά από τις πρώτες κιόλας ώρες επώασης στην υποξία με έναν μηχανισμό στον οποίο δεν εμπλέκονται άμεσα οι HIF. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως στο ίδιο χρονικό πλαίσιο παρατηρήθηκε μετακίνηση της EXOSC10 από τον πυρηνίσκο προς το πυρηνόπλασμα, υποδεικνύοντας πως οι δυο διαδικασίες σχετίζονται. Πειράματα αποσιώπησης γνωστών ενζύμων του μηχανισμού σουμοϋλίωσης αποκάλυψαν πως η USP36 είναι απαραίτητη για την σουμοϋλίωση της EXOSC10, ενώ η SENP3 συμμετέχει στην απομάκρυνση της SUMO από αυτή. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται σε κοινό σύμπλοκο στον πυρηνίσκο. Βρέθηκε πως η υποξία οδηγεί στην μετακίνηση της EXOSC10 στο πυρηνόπλασμα και την επακόλουθη κατάργηση της αλληλεπίδρασης της με την USP36, γεγονός που εξηγεί την παρατηρούμενη αποσουμοϋλίωση. Όσον αφορά στο δεύτερο ερευνητικό ερώτημα σχετικά με την διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της σουμοϋλίωσης στην λειτουργία της EXOSC10 στο πλαίσιο της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, με πειράματα αλληλούχησης του ολικού RNA καρκινικών κυττάρων HeLa σε συνθήκες νορμοξίας

και υποξίας ή σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την αγρίου τύπου EXOSC10 ή την μη σουμοϋλιωμένη μορφή της (K583R), έδειξαν την διαφορετική ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης μιας ομάδας RNA που αποτελούν και στόχους της υποξίας. Συνολικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποκαλύπτει την δυναμική ρύθμιση της σουμοϋλίωσης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της εξωριβονουκλεάσης EXOSC10 από την υποξία, διεργασίες που οδηγούν στη ρύθμιση του μηχανισμού αποικοδόμησης mRNA στόχων της υποξίας, διευκολύνοντας την προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες οξυγόνου.

SUMMARY

SUMOylation is a dynamic post-translational modification referring to the covalent attachment of SUMO proteins (Small Ubiquitin-like Modifier) to target proteins. Recent studies have shown that SUMOylation plays an important role in cellular adaptation and survival under stress conditions such as low oxygen concentration (hypoxia). Specifically, SUMOylation affects the master regulators of the hypoxic response pathway, the transcription factors HIFs (Hypoxia Inducible Factors) directly (via covalent modification) or indirectly, by affecting the function of proteins associated with the hypoxic cascade. Immunoprecipitation and mass spectrometry experiments showed that hypoxia (1% O₂) causes the de-SUMOylation of the protein EXOSC10. EXOSC10 is a catalytic subunit of the multiprotein RNA exosome complex, with roles in processing and degradation of various RNAs. This doctoral thesis focused on the study of EXOSC10 SUMOylation in two separate axons: the elucidation of the influence of hypoxia on EXOSC10 SUMOylation mechanism and, the investigation of the biological role of SUMOylation in the cellular function of EXOSC10 and its significance for the cellular response to hypoxia. Specifically, it was shown that EXOSC10 SUMOylation is significantly reduced within the first hours of incubation in hypoxia through a mechanism that does not directly involve the HIFs. Interestingly, during the same timeframe, there was a statistically significant relocation of EXOSC10 from the nucleolus to the nucleoplasm, indicating that the two processes are related. Silencing experiments of known enzymes of the SUMOylation machinery revealed that USP36 is necessary for the SUMOylation of EXOSC10, while SENP3 promotes the deconjugation of SUMO from it. These three proteins are found in a common complex in the nucleolus. It was shown that hypoxia leads to the relocation of EXOSC10 to the nucleoplasm and the subsequent inhibition of its interaction with USP36, explaining the observed de-SUMOylation of EXOSC10 during hypoxia. On the second axon regarding the biological role of SUMOylation in the cellular function of EXOSC10 in the context of the cellular response to hypoxia, experiments of total RNA sequencing of HeLa cells grown in normoxic and hypoxic conditions or in cell lines expressing the SUMO-deficient form of EXOSC10 over the wild type EXOSC10, showed the differential regulation of the expression levels of a group of RNAs, that are also hypoxia

targets. Overall, this doctoral thesis reveals the dynamic regulation of the SUMOylation and the intracellular localization of the exoribonuclease EXOSC10 induced by hypoxia, which in turn regulate the RNA degradation mechanism, facilitating the adaptation of cells to the present oxygen levels.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1. ΣΟΥΜΟΪΛΙΩΣΗ.....	22
1.1. Οι πρωτεΐνες SUMO	23
1.2 Μηχανισμός σύζευξης των πρωτεϊνών SUMO στις πρωτεΐνες στόχους.....	25
1.2.1 Ωρίμανση των πρωτεϊνών SUMO	26
1.2.2 Ενεργοποίηση των SUMO: ένζυμο E1	26
1.2.3 Σύζευξη των SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους: ένζυμα E2 και E3	27
1.2.4 Αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών: Ισοπεπτιδάσες SENP	30
1.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην φυσιολογία των οργανισμών	32
1.3.1 Η σημασία της σουμοϋλίωσης	32
1.3.2 Άμεσοι στόχοι σουμοϋλίωσης.....	33
1.4 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στον καρκίνο	34
1.5 Σουμοϋλίωση και απόκριση σε στρες.....	37
2. ΥΠΟΞΙΑ.....	38
2.1 Κυτταρική απόκριση στην υποξία μέσω της δράσης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	39
2.1.1 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	39
2.1.2 Γονίδια στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων HIF και η σημασία τους στην υγεία και στον καρκίνο	41
2.2 Μετα-μεταφραστική ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία των μεταγραφικών παραγόντων HIF	44
2.2.1 Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF από το οξυγόνο	44
2.2.2 Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF και παραγόντων του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία από τη σουμοϋλίωση.....	46
2.3 Ρύθμιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης από την υποξία.....	48
3. Η ΕΞΩΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ EXOSOME COMPONENT 10 (EXOSC10).....	50
3.1 Το RNA εξωσώμα, οι συμπαράγοντες και τα RNA-στόχοι του	50
3.2 Λειτουργικές περιοχές της EXOSC10.....	54
3.3 Οι κυτταρικές λειτουργίες της EXOSC10	54
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	57
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	58
1. ΥΛΙΚΑ.....	58
1.1 Πλασμίδια.....	58

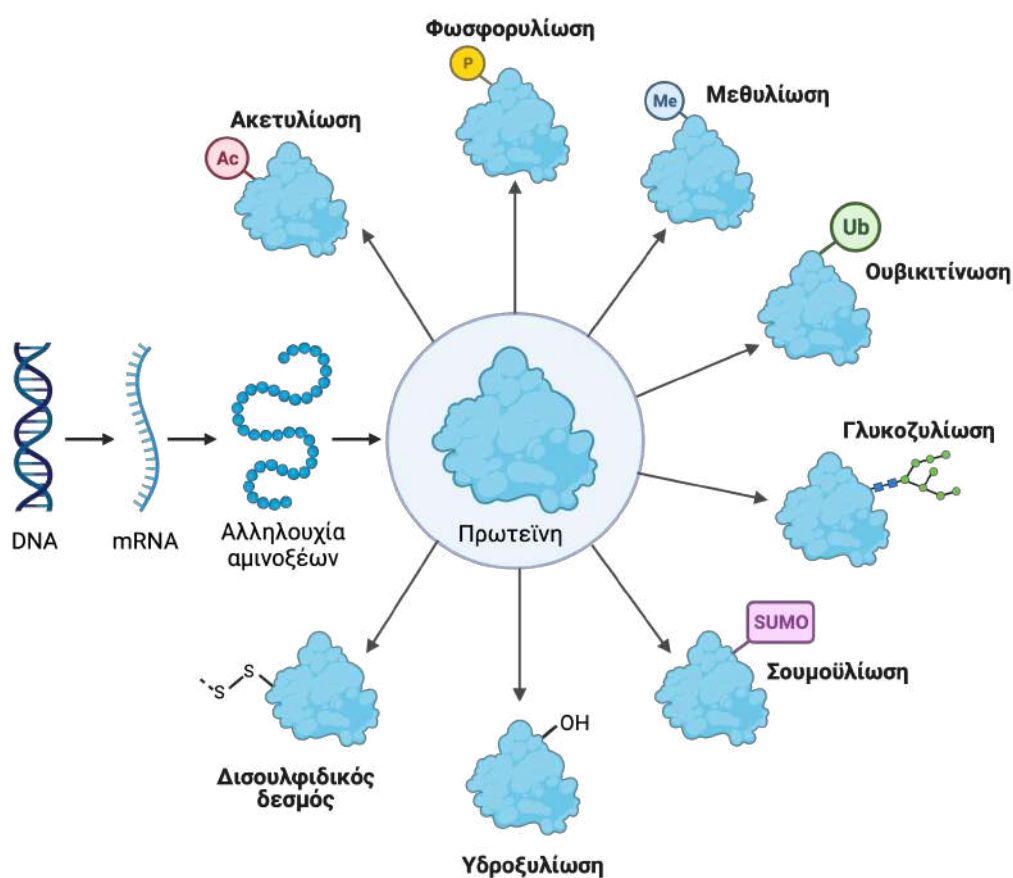
1.2 Κυτταρικές σειρές	61
1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	62
1.4 Βακτηριακά στελέχη	63
1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων.....	64
1.6 Αντιδραστήρια	65
1.7 Χημικά	68
1.8 Στήλες χρωματογραφίας.....	68
1.9 Εκκινητές και Small Interference RNA (siRNA).....	68
1.10 Αντισώματα	70
2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	73
2.1 Τεχνικές Μοριακής βιολογίας.....	73
2.1.1 Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	73
2.1.2 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης	74
2.1.3 Απομόνωση και καθαρισμός των τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης....	76
2.1.4 Πέψεις τμημάτων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	76
2.1.5 Ενσωμάτωση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς - Αντίδραση λιγάσης.....	79
2.1.6 Πολλαπλασιασμός πλασμιδίων σε βακτηριακές καλλιέργειες.....	81
2.1.7 Απομόνωση πλασμιδίων από βακτηριακές καλλιέργειες	83
2.2 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση χμαιοικών GST πρωτεϊνών	84
2.2.1 Επαγωγή της έκφρασης χμαιοικών GST πρωτεϊνών σε κύτταρα BL21-RIL	84
2.2.2 Καθαρισμός των χμαιοικών GST πρωτεϊνών με χρωματογραφία αгарιστείας	86
2.3 Καλλιέργεια και χειρισμός ευκαρυωτικών κυττάρων.....	88
2.3.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων μέσω τρυψινοποίησης	88
2.3.2 Μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων	89
2.3.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια.....	90
2.3.4 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με siRNA – Αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών.....	92
2.3.5 Επίδραση ουσιών ή υποξίας σε ευκαρυωτικά κύτταρα	94
2.4 Μέθοδοι που αφορούν τη μελέτη πρωτεϊνών.....	94
2.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	94
2.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	95
2.4.3 Ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες	99

2.4.4 Χρώση πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου με Coomassie brilliant blue	100
2.4.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	100
2.4.6 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό	101
2.4.7 In vitro σουμοϋλίωση.....	102
2.5 Μέθοδοι που αφορούν στην μελέτη RNA.....	104
2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.....	104
2.5.2 Σύνθεση cDNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	105
2.5.3 Αλληλούχηση ολικού RNA	106
2.6 Μέθοδοι μελέτης βιολογικών διεργασιών στις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In	106
2.6.1 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	107
2.6.2 Μέτρηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7	107
2.6.3 Δοκιμασία επούλωσης τραύματος	108
2.7 Προγράμματα βιοπληροφορικής, στατιστικής ανάλυσης και οπτικοποίησης.	109
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	110
1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΟΥΜΟΪΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ EXOSC10 ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ	110
1.1 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας και της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων HIF στη σουμοϋλίωση και στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10	110
1.1.1 Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στην σουμοϋλίωση της ενδογενούς EXOSC10	110
1.1.2 Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στην σουμοϋλίωση της υπερεκφρασμένη HA-EXOSC10.....	115
1.1.3 Διερεύνηση του ρόλου των μεταγραφικών παραγόντων HIF στην αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 κατά την υποξία.....	117
1.1.4 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10 και πρωτεϊνών του πυρηνίσκου.....	123
1.2 Ταυτοποίηση των ενζύμων που συμμετέχουν στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας σε αυτά	128
1.2.1 Ταυτοποίηση των SUMO ισοπεπτιδασών που συμμετέχουν στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης της EXOSC10	129
1.2.2 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της SENP3	136

1.2.3 Ταυτοποίηση ενζύμων που ενισχύουν την σουμοϋλίωση της EXOSC10 ..	147
1.2.4 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της USP36	149
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΣΟΥΜΟΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ EXOSC10 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ	153
2.1 Εύρεση της κύριας θέσης σουμοϋλίωσης της EXOSC10	154
2.2 Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών HeLa Flp-In.....	161
2.3 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In.....	164
2.3.1 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In.....	164
2.3.2 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In	166
2.3.3 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In	168
2.4 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην έκφραση των RNA	171
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	181

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι ομοιοπολικής φύσης τροποποιήσεις που συμβαίνουν στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών μετά τη σύνθεσή τους. Πλέον, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 600 διαφορετικοί τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών, επηρεάζοντας τη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών (1). Μερικές από αυτές, συμπεριλαμβανομένων των πιο καλά μελετημένων όπως είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση και η ουβικιτίνωση, συνοψίζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση με τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

Οι πρωτεΐνες μπορεί να υφίστανται πάνω από μία μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προκειμένου να ρυθμιστούν ενώ, μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε αμινοξύ μπορεί να υφίσταται τουλάχιστον τρεις διαφορετικές τροποποιήσεις, με τα αμινοξέα λυσίνη, κυστεΐνη και σερίνη να είναι οι πιο συχνόι στόχοι (2).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στοχεύουν μία πληθώρα πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων ενζύμων, μεταγραφικών παραγόντων, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και ιστονών, επηρεάζοντας διάφορες πτυχές της λειτουργίας τους, όπως είναι η ενεργότητα, η σταθερότητα, οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός (3). Το αποτέλεσμα της ρύθμισης αυτής σε επίπεδο κυττάρου, επηρεάζει όλες τις βασικές βιολογικές διαδικασίες όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, η μεταγωγή σήματος, ο κυτταρικός κύκλος και η επιδιόρθωση του DNA. Η μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης τα τελευταία χρόνια, ενώ οι τροποποιήσεις αυτές είναι εξίσου σημαντικές και μελετώνται και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (4, 5).

Μια από τις σημαντικότερες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα και αποτέλεσε και το αντικείμενο έρευνας της συγκεκριμένης διατριβής είναι η σουμοϋλίωση.

1. Σουμοϋλίωση

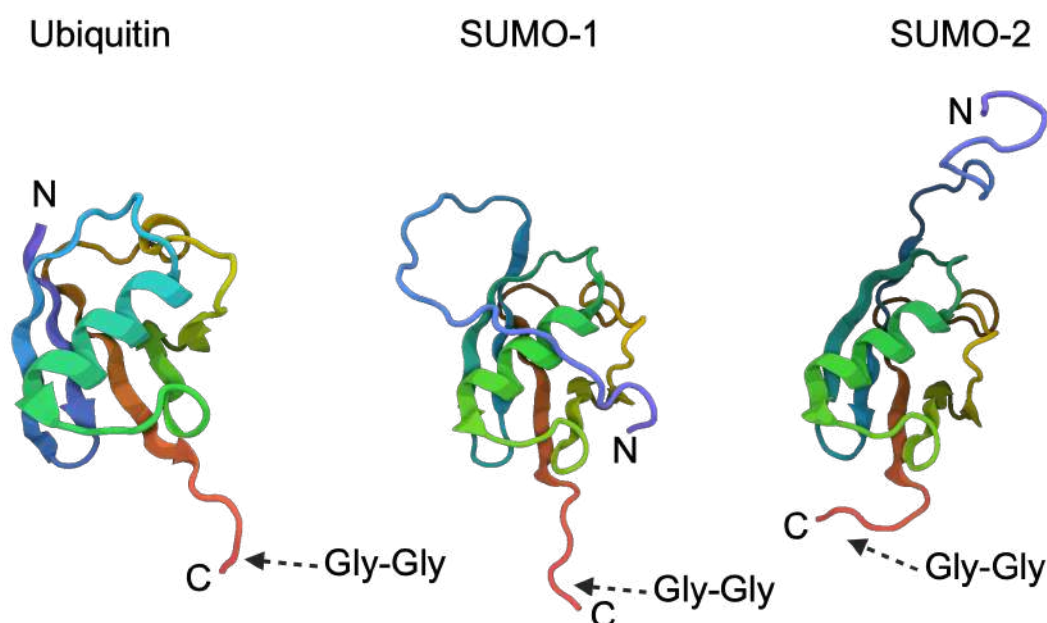
Η ουβικιτίνωση είναι μία σημαντική, ευρέως γνωστή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία ανακαλύφθηκε πριν περίπου 50 χρόνια και αφορά την ομοιοπολική σύνδεση μίας μικρής πρωτεΐνης 76 αμινοξέων, της ουβικιτίνης, σε κατάλοιπα κυρίως λυσίνης άλλων πρωτεϊνών. Η σύνδεση αυτή βρέθηκε ότι καταλύεται μέσω ενός μηχανισμού σύζευξης που στηρίζεται στην δράση εξειδικευμένων ενζύμων που ονομάστηκαν E1, E2 και E3. Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί μία νέα κατηγορία πρωτεϊνών που σχετίζονται εξελικτικά με την ουβικιτίνη, καθώς παρουσιάζουν όμοια δομή και αντίστοιχο μηχανισμό σύζευξης. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν Ubiquitin-like proteins (UbIs) και κάποιες από αυτές είναι οι SUMO, NEDD8, ATG8, UFM1, FAT10 και ISG15 (6).

Όσον αφορά την πρωτεΐνη SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier), η ομοιοπολική σύνδεση της σε κατάλοιπα λυσίνης άλλων πρωτεϊνών ορίζεται ως **σουμοϋλίωση** (7, 8). Αξίζει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα της σουμοϋλίωσης ποικίλλει, επηρεάζοντας διαφορετικά την λειτουργία της κάθε πρωτεΐνης-στόχου, σε αντίθεση με την ουβικιτίνωση, κύριος ρόλος της οποίας είναι η σηματοδότηση των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση (9). Ο πρώτος στόχος σουμοϋλίωσης που ανακαλύφθηκε ήταν η ενεργοποιητική πρωτεΐνη της Ran GTPάσης (RanGAP1) και

μάλιστα βρέθηκε ότι η τροποποίηση αυτή παίζει καθοριστικό ρόλο για την λειτουργία της, καθώς προωθεί τον εντοπισμό της στους πυρηνικούς πόρους και την αλληλεπίδραση της με μία νουκλεοπορίνη, την RanBP2 (10, 11).

1.1. Οι πρωτεΐνες SUMO

Οι πρωτεΐνες SUMO είναι μικρές πρωτεΐνες μεγέθους περίπου ~11 kDa και όπως αναφέρθηκε, αποτελούν μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών που ομοιάζουν στην ουβικιτίνη (UbIs) (12). Οι δομές της ουβικιτίνης και των SUMO όπως προκύπτουν από την βάση δεδομένων PDB απεικονίζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Αναπαράσταση των τρισδιάστατων δομών της ουβικιτίνης, της SUMO-1 και της SUMO-2, όπου σημειώνεται το μοτίβο Gly-Gly στο καρβοξύ-τελικό τους άκρο (C), ενώ με N σημειώνεται το αμίνο-τελικό άκρο. Η δομή της ουβικιτίνης (1UBQ) χαρακτηρίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ενώ των SUMO-1 (2N1V) και SUMO-2 (2N1W) με solution NMR και ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων PDB. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

Όπως είναι κατανοητό και από τον όρο UbIs, οι SUMO ομοιάζουν δομικά και λειτουργικά με την ουβικιτίνη. Διαθέτουν την χαρακτηριστική δομή της, β -grasp fold, η οποία αποτελείται από ένα πενταμερές β -πτυχωτό φύλλο γύρω από μία α -έλικα (6). Επίσης, σημαντικό ρόλο έχει το καρβοξύ-τελικό άκρο των «ώριμων» SUMO, το οποίο ομοίως με την ουβικιτίνη περιέχει δύο κατάλοιπα γλυκίνης και όπως θα αναλυθεί

παρακάτω, είναι απαραίτητο για την σύζευξη των UbIs με τις πρωτεΐνες στόχους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, ένα σημείο στο οποίο διαφέρουν οι SUMO σε σχέση με την ουβικιτίνη, είναι το αμινο-τελικό άκρο τους. Πρόκειται για μία προέκταση περίπου 20 αμινοξέων, η οποία συμβάλει στην δημιουργία αλυσίδων SUMO (13).

Γονίδια που κωδικοποιούν τις SUMO έχουν ταυτοποιηθεί σε όλο το εύρος των ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτόζωων (14), των μεταζώων (15-17), των φυτών (18-20) και των μυκήτων (21). Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί 5 γονίδια που κωδικοποιούν για τις 5 ισομορφές των SUMO: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, SUMO-4, SUMO-5 (17, 22). Τα 5 αυτά διακριτά γονίδια πιστεύεται ότι προέκυψαν από διαδοχικούς διπλασιασμούς ενός αρχικού γονιδίου. Από τον πρώτο διπλασιασμό προέκυψαν τα αρχικά γονίδια SUMO1/5 και SUMO2/3/4, από αυτά στη συνέχεια προέκυψαν τα γονίδια SUMO1 και SUMO5 ή τα SUMO2/3 και SUMO4 αντίστοιχα, και τέλος από το γονίδιο SUMO2/3 προέκυψαν τα δύο διακριτά γονίδια SUMO2 και SUMO3. Όσον αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων των πρωτεϊνών που προκύπτουν, οι SUMO2 και SUMO3 παρουσιάζουν σχεδόν 97% ομολογία για αυτό το λόγο πολύ συχνά παρουσιάζονται ως SUMO2/3 (23). Από την άλλη, η ισομορφή SUMO1 παρουσιάζει μόνο 45% ομολογία με τις SUMO2/3, υποδηλώνοντας τον πιθανόν διακριτό τους ρόλο στην ρύθμιση των πρωτεϊνών-στόχων (24).

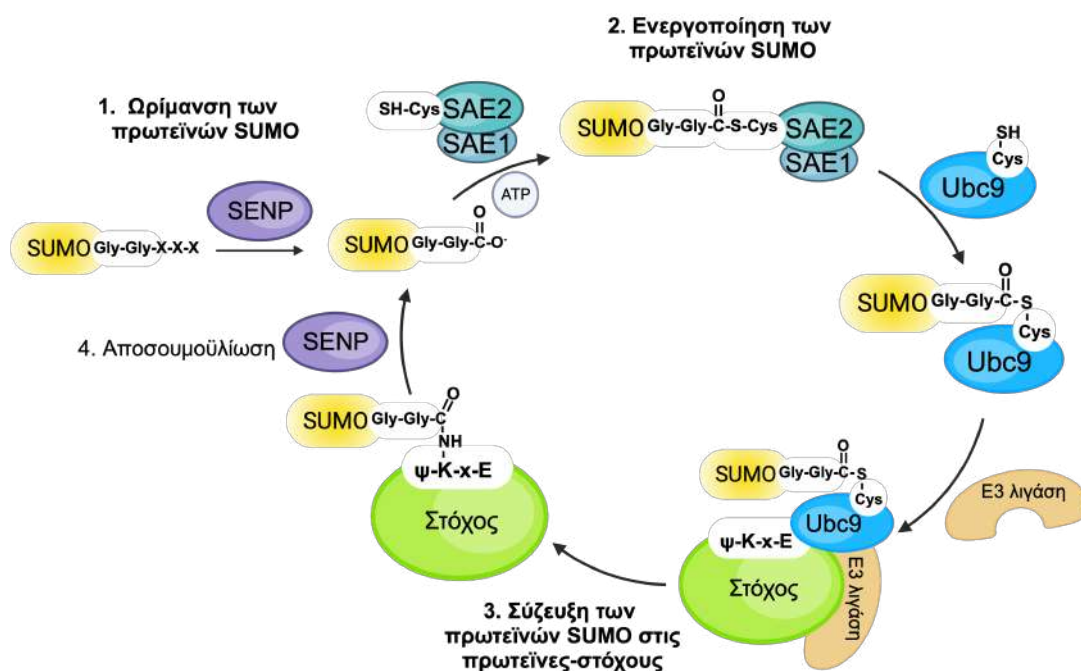
Οι SUMO-1 και SUMO-2/3 εκφράζονται καθολικά σε όλους τους ιστούς κατά τη διάρκεια όλων των αναπτυξιακών σταδίων, με την SUMO-1 να παρουσιάζει πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με αυτά των SUMO-2/3 (25). Οι SUMO-4 και SUMO-5 είναι λιγότερο μελετημένες ισομορφές και εκφράζονται ιστοειδικά. Η SUMO-4 εντοπίζεται κυρίως στα νεφρά, τους λεμφαδένες, τον σπλήνα και το πλακούντα (26, 27), ενώ η SUMO-5 στα ερυθροκύτταρα και τους όρχεις (28). Ιδιαίτερα, στη περίπτωση της SUMO-4 πιστεύεται ότι βρίσκεται σε ελεύθερη μη-συζευγμένη μορφή, λόγω της παρουσίας ενός καταλοίπου προλίνης στην θέση 90 και την αδυναμία έτσι της ωρίμανσης της (29). Η ύπαρξη της πέμπτης ισομορφής προτάθηκε πολύ πρόσφατα και η λειτουργία της ισομορφής αυτής δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως (28).

Οι SUMO έπραν της έκφρασης διαφέρουν και σε άλλα σημεία, όπως ως προς την επιλογή των πρωτεϊνών-στόχων που θα συζευχθούν (22, 30-32), την δημιουργία (SUMO-2/3) ή όχι (SUMO-1) αλυσίδων SUMO (33) και την στόχευση τους από εξειδικευμένες για τις SUMO, ισοπεπτιδάσες. Ένα επιπλέον σημείο διάκρισης είναι ο

ενδοκυτταρικούς τους εντοπισμούς. Οι SUMO-2/3 ανιχνεύονται κυρίως στο πυρηνόπλασμα και τα πυρηνικά σωμάτια, ενώ η SUMO-1 εστιάζεται πέραν του πυρηνοπλάσματος, στην πυρηνική μεμβράνη και τους πυρηνίσκους (34, 35).

1.2 Μηχανισμός σύζευξης των πρωτεϊνών SUMO στις πρωτεΐνες στόχους

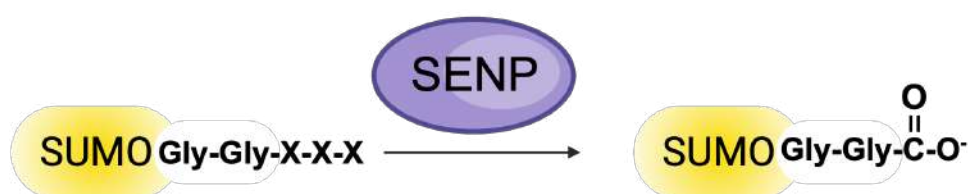
Η σύζευξη των SUMO διαμεσολαβείται μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος ομοιάζει τον μηχανισμό ουβικιτίνωσης και περιλαμβάνει την δράση εξειδικευμένων για τις SUMO πρωτεΐνες E1, E2 και E3 ενζύμων. Παρακάτω αναλύονται λεπτομερώς όλα τα μέλη του μηχανισμού σουμοϋλίωσης, καθώς και το κάθε στάδιο του μηχανισμού που διεκπεραιώνουν, τα οποία συνοψίζονται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης/αποσουμοϋλίωσης. Πρώτο στάδιο του μηχανισμού είναι η ωρίμανση των πρωτεϊνών SUMO μέσω της δράσης των ισοπεπτιδασών SENP και η αποκάλυψη του μοτίβου Gly-Gly. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των SUMO από τα ένζυμα E1 SAE1/SAE2 και E2 Ubc9 και η τελική σύζευξη σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου μέσω της δράσης μίας E3 λιγάσης. Η σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών αντιστρέφεται με την δράση των ισοπεπτιδασών SENP, οι οποίες απομακρύνουν τη συζευγμένη SUMO. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

1.2.1 Ωρίμανση των πρωτεϊνών SUMO

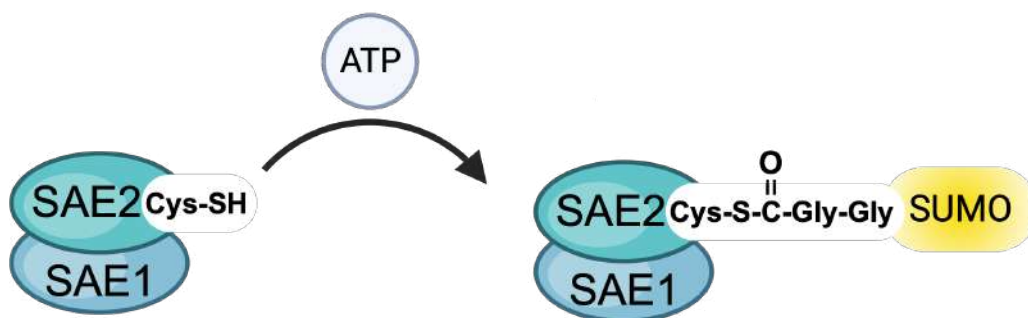
Οι πρωτεΐνες SUMO εκφράζονται ως μία πρόιμη μορφή, η οποία προκειμένου να καταστεί λειτουργική απαιτεί ένα πρώτο βήμα «ωρίμανσης». Το βήμα αυτό διεκπεραιώνεται από ειδικές ισοπεπτιδάσες (κυρίως μέλη της οικογένειας SENP) οι οποίες αναλύονται στη συνέχεια (36). Οι SENP μέσω της πρωτεολυτικής τους δράσης, «αποκαλύπτουν» τα δύο κατάλοιπα γλυκίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο των SUMO, καθιστώντας τες ικανές να συζευχθούν με τα κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών-στόχων (37) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της ωρίμανσης των πρωτεϊνών SUMO από τις ισοπεπτιδάσες SENP, οι οποίες απομακρύνουν τα τελικά κατάλοιπα αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο των SUMO, αποκαλύπτοντας το απαραίτητο για τη σύζευξη τους με τις πρωτεΐνες-στόχους, μοτίβο Gly-Gly. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

1.2.2 Ενεργοποίηση των SUMO: ένζυμο E1

Πρωταρχικό στάδιο του μηχανισμού σουμοϋλίωσης είναι η ενεργοποίηση των «ώριμων» πλέον SUMO από ένα ενεργοποιητικό ένζυμο E1 (Εικόνα 5). Στον άνθρωπο, μόνο ένα μέχρι στιγμής τέτοιο ένζυμο έχει ταυτοποιηθεί και αφορά ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, τις SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1, ή Aos1) και SAE2 (SUMO-activating enzyme subunit 2, ή Uba2) (38). Κατά το στάδιο της ενεργοποίησης, μεταξύ του τελικού καταλοίπου γλυκίνης στην καρβοξυ-τελική επικράτεια της SUMO και της κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο της υπομονάδας SAE2 του ενζύμου E1 δημιουργείται ένας θειοεστερικός δεσμός, μέσω της ενέργειας που προκύπτει από την υδρόλυση του ATP. Στην συνέχεια, σχηματίζεται ένας νέος θειοεστερικός δεσμός μεταξύ της ενεργοποιημένης SUMO και του υπεύθυνου για την τελική σύζευξη ενζύμου E2 (39, 40).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών SUMO μέσω της σύνδεσης τους με το E1 ένζυμο SAE1/SAE2. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

1.2.3 Σύζευξη των SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους: ένζυμο E2 και E3

Ένζυμο E2

Ομοίως με το E1, το ένζυμο E2 που εξειδικεύεται στις SUMO και έχει μέχρι στιγμής ανακαλυφθεί είναι μοναδικό και ονομάζεται ubiquitin-conjugating enzyme 9 (Ubc9). Το Ubc9 παίζει καθοριστικό ρόλο κατά τη τελική σύζευξη των SUMO και διαφέρει λειτουργικά από τα αντίστοιχα ένζυμα E2 του μηχανισμού ουβικιτίνωσης. Πέραν της μεταφοράς της ενεργοποιημένης SUMO, το Ubc9 έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να προσδένεται απευθείας στην πρωτεΐνη-στόχο, χωρίς να είναι απαραίτητη η διαμεσολάβηση άλλου ενζύμου, ώστε να καταλύει την αντίδραση σύζευξης (41). Η πρόσδεση αυτή γίνεται μέσω της αναγνώρισης μίας τυπικής αλληλουχίας αμινοξέων ψKxD/E που συναντάται στη πλειοψηφία των πρωτεϊνών που σουμοϋλιώνονται (42). Το ψ αντιστοιχεί σε ένα μεγάλο υδρόφοβο κατάλοιπο αμινοξέος, το K είναι η κύρια λυσίνη στόχος, ακολουθούμενη από ένα οποιοδήποτε αμινοξύ και από ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού ή γλουταμινικού οξέος (43). Μία ιδιαιτερότητα των SUMO-2/3 είναι ότι περιέχουν την τυπική αυτή αλληλουχία, επιτρέποντας την σουμοϋλίωσή τους και τον σχηματισμό αλυσίδων SUMO (42). Όμως, παρά την ισχύ του μοτίβου αυτού, αξίζει να σημειωθεί ότι η σύζευξη των SUMO μπορεί να γίνει και σε λυσίνες που βρίσκονται σε «άτυπες» θέσεις εκτός της τυπικής αλληλουχίας (44).

Ένζυμο E3

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η επίτευξη της τελικής σύζευξης των SUMO υποβοηθάται από ειδικές για τις SUMO E3 λιγάσες. Οι E3 λιγάσες συνδέονται άμεσα τόσο με το σύμπλοκο Ubc9-SUMO όσο και με την πρωτεΐνη στόχο, εξασφαλίζοντας

τον ιδανικό προσανατολισμό και την κατάλυση της μεταφοράς της SUMO στο κατάλληλο κατάλοιπο λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου από την Ubc9 (45, 46).

Συγκριτικά με την ουβικιτίνωση, ο αριθμός των E3 λιγασών που έχουν χαρακτηριστεί πλήρως για τη δράση τους στη σουμοϋλίωση είναι πολύ μικρότερος (47). Την τελευταία δεκαετία, η έρευνα στο πεδίο της σουμοϋλίωσης εστιάζεται εντατικά στην ταυτοποίηση νέων E3 λιγασών. Οι E3 λιγάσες που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 5 κατηγορίες, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

- E3 λιγάσες που διαθέτουν τις περιοχές Siz/PIAS RING και RING

Οι περιοχές Siz/PIAS RING και RING είναι υπεύθυνες για την άμεση σύνδεση των E3 λιγασών με το ένζυμο E2 (48). Στον άνθρωπο, η πιο καλά μελετημένη οικογένεια E3 λιγασών με περιοχή Siz/PIAS RING είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας PIAS. Υπάρχουν 4 ισομορφές των PIAS: PIAS-1, PIAS-2, PIAS-3 και PIAS-4. Η δράση τους έχει συσχετιστεί κυρίως με την ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, εκ των οποίων οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT (49, 50), NF-κB (51) c-Jun και p53 (52), πυρηνικών υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας των ανδρογόνων (AR) (53) και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA (54, 55). Πέραν των PIAS, σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν και μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών TRIM, οι οποίες διαθέτουν την περιοχή RING. Η οικογένεια των TRIM περιλαμβάνει πάνω από 100 πρωτεΐνες, με ορισμένες εξ αυτών (TRIM11, TRIM19, TRIM22, TRIM27, TRIM28, TRIM33, TRIM12) να έχουν χαρακτηριστεί για την δράση τους ως SUMO E3 λιγάσες (56-58). Πέραν της περιοχής RING, διαθέτουν και μία ή δύο περιοχές B-box, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ειδική σύνδεση των TRIM με τις πρωτεΐνες-στόχους τους. Κάποια από τα πιο χαρακτηριστικά υποστρώματα των SUMO E3 λιγασών της οικογένειας TRIM είναι η πρωτεΐνη p53 και ο αρνητικός ρυθμιστής της Mdm2 (56), ο αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β, SnoN και ο μεταγραφικός παράγοντας IRF7 (57, 58).

- E3 λιγάσες με μοτίβο SIM

Οι περιοχές Siz/PIAS RING και RING είναι καθοριστικές για την σύνδεση των E3 λιγασών με το ένζυμο Ubc9, υπάρχουν όμως και λιγάσες οι οποίες δεν διαθέτουν την περιοχή αυτή. Πέραν της ομοιοπολικής σύνδεσης με τα υποστρώματά τους, οι SUMO μπορούν να αλληλεπιδράσουν μη ομοιοπολικά με πρωτεΐνες που διαθέτουν τις

αλληλουχίες SIM (SUMO-interacting motif) (59). Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούνται συνήθως από υδρόφοβα αμινοξέα με αλειφατικές, μη πολικές αλυσίδες (Ψ: βαλίνη, ισολευκίνη ή λευκίνη) ΨΨΨΨ, ΨΨxΨ ή ΨxΨΨ, όπου x είναι τα αμινοξέα ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, σερίνη ή θρεονίνη. Ορισμένες E3 λιγάσες διαθέτουν αλληλουχίες SIM, οι οποίες αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο Ubc9-SUMO και βοηθούν έτσι στην πρόσδεσή τους. Οι πιο καλά μελετημένες από αυτές είναι η νουκλεοπορίνη RanBP2 (60), πρωτεΐνες της οικογένειας polycomb όπως η Pc2 και Pc4 (61), η πρωτεΐνη-σκαλωσιά SLX4 (62) και ο μεταγραφικός ρυθμιστής ZNF451(63).

- E3 λιγάσες με διπλό ρόλο – E3 λιγάσες ουβικιτίνης και SUMO

Μία επιμέρους κατηγορία E3 λιγασών αφορά ένζυμα τα οποία διαθέτουν διακριτές δομικές περιοχές που τους επιτρέπουν να καταλύουν τόσο την σύνδεση της ουβικιτίνης όσο και της SUMO στα υποστρώματά τους. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής είναι η λιγάση Topors η οποία στοχεύει (ουβικιτίνωση και σουμοϋλίωση) την πρωτεΐνη p53 (64) και η TRAF7 η οποία στοχεύει τον παράγοντα c-Myb (65).

- Άλλες E3 λιγάσες

Άλλες πρωτεΐνες που έχουν προταθεί ως E3 λιγάσες και δεν αντιστοιχούν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες είναι η HDAC-4, μέλος της οικογένειας των απακετυλασών των ιστονών (histone deacetylase, HDAC) η οποία καταλύει τη σουμοϋλίωση του παράγοντα IκBa (66), καθώς και οι πρωτεΐνες USP36 και p14^{ARF}. Συγκεκριμένα, η USP36 έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς για την δράση της ως από-ουβικιτινάση (67), ενώ πρόσφατα δείχθηκε και η ικανότητα της να προωθεί την σουμοϋλίωση πρωτεϊνών των πυρηνίσκων, που εμπλέκονται στην επεξεργασία των ριβοσωμικών RNA και την μετάφραση (68). Από την άλλη, ο ρόλος της p14^{ARF} στη σουμοϋλίωση είναι πολύ λίγο μελετημένος και δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμα πλήρως η άμεση δράση της ως E3 λιγάση. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι αλληλεπιδρά άμεσα με το ένζυμο Ubc9 και προωθεί τη σουμοϋλίωση πυρηνικών πρωτεϊνών (69, 70). Περαιτέρω βιοχημικές και δομικές μελέτες θα αποδείξουν την ενζυμική λειτουργία των παραπάνω πρωτεϊνών ως E3 λιγάσες.

1.2.4 Αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών: Ισοπεπτιδάσες SENP

Η σουμοϋλίωση είναι μία αντιστρεπτή τροποποίηση και η απομάκρυνση των SUMO από τα υποστρώματά τους διαμεσολαβείται από τα ίδια ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την «ωρίμανση» των SUMO, τις ισοπεπτιδάσες της οικογένειας των SENP (71, 72). Οι SENP είναι πρωτεάσες κυστεΐνης και διαθέτουν στο ενεργό τους κέντρο την καταλυτική τριάδα αμινοξέων κυστεΐνη – ιστιδίνη – ασπαραγινικό, υπεύθυνη για την διάσπαση του ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ της γλυκίνης των SUMO και της λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου (73, 74).

Στον άνθρωπο, έχουν βρεθεί 7 ένζυμα στην οικογένεια των SENP: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6, SENP7 και SENP8. Η SENP8 δεν θα αναλυθεί περαιτέρω καθώς παρόλη την δομική ομοιότητα με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας δεν συμμετέχει στην αποσουμοϋλίωση πρωτεϊνών. Οι SENP διαφέρουν μεταξύ τους σε διάφορα σημεία (συνοψίζονται στον Πίνακα 1) όπως είναι η συμμετοχή τους στην ωρίμανση ή την απομάκρυνση των SUMO, η εξειδίκευσή τους στις διάφορες SUMO ισομορφές και ο ενδοκυτταρικός τους εντοπισμός (37).

- Ωρίμανση των πρωτεϊνών SUMO

Οι SENP1 και SENP5 συμμετέχουν στην ωρίμανση των SUMO, με την SENP1 να δείχνει προτίμηση προς την SUMO-1 και την SENP5 προς τις SUMO-2 και SUMO-3. Αντίθετα, οι SENP2, SENP3, SENP6 και SENP7 δεν συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή.

- Απομάκρυνση των πρωτεϊνών SUMO

Όσον αφορά την αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών-στόχων, οι SENP παρουσιάζουν διαφορετική προτίμηση ως προς την SUMO ισομορφή που θα απομακρύνουν. Οι SENP1, SENP2, και SENP3 δρουν απομακρύνοντας και τις 3 ισομορφές των SUMO, ενώ η SENP5 δρα αποκλειστικά στις SUMO-2/3. Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν οι SENP6 και SENP7, οι οποίες εξειδικεύονται στην απομάκρυνση των SUMO-2/3 από τις αλυσίδες SUMO (75).

- Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των SENP

Ένα επιπλέον σημείο διάκρισης των SENP είναι ο ενδοκυτταρικός τους εντοπισμός. Η παρουσία των SENP σε διαφορετικά διαμερίσματα εντός του κυττάρου πιστεύεται ότι

συμβάλλει έως ένα βαθμό στην εξειδίκευση τους στα διάφορα υποστρώματα (72). Αναλυτικότερα, οι SENP3 και SENP5 αλληλεπιδρούν μέσω του N-τελικού τους άκρου με την πρωτεΐνη των πυρηνίσκων νουκλεοφосμίνη (B23 ή NPM1), οδηγώντας στον παρακείμενο εντοπισμό τους στους πυρηνίσκους και την ρύθμιση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNA (76, 77). Οι SENP1 και SENP2 εντοπίζονται στον πυρήνα και ιδιαίτερα στους πυρηνικούς πόρους, όπου στοχεύουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής αλλά και νουκλεοπορίνες (36, 78). Ομοίως, οι SENP6 και SENP7 διαθέτουν πυρηνικό εντοπισμό, κυρίως στο πυρηνόπλασμα, ρυθμίζοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση της χρωματίνης και την απόκριση σε βλάβες του DNA (75, 79, 80).

Η κύρια οικογένεια που συμμετέχει στην αποσυνμοϋλίωση πρωτεϊνών είναι αυτή των SENP, όμως εκτός αυτών, υπάρχουν και άλλες δύο πρωτεΐνες, η USPL1 (81) και η DESI (82), οι οποίες έχει βρεθεί ότι διαθέτουν ενεργότητα SUMO ισοπεπτιδάσης.

Πίνακας 1: Οι ισοπεπτιδάσες της οικογένειας SENP, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός και η δράση τους ως προς την ωρίμανση ή απομάκρυνση των πρωτεϊνών SUMO.

SENP	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός	Ωρίμανση SUMO πρωτεϊνών	Απομάκρυνση SUMO πρωτεϊνών
<i>SENP1</i>	Πυρήνας, Κυρίως στον Πυρηνικό φάκελο	Προτίμηση στη SUMO-1 και λιγότερο στις SUMO-2/3	Προτίμηση στη SUMO-1
<i>SENP2</i>	Πυρήνας Κυρίως στον Πυρηνικό φάκελο	Μικρή δράση στην ωρίμανση	Προτίμηση στη SUMO-2 και λιγότερο στη SUMO-1 και SUMO-3
<i>SENP3</i>	Πυρηνίσκος, μικρό κλάσμα στο πυρηνόπλασμα	Δεν συμμετέχει	Προτίμηση στις SUMO-2/3 και λιγότερο στη SUMO-1
<i>SENP5</i>	Πυρηνίσκος και μιτοχονδριακή μεμβράνη	Προτίμηση στις SUMO-2/3	Προτίμηση στις SUMO-2/3
<i>SENP6</i>	Πυρηνόπλασμα	Δεν συμμετέχει	SUMO-2/3 αλυσίδες

SENP7	Πυρηνόπλασμα	Δεν συμμετέχει	SUMO-2/3 αλυσίδες
-------	--------------	----------------	-------------------

1.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην φυσιολογία των οργανισμών

1.3.1 Η σημασία της σουμοϋλίωσης

Η σημασία της ύπαρξης της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της σουμοϋλίωσης για την φυσιολογία των οργανισμών αποτυπώνεται από τα αρχικά κιόλας στάδια της εμβρυογένεσης (83). Η απενεργοποίηση του γονιδίου της Ubc9 και κατά συνέπεια η κατάργηση της σουμοϋλίωσης σε έμβρυα ποντικών οδήγησε σε σοβαρές βλάβες στην οργάνωση του πυρήνα και αυξημένη απόπτωση, με τα έμβρυα αυτά να χαρακτηρίζονται ως μη βιώσιμα από τα πρώτα κιόλας στάδια μετά την εμφύτευση (84). Παρόμοια αποτελέσματα μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της Ubc9, βρέθηκαν και στον οργανισμό *zebrafish*, όπου η αυξημένη απόπτωση και η ελαττωματική μίτωση των κυττάρων οδήγησε σε επιπλοκές κατά τα τελικά αναπτυξιακά στάδια, επηρεάζοντας την φυσιολογική ανάπτυξη του κρανίου και των ματιών (85). Αντίστοιχα, η λειτουργία της Ubc9 κρίνεται καθοριστική και για την φυσιολογική ανάπτυξη και βιωσιμότητα των οργανισμών *S. Cerevisiae*, *C. Elegans* και *Drosophila* (86-88).

Εκτός από την Ubc9, τη σημασία της σουμοϋλίωσης ενισχύουν και αντίστοιχες μελέτες που αφορούν τις πρωτεΐνες SUMO. Η έκφραση της SUMO-1 είναι σημαντική για την σωστή εμβρυϊκή ανάπτυξη του οργανισμού *Xenopus laevis* (89), ενώ η ύπαρξη τουλάχιστον μία εκ των τριών ισομορφών SUMO-1, SUMO-2 ή SUMO-3 είναι απαραίτητη για την βιωσιμότητα του οργανισμού *zebrafish* (90). Ομοίως, μελέτες σε έμβρυα ποντικών στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί τα γονίδια για τις διάφορες ισομορφές των SUMO, έδειξαν πως η απουσία συγκεκριμένα της SUMO-2, που αποτελεί την υψηλότερη σε έκφραση ισομορφή, οδηγεί σε θνησιμότητα λόγω της ύπαρξης σοβαρών αναπτυξιακών προβλημάτων (91). Αντιθέτως, η απουσία των SUMO-1 ή SUMO-3 ισομορφών δεν οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα, πιθανών λόγω της καθοριστικής δράσης της SUMO-2 κατά την εμβρυογένεση (15, 92, 93).

Αδιαμφισβήτητα, η ύπαρξη της σουμοϋλίωσης για τους οργανισμούς είναι καθοριστική. Εξίσου σημαντική όμως, είναι και η διατήρηση της σωστής ισορροπίας μεταξύ της σουμοϋλίωσης και από-σουμοϋλίωσης. Τόσο η επικείμενη αύξηση της σουμοϋλίωσης σε έμβρυα ποντικών στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί τα γονίδια για

την SENP1 και την SENP2, όσο και η μείωση της σουμοϋλίωσης μετά από την απενεργοποίηση των γονιδίων για τις E3 λιγάσες PIAS1 και PIASy οδήγησε σε θνησιμότητα, λόγω σοβαρών βλαβών στην ανάπτυξη του πλακούντα και του καρδιαγγειακού συστήματος (94, 95).

1.3.2 Άμεσοι στόχοι σουμοϋλίωσης

Δεδομένα πρωτεομικών αναλύσεων προβλέπουν ότι στον άνθρωπο πάνω από 6000 πρωτεΐνες σουμουλιώνονται (96). Από την ανακάλυψη της RanGAP ως την πρώτη πρωτεΐνη που βρέθηκε ότι σουμουλιώνεται μέχρι τώρα, ο αριθμός των επιβεβαιωμένων πρωτεϊνών που αποτελούν στόχο για τις SUMO αυξάνεται συνεχώς.

Το αποτέλεσμα της τροποποίησης αυτής στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, στηρίζεται στη ρύθμιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του κάθε στόχου, επηρεάζοντας κατά συνέπεια τη δράση του, τον ενδοκυτταρικό του εντοπισμό ή ακόμα και τη σταθερότητά του. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κινάση polo-like kinase 1 (PLK1). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η σύζευξη της SUMO-1 με την PLK1 είναι καθοριστική για την δράση της στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς προωθεί την σταθεροποίηση της (η σουμοϋλίωση αναστέλλει την ουβικιτίνωση της PLK1 και κατά συνέπεια την αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα), και την είσοδο της στον πυρήνα (97). Πέραν όμως αυτών, η σουμοϋλίωση έχει δειχθεί ότι επηρεάζει και με άλλους τρόπους τους στόχους της, ρυθμίζοντας για παράδειγμα την ενεργότητα ενζύμων, όπως στη περίπτωση της κινάσης Akt1 (η σουμοϋλίωση της Akt1 αυξάνει την ενεργότητα της (98)), ή ακόμα και την διαλυτότητα πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση του παράγοντα Sae2 (η σουμοϋλίωση του Sae2 αυξάνει την διαλυτότητά του και κατά συνέπεια την δράση του στην επιδιόρθωση του DNA (99)).

Πάνω από το 80% των επιβεβαιωμένων στόχων σουμοϋλίωσης είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων μεταγραφικοί παράγοντες, θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής και ιστόνες, που συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η ρύθμιση της μεταγραφής (9, 22, 100, 101). Όσον αφορά τους μεταγραφικούς παράγοντες, η σουμοϋλίωση μπορεί να επηρεάσει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τους με άλλους ρυθμιστές της μεταγραφής, ρυθμίζοντας θετικά ή αρνητικά την έκφραση γονιδίων. Ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας που βρέθηκε να σουμουλιώνεται ήταν ο Elk-1. Η σύζευξη του Elk-1 με την SUMO-1 δείχθηκε ότι στρατολογεί την από-ακετυλάση των ιστονών HDAC-2, αναστέλλοντας

την έκφραση των γονιδίων-στόχων του (102). Αντίθετα, η σουμοϋλίωση του μεταγραφικού παράγοντα TFII-I βρέθηκε ότι εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με την HDAC-3 προωθώντας την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων (103). Εναλλακτικά, πέραν των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, οι πρωτεΐνες SUMO επηρεάζουν την ρύθμιση της μεταγραφής, ελέγχοντας τη σταθερότητα ή τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, δείχθηκε πως η σουμοϋλιωμένη μορφή του παράγοντα FoxM1b εξέρχεται του πυρήνα και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (104), ενώ η αντίστοιχη μορφή του παράγοντα ATF7 παραμένει στο κυτταρόπλασμα, όντας μη ικανή να προσδεθεί στο DNA (105).

Πέραν των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, μία μικρή ομάδα στόχων των SUMO αφορά πρωτεΐνες του πυρηνίσκου που σχετίζονται με διαδικασίες όπως η επεξεργασία του RNA και η βιογένεση των ριβοσωμάτων (106). Όμως, μέχρι στιγμής λίγα είναι γνωστά για τον ακριβή ρόλο της σουμοϋλίωσης στον πυρηνίσκο. Για παράδειγμα, η δράση της USP36 ως E3 λιγάση έχει συσχετιστεί με τη σουμοϋλίωση μίας μικρής ομάδας πρωτεϊνών, μελών των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων snoRNPs. Η σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών αυτών βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την σύνδεσή τους με τα κατάλληλα snoRNA και την σωστή συναρμολόγηση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (68, 107). Επιπλέον, η αύξηση της σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών των πυρηνίσκων NPM1 και PELP1 μετά από αποσιώπηση της ισοπεπτιδάσης SENP3, βρέθηκε να αναστέλλει την βιογένεση των ριβοσωμάτων (77, 108).

1.4 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στον καρκίνο

Όπως αναλύεται παραπάνω (βλ. 1.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην φυσιολογία των οργανισμών), ο ρόλος της σουμοϋλίωσης είναι σημαντικός για την ανάπτυξη και φυσιολογία των οργανισμών και συνδέεται με βασικές διαδικασίες των κυττάρων, από την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη μεταγωγή σήματος έως την επιδιόρθωση του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, η απορρύθμιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης συνδέεται με καταστάσεις παθογένειας, μίας εξ αυτών είναι ο καρκίνος (109, 110). Παρακάτω γίνεται αναφορά του ρόλου των συντελεστών του μηχανισμού σουμοϋλίωσης στον καρκίνο.

- ***Ο ρόλος του ενζύμου E1 SAE1/SAE2 στον καρκίνο***

Ο ρόλος των υπομονάδων του ενζύμου E1 SAE1/SAE2 έχει συσχετιστεί θετικά με την εκδήλωση και εξέλιξη του καρκίνου, πιθανόν μέσω της ρύθμισης της σουμοϋλίωσης συνολικά των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η έκφραση της υπομονάδας SAE1 χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (111) και στο γλοίωμα (112), ενώ η έκφραση της υπομονάδας SAE2 στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (113), όπου τα αυξημένα επίπεδα τους έχουν συσχετιστεί με επιδείνωση του καρκίνου, αυξημένη μετάσταση και κακή πρόγνωση. Επιβεβαιώνοντας τις παρατηρήσεις αυτές, η μείωση της έκφρασης των SAE1 και SAE2 σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του στομάχου και του πνεύμονα αντίστοιχα, οδήγησε σε αυξημένη απόπτωση, αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετάστασης (114).

- ***Ο ρόλος του ενζύμου E2 Ubc9 στον καρκίνο***

Ομοίως με το ένζυμο SAE1/SAE2, η έκφραση και του ενζύμου E2 Ubc9 επηρεάζεται στον καρκίνο και έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση της ασθένειας και την μετάσταση. Μελέτη η οποία συνέκρινε την έκφραση της Ubc9 σε δείγματα ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα σε πρωτογενείς όγκους του παχέος εντέρου και του προστάτη (115). Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, η έκφραση της Ubc9 βρέθηκε αυξημένη σε πρωτογενείς και μεταστατικούς όγκους, ενώ η υπερέκφραση της ενίσχυσε την μεταστατική ικανότητα των κυττάρων *in vitro* (116). Πέραν της καρκινογένεσης, η λειτουργία της Ubc9 έχει συσχετιστεί και με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού και το μελάνωμα (117, 118).

- ***Ο ρόλος των E3 λιγασών στον καρκίνο***

Σε αντίθεση με τα ένζυμα E1 και E2 που συντελούν στο γενικότερο μηχανισμό της ενεργοποίησης και μεταφοράς των SUMO, οι E3 λιγάσες διαθέτουν εξειδικευμένο ρόλο στην επιλογή των υποστρωμάτων και ο ρόλος τους στον καρκίνο σχετίζεται με τη ρύθμιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων (47, 119).

Όπως αναφέρεται παραπάνω (βλ. 1.2.3 Σύζευξη των SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους: ένζυμα E2 και E3), ένας από τους κύριους στόχους της σουμοϋλίωσης είναι ο παράγοντας p53, ο οποίος είναι ευρέως γνωστός για την ογκοκατασταλτική του

δράση. Η πρωτεΐνη p53 μπορεί να συζευχθεί με την SUMO-1 και SUMO-2/3 και η σύζευξη αυτή καταλύεται *in vitro* και *in vivo* από διάφορες E3 λιγάσες, εκ των οποίων όλα τα μέλη των PIAS (120, 121), τις TRIML2 και TRIM25 (122, 123), την RanBP2 (124), την Pc2 (125) και την Topors (64). Το αποτέλεσμα, όμως της τροποποίησης αυτής για τη λειτουργία της p53 ποικίλλει. Για παράδειγμα, η σουμοϋλίωση που διαμεσολαβείται από τις PIASy, RanBP2 και TRIM25 αναστέλλει την λειτουργία της p53, καθώς προκαλεί τη έξοδο της από τον πυρήνα εμποδίζοντας την να δράσει στην επαγωγή γονιδίων, έχοντας ως συνέπεια την αναστολή της απόπτωσης και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (123, 124, 126). Αντίθετα, η σουμοϋλίωση από την PIAS1 ή την TRIML2 οδηγεί στην ενεργοποίησή της p53 με συνέπεια την ενεργοποίηση της απόπτωσης (122, 127).

Ένα επιπλέον σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο συμμετέχει στην ογκογένεση και ρυθμίζεται από την σουμοϋλίωση είναι το PI3K/AKT. Η σουμοϋλίωση της κινάσης AKT μέσω της PIAS1 βρέθηκε ότι οδηγεί στην ενεργοποίησή της, ενώ αντίθετα η κατάργηση της σουμοϋλίωσης της μέσω μεταλλάξεων, ανέστειλε την δράση της με αποτέλεσμα τον μειωμένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (128). Ενδιαφέρον είναι πως η μορφή της AKT που φέρει την μετάλλαξη E17K και συναντάται σε πολλούς τύπους καρκίνου παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα σουμοϋλίωσης από ότι η αγρίου τύπου μορφή (128).

- Ο ρόλος των SENP στον καρκίνο

Όλες οι ισομορφές των SENP έχουν βρεθεί να απορυθμίζονται στον καρκίνο, με πιο συχνή την SENP1 (119). Η SENP1 υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, εκ των οποίων του προστάτη (129), του παχέος εντέρου (130), του μαστού (131), του πνεύμονα (132) και του θυροειδή (133). Η δράση της στην αποσουμοϋλίωση πρωτεϊνών όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες c-JUN (134), p53 (135), c-Myc (131) και HIF-1 (136), πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εξωκυττάρια μήτρα όπως οι μεταλλοπρωτεάσες MMP2 και MMP9 και η E-cadherin (137), καθώς και ενζύμων του μεταβολισμού όπως η εξοκινάση 2 HK2 (138), έχει βρεθεί να προωθεί την καρκινογένεση μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της διήθησης. Την διήθηση των καρκινικών κυττάρων, έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν και οι SENP2 και SENP5, η δράση των οποίων αναστέλλει το μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα TGFβ, εμποδίζοντας την έκφραση γονιδίων που προωθούν τη διαδικασία αυτή (139, 140). Επιπλέον, η SENP2 έχει βρεθεί μειωμένη σε καρκινικά κύτταρα

μυελώματος και μαστού που εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση σε χημειοθεραπεία (141, 142). Η αντίσταση αυτή οφείλεται στην αύξηση της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης IκΒα, λόγω της μειωμένης δράσης της SENP2, και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Τέλος, μία συνθήκη που συναντάται συχνά στο μικροπεριβάλλον των στερεών όγκων είναι το ήπιο οξειδωτικό στρες, το οποίο οφείλεται σε αυξημένη συγκέντρωση των ROS και έχει βρεθεί ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό και την μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (143). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το ήπιο οξειδωτικό στρες ενισχύει τη σταθερότητα της SENP3, προκαλώντας την μετακίνηση της από τους πυρηνίσκους και τη συσσώρευση της στο πυρηνόπλασμα, όπου στοχεύει και αποσουμοϋλιώνει διάφορα υποστρώματα (144, 145). Το φαινόμενο αυτό της συσσώρευσης της SENP3 έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως των ωοθηκών, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου (146). Ένα εκ των υποστρωμάτων της SENP3 στο πυρηνόπλασμα, είναι ο παράγοντας της μεταγραφής p300, η αποσουμοϋλίωση του οποίου αυξάνει την ικανότητα σύνδεσης του με τους μεταγραφικούς παράγοντες της υποξίας HIF, προωθώντας την ογκογένεση (147).

1.5 Σουμοϋλίωση και απόκριση σε στρες

Όπως αναλύεται παραπάνω, η σουμοϋλίωση παίζει κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ομοιοστασίας των κυττάρων, ενώ εξίσου σημαντική είναι και η συμμετοχή της σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Πέραν αυτών, ένας μεγάλος αριθμός μελετών, συνδέει την σουμοϋλίωση με την απόκριση και προσαρμογή των κυττάρων σε αλλαγές στο περιβάλλον τους ή συνθήκες στρες (148-151). Τα κύτταρα ως απόκριση στις αλλαγές αυτές εισέρχονται σε μία κατάσταση επαναπρογραμματισμού της γονιδιακής τους έκφρασης με σκοπό την εξασφάλιση των βέλτιστων συνθηκών για την επιβίωσή τους. Η σουμοϋλίωση ρυθμίζει τόσο τους μεταγραφικούς παράγοντες, όσο και άλλους συντελεστές των μονοπατιών απόκρισης στο στρες. Η ρύθμιση αυτή γίνεται είτε επηρεάζοντας μαζικά τα επίπεδα σουμοϋλίωσης στα κύτταρα, είτε ρυθμίζοντας τη σουμοϋλίωση συγκεκριμένων κατηγοριών πρωτεϊνών ή μεμονωμένων στόχων.

Η σουμοϋλίωση έχει βρεθεί να επηρεάζεται σε διάφορα είδη στρες, όπως στο θερμικό σοκ (152, 153), στο οξειδωτικό στρες (150), στην ισχαιμία (154-157) και στην υποθερμία (158) στα θηλαστικά, αλλά και στο αβιοτικό στρες στα φυτά (19). Για παράδειγμα, κατά το θερμικό στρες, έχει παρατηρηθεί μία μαζική αύξηση των

σουμοϋλιωμένων από τις SUMO-2/3 πρωτεϊνών (153). Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών αυτών αφορά πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την χρωματίνη (159). Παράλληλα, καθοριστικής σημασίας είναι η σουμοϋλίωση του μεταγραφικού παράγοντα HSF1 (Heat Shock factor 1), του κύριου ρυθμιστή της απόκρισης σε θερμικό στρες, ο οποίος επάγει την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων, εκ των οποίων τα γονίδια για την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (160). Η σουμοϋλίωση του HSF1 από τη SUMO-1 βρέθηκε να αυξάνεται δραματικά κατά το θερμικό σοκ, με παράλληλη αύξηση της δράσης του (161). Αντίθετα, το ήπιο οξειδωτικό στρες (συγκέντρωση H_2O_2 ~1mM) βρέθηκε ότι αναστέλλει την δράση των ενζύμων E1 και E2 του μηχανισμού σουμοϋλίωσης, ενώ παράλληλα σταθεροποιεί τις ισοπεπτιδάσες SENP (κυρίως την SENP3) προκαλώντας έτσι την μαζική μείωση της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών (147, 162-164). Το αποτέλεσμα της ρύθμισης αυτής είναι η προώθηση της λειτουργίας του μηχανισμού απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DNA Damage Response) (162).

Μία επιπλέον κατάσταση η οποία έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τα συνολικά ένζυμα του μηχανισμού σουμοϋλίωσης οδηγώντας σε μαζικές αλλαγές στο πρότυπο σουμοϋλίωσης είναι και η ισχαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη υποξικών συνθηκών και θα αναφερθεί λεπτομερώς παρακάτω (βλ. 2.3 Ρύθμιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης από την υποξία) αλλά και η κατάσταση της υποξίας από μόνη της, στην οποία εστιάζεται η παρούσα διδακτορική διατριβή. Παρακάτω αναλύεται λεπτομερώς η υποξία και η σημασία της, οι μηχανισμοί απόκρισης των κυττάρων σε αυτή, καθώς και η σχέση μεταξύ της σουμοϋλίωσης και της υποξίας.

2. Υποξία

Η συγκέντρωση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 21 %. Ωστόσο, τα φυσιολογικά επίπεδα του οξυγόνου στους ιστούς είναι πολύ χαμηλότερα με εύρος 2-9 %, λόγω της κατανάλωσής του από τα κύτταρα αλλά και της μειωμένης διάχυσης μεταξύ των ιστών (165). Υπάρχουν και περιπτώσεις όπου τα επίπεδα αυτά είναι ακόμα χαμηλότερα (<1 %), όπως για παράδειγμα σε πληθυσμούς κυττάρων του θύμου αδένος, των νεφρών και του μυελού των οστών. Οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, δεδομένου του κρίσιμου ρόλου του οξυγόνου για την επιβίωση τους, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να αντιλαμβάνονται και να προσαρμόζονται σε τυχόν αλλαγές στα επίπεδα οξυγόνου στο περιβάλλον τους. Η **υποξία** αντιστοιχεί στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου στα κύτταρα, τους ιστούς ή σε ολόκληρο τον οργανισμό και

μπορεί να προκύψει είτε λόγω μειωμένης παροχής, είτε λόγω αυξημένης κατανάλωσης του οξυγόνου στις εκάστοτε περιοχές (166). Η ένταση του φαινομένου παρουσιάζει διακύμανση, από ήπια έως σοβαρή υποξία και μπορεί να συμβεί για πολύ μικρά (οξεία υποξία: διάρκεια από δευτερόλεπτα έως λίγες ώρες) έως εκτεταμένα (χρόνια υποξία: από ώρες έως μέρες) χρονικά διαστήματα ή για διακοπτόμενα διαστήματα (διαλειμματική ή κυκλική υποξία: έκθεση των κυττάρων/ιστών σε κύκλους υποξίας και επαναοξυγόνωσης) (167).

Η υποξία μπορεί να προκληθεί τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Σε συστηματικό επίπεδο, μπορεί να συμβεί κατά την έκθεση των οργανισμών σε υψηλό υψόμετρο, κατά την διάρκεια έντονης άθλησης ή κατά την κατάδυση σε μεγάλο βάθος. Συγκεκριμένα, κατά την έντονη άσκηση, ιστοί με μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα όπως το συκώτι ή οι μύες μπορεί να έχουν ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου από ότι σε κατάσταση ηρεμίας. Ενώ, κατά την παραμονή σε υψηλό υψόμετρο, λόγω της μειωμένης περιεκτικότητας του αέρα σε οξυγόνο, τα επίπεδα οξυγόνου στο αίμα και κατ' επέκταση στους ιστούς μειώνονται. Αντίστοιχο φαινόμενο μειωμένης παροχής οξυγόνου μπορεί να συναντηθεί και σε ασθενείς με προβλήματα στο αναπνευστικό (π.χ. χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, άσθμα, πνευμονική εμβολή) και καρδιαγγειακό σύστημα (π.χ. ισχαιμικό επεισόδιο).

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ύπαρξη υποξικού περιβάλλοντος είναι καθοριστική για φυσιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυογένεση, η αγγειογένεση και η ερυθροποίηση (168). Σημαντική, όμως, είναι και η εμπλοκή της υποξίας σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις με κύρια, τον καρκίνο (169-171). Η υπέρμετρη κατανάλωση του οξυγόνου από τα διαρκώς πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα και η ανώμαλη αγγείωση, οδηγούν στη δημιουργία μίας διαβάθμισης διαθέσιμου οξυγόνου από το εξωτερικό προς το εσωτερικό ενός στερεού όγκου.

2.1 Κυτταρική απόκριση στην υποξία μέσω της δράσης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

2.1.1 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία είναι μία ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, γνωστοί ως **επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF** (Hypoxia Inducible Factors). Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF ενεργοποιούνται παρουσία

χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και παίζουν σημαντικό ρόλο ρυθμίζοντας βασικές βιολογικές διεργασίες που είναι ουσιαστικές για τη διατήρηση της ομοιοστασίας και της φυσιολογικής λειτουργία των κυττάρων. Κάποια παραδείγματα είναι ο επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού σε αναερόβιο και η αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου μέσω του σχηματισμού νέων αγγείων, καθώς και η διήθηση και η μετάσταση ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα (172).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από μία οξυγόνο-εξαρτώμενη (HIF- α) και μία σταθερά εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1 β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) και δρουν προσδένοντας στους υποκινητές γονιδίων και επάγοντας την έκφραση τους (171).

Ο ARNT είναι η κύρια ισομορφή που συμμετέχει στην μεταγραφική ρύθμιση κατά την υποξία και εκφράζεται καθολικά σε όλους τους ιστούς. Υπάρχει και μία δεύτερη ισομορφή, ο ARNT2, η οποία εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο ρόλος της όμως στην υποξία παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος (173, 174).

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές της οξυγόνο-εξαρτώμενης υπομονάδας HIF- α , οι HIF-1 α , HIF-2 α (αναφέρεται και ως EPAS1) και HIF-3 α , οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (175-178). Η έκφραση των τριών αυτών ισομορφών διαφέρει. Ο HIF-1 α εκφράζεται καθολικά σχεδόν σε όλους τους ιστούς, ενώ οι HIF-2 α και HIF-3 α παρουσιάζουν ιστοειδικότητα (179). Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του HIF-2 α ανιχνεύονται κυρίως στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στους νεφρούς, στον εγκέφαλο και στην καρδιά (180). Ο HIF-3 α είναι η λιγότερο χαρακτηρισμένη ισομορφή και παρουσιάζει τη μικρότερη ομοιότητα σε σχέση με τις άλλες δύο. Συναντάται σε πολλαπλές ισομορφές λόγω πολύπλοκου εναλλακτικού ματίσματος και η έκφραση του περιορίζεται κυρίως στην καρδιά, τους σκελετικού μύες, τον πλακούντα και τους πνεύμονες (181, 182).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η υπομονάδα HIF- α αποικοδομείται συνεχώς. Υπεύθυνη για την αποικοδόμηση είναι η επικράτεια οξυγόνο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (oxygen-dependent degradation domain, ODD). Η επικράτεια αυτή διαθέτει συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης, τα οποία στοχεύονται και υδροξυλώνονται από τις προλυλο-υδροξυλάσες (PHDs) (183). Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση όπως αναλύεται στην συνέχεια, είναι το εναρκτήριο σήμα για την αποικοδόμηση των HIF- α υπομονάδων.

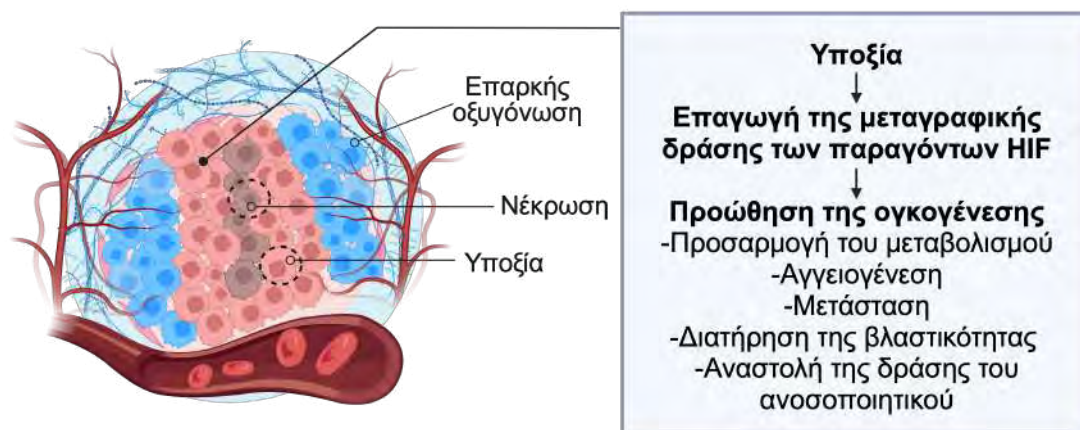
Στην υποξία, η υπομονάδα HIF-α σταθεροποιείται, προσδένεται με την υπομονάδα HIF-β καθιστώντας έτσι ένα λειτουργικό σύμπλοκο, το οποίο εντοπίζεται εντός του πυρήνα και δρα προσδεμένο στο DNA (184) . Η σύνδεση των δύο αυτών υπομονάδων γίνεται μέσω των επικρατειών PAS (Per-ARNT-Sim A/B), που βρίσκονται κοντά στο αμινο-τελικό τους άκρο (185). Τόσο οι υπομονάδες HIFα, όσο και η HIFβ, διαθέτουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), τα οποία αναγνωρίζονται από τις ιμπορτίνες μέσω των οποίων εξασφαλίζεται η είσοδος τους στον πυρήνα (186, 187) .

Η δυνατότητα πρόσδεσης των HIF πάνω στο DNA προσδίδεται μέσω της επικράτειας bHLH (basic helix-loop-helix) και γίνεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HRE) (175). Τα στοιχεία αυτά βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων των HIF και διαθέτουν τη συντηρημένη αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' (188). Μετά την πρόσδεση των HIF στα στοιχεία HRE, οι συνενεργοποιητικές επικράτειες N-TAD και C-TAD των HIF-α προσελκύουν στο σημείο διάφορους συμπαράγοντες της μεταγραφής, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους παράγοντες CBP/p300, με άμεσο αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (189-191).

2.1.2 Γονίδια στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων HIF και η σημασία τους στην υγεία και στον καρκίνο

Οι HIF επάγουν την έκφραση γονιδίων που είναι απαραίτητα για την προσαρμογή και επιβίωση τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, οι HIF έχει βρεθεί ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ογκογένεση. Η υπέρμετρη κατανάλωση του οξυγόνου από τα διαρκώς πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα και η ανώμαλη αγγείωση, οδηγούν στη δημιουργία μίας διαβάθμισης διαθέσιμου οξυγόνου από το εξωτερικό προς το εσωτερικό ενός στερεού όγκου, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά του όγκου κοντά σε αιμοφόρα αγγεία είναι καλά οξυγονωμένα. Αντίθετα, τα κύτταρα που βρίσκονται εσωτερικά στο κέντρο του όγκου, λόγω της σχεδόν ανύπαρκτης παροχής και διαθεσιμότητας οξυγόνου, οδηγούνται σε κατάσταση ασφυξίας και τελικά νέκρωσης. Ενδιαφέρον είναι ότι η ύπαρξη του υποξικού περιβάλλοντος που δημιουργείται στη μεσαία περιοχή του όγκου, μέσω της δράσης των HIF, ρυθμίζει κρίσιμες διεργασίες

για την επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι ο μεταβολισμός, η αγγειογένεση, η μετάσταση, η συντήρηση των βλαστικών κυττάρων και η αναστολή της στόχευσης των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα (192).



Εικόνα 6: Η υποξία αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος των στερεών όγκων. Η αυξημένη κατανάλωση του διαθέσιμου οξυγόνου από τα διαρκώς πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα και η μειωμένη παροχή οξυγόνου λόγω της ανώμαλης αγγειογένεσης στο εσωτερικό των όγκων οδηγούν στη δημιουργία υποξικών περιοχών έως και νεκρωτικών περιοχών (παντελής έλλειψη οξυγόνου). Η δράση των HIF στα υποξικά καρκινικά κύτταρα προωθεί την ογκογένεση μέσω της ρύθμισης διαδικασιών όπως είναι ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού, η αγγειογένεση, η μετάσταση, η διατήρηση της βλαστικότητας των καρκινικών κυττάρων και η αναστολή της στόχευσης τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

Οι HIF-1 και HIF-2 στοχεύουν τόσο κοινά όσο και διακριτά για τη κάθε ισομορφή γονίδια. Ο HIF-1 έχει βρεθεί ότι διευκολύνει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου ρυθμίζοντας κυρίως τον μεταβολισμό τους (193). Συγκεκριμένα, ο HIF-1 επάγει την έκφραση μεταφορέων γλυκόζης (GLUT1, GLUT3) για την διευκόλυνση της πρόσληψης γλυκόζης και ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση και την παραγωγή γαλακτικού οξέος (π.χ. HK1/2, PFK1, ALDOA, PGK1, ENO1, LDHA), προωθώντας την παραγωγή ATP μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης (194, 195). Επίσης, ο HIF-1 αναστέλλει την λειτουργία των μιτοχονδρίων, της κύριας πηγής κατανάλωσης οξυγόνου στα κύτταρα λόγω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με σκοπό την ελάττωση της κατανάλωσης οξυγόνου και της παραγωγής ROS (196). Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της επαγωγής της έκφρασης της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού PDK1 και της πρωτεΐνης BNIP3. Η PDK1

αναστέλλει τη μιτοχονδριακή πυροσταφυλική αφυδρογονάση και μπλοκάρει έτσι τη μετατροπή του πυροσταφυλικού, το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, σε ακετυλο-CoA. Με αυτό τον τρόπο, η ροή του πυροσταφυλικού προς τα μιτοχόνδρια και τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος TCA μειώνεται και προωθείται η παραγωγή γαλακτικού μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης (197-199). Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη BNIP3 ενεργοποιεί την αυτοφαγία των μιτοχονδρίων, μειώνοντας έτσι περαιτέρω τη δράση τους (200).

Η μειωμένη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων στην υποξία προκαλεί επίσης την συσσώρευση λιπαρών οξέων, οδηγώντας σε λιποτοξικότητα. Γι' αυτό το λόγο, ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πρόσληψη των λιπαρών οξέων, την μετατροπή τους σε τριακυλογλυκερόλες και την αποθήκευσή τους (201-204). Συγκεκριμένα, ο HIF-1 επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ και των πρωτεϊνών δέσμευσης λιπαρών οξέων FABP διευκολύνοντας την πρόσληψη των λιπαρών οξέων, καθώς και την έκφραση των ενζύμων AGPAT2 και lipin-1 που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριακυλογλυκερολών, προωθώντας την αποθήκευσή τους σε μορφή λιποσταγονιδίων (205-209).

Οι παραπάνω μεταβολικές αλλαγές στην υποξία οδηγούν στη συσσώρευση όξινων μεταβολιτών. Τα κύτταρα για να εξισορροπήσουν το όξινο περιβάλλον που δημιουργείται στο εσωτερικό τους επάγουν, μέσω της δράσης κυρίως του HIF-1, την έκφραση μεμβρανικών μεταφορέων, όπως για παράδειγμα του μεταφορέα μονοκαρβοξυλικών οξέων 4 (Monocarboxylate transporter 4, MCT4) και του αντιμεταφορέα Na⁺/H⁺ NHE 1 (sodium-hydrogen antiporter NHE 1) που μεταφέρουν εκτός των κυττάρων το γαλακτικό οξύ και τα H⁺ (210, 211). Επίσης, οι HIF επάγουν την έκφραση των καρβονικών ανυδρασών CA9 και CA12 οι οποίες μετατρέπουν το CO₂ σε HCO₃⁻ και H⁺. Το βασικό HCO₃⁻ μεταφέρεται στη συνέχεια εντός των κυττάρων αυξάνοντας έτσι το ενδοκυτταρικό pH (212).

Ένας επίσης σημαντικός ρόλος των HIF είναι η προώθηση του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων, είτε κατά την εμβρυογένεση με την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος του εμβρύου, είτε κατά την ογκογένεση σε περιοχές με αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο με την ανάπτυξη και την αναδιάταξη των ήδη υπαρχόντων αγγείων (213, 214). Οι HIF ρυθμίζουν γονίδια που είναι κρίσιμα για την αγγειογένεση, όπως ο παράγοντας ανάπτυξης του αγγειακού ενδοθηλίου VEGF (215, 216). Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αυξητικοί παράγοντες με κύριο τον VEGF προωθούν την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων του μεσοδέρματος σε αιμοποιητικά και

ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια οργανώνονται σχηματίζοντας πρώιμα αιμοφόρα αγγεία (217, 218). Πέραν όμως της εμβρυογένεσης, μπορούν να δημιουργηθούν νέα τριχοειδή και από ήδη υπάρχοντα αγγεία, μέσω του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και της δράσης άλλων υποστηρικτικών κυττάρων όπως περιαγγειακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Σε αυτή τη διαδικασία επίσης συμμετέχουν οι HIF, επάγοντας την έκφραση όχι μόνο του VEGF αλλά και των αγγειοποιητίνων ANGPT-1 και ANGPT-2, των υποδοχέων VEGF-R1 (Flt-1) και VEGF-R2 (Flk-1), του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI (189) και των μεταλλοπρωτεάσεων MMP-2 και MMP-9 (219, 220). Επιπλέον, η ερυθροποιητίνη (EPO) που αποτελεί στόχος του HIF-2, βελτιώνει την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου του αίματος ενισχύοντας την παραγωγή των ερυθροκυττάρων (221).

Οι HIF επάγουν την έκφραση παραγόντων που συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της μετάστασης (222). Κάποια παραδείγματα αποτελούν οι καταστολείς της μεταγραφής SNAIL (223), SLUG (224) και TWIST (225) που προωθούν τη μετατροπή των στατικών επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), η GTPάση RHOA και η κινάση ROCK1 (226) που διευκολύνουν την κινητικότητα των κυττάρων και τα ένζυμα LOX, LOXL2, LOXL4, P4HA1, P4HA2, PLOD1 και PLOD2 που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας (227, 228).

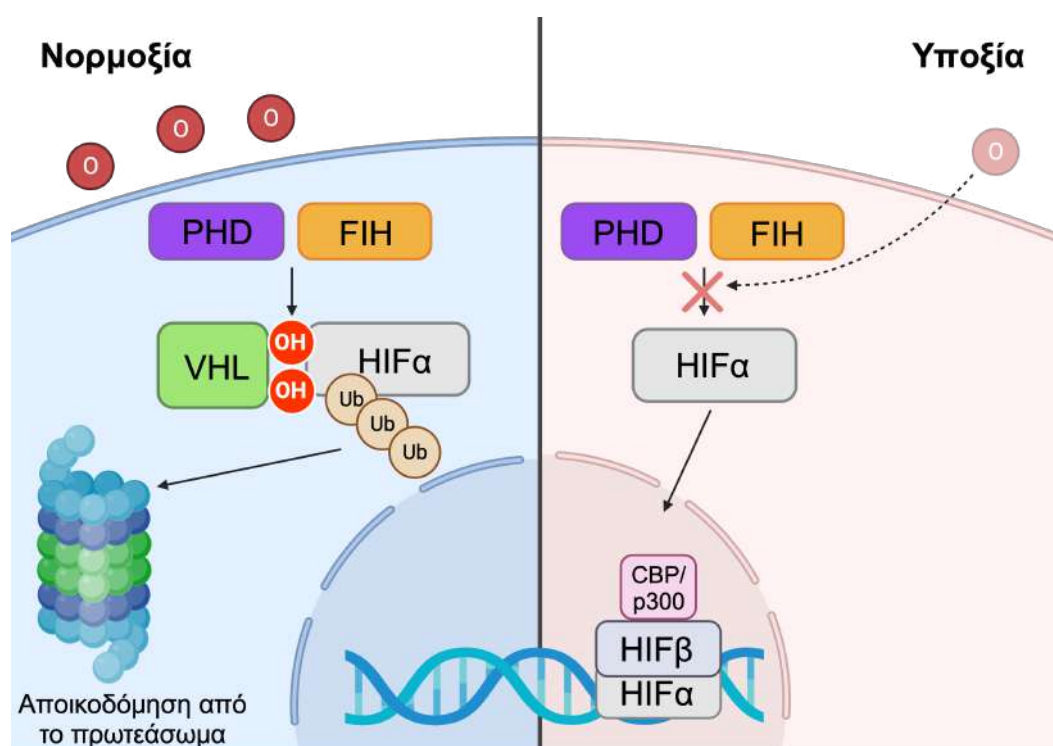
Τέλος, η δράση των HIF ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NANOG, OCT4, SOX2 και KLF4, οι οποίοι προάγουν την πολυδυναμία των καρκινικών κυττάρων (229-232).

2.2 Μετα-μεταφραστική ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία των μεταγραφικών παραγόντων HIF

2.2.1 Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF από το οξυγόνο

Το κυριότερο επίπεδο ρύθμισης των HIF είναι μέσω του μοριακού οξυγόνου. Στην νορμοξία, η οξυγονο-εξαρτώμενη υπομονάδα HIF-α υδροξυλιώνεται από τις προλυλο-υδροξυλάσες PHDs σε συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης που βρίσκονται εντός της επικράτειας ODD (HIF-1α: Pro402 και Pro564, HIF-2α: Pro405 και Pro531, HIF-3α: Pro492). Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών και η δράση τους είναι στενά συνδεδεμένη με το οξυγόνο, καθώς το χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα για την

πραγματοποίηση της αντίδρασης υδροξυλίωσης. Η υδροξυλίωση αναγνωρίζεται και προκαλεί την πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau (pVHL). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μέρος ενός συμπλόκου με δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, η στρατολόγηση του οποίου οδηγεί στην πολύ-ουβικιτίνωση της υπομονάδας HIF- α , σημαίνοντας την προς αποικοδόμηση από το 26S πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες υποξίας, η δράση των PHDs αναστέλλεται, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF- α και την είσοδο της στον πυρήνα. Εκεί, συνδέεται με την υπομονάδα HIF- β και το ενεργό πλέον ετεροδιμερές όντας προσδεδεμένο στο DNA, αλληλεπιδρά με διάφορους ρυθμιστές της μεταγραφής και επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (40). Πέραν των υδροξυλασών PHD, οι υπομονάδες HIF-1 α και HIF-2 α ρυθμίζονται και από μία επιπλέον διοξυγενάση που ονομάζεται παράγοντας αναστολής του HIF ή FIH σε κατάλοιπα ασπαραγίνης (233). Η τροποποίηση αυτή δεν επηρεάζει άμεσα την σταθερότητα των HIF- α όπως στην περίπτωση των PHDs, αλλά αναστέλλει την μεταγραφική τους δράση εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση τους με τους συμπαραγόντες της μεταγραφής CBP/p300. Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται το μονοπάτι των HIF σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.



Εικόνα 7: Η ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF από το οξυγόνο. Στην νορμοξία, η υδροξυλίωση του HIF α από τις υδροξυλάσες PHDs και FIH, οδηγεί στην ουβικιτίνωση του μέσω της δράσης της VHL και την συνεχή του αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Στην υποξία, οι

υδροξυλάσες απενεργοποιούνται, ο HIFα σταθεροποιείται, εισάγεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με τη HIFβ υπομονάδα και δρουν ως ετεροδιμερές που προσδένεται στο DNA και επάγει την έκφραση γονιδίων. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

Εκτός από το οξυγόνο και την υδροξυλίωση/ουβικιτίνωση, άλλες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, έχουν βρεθεί να ρυθμίζουν το μονοπάτι απόκρισης στην υποξία των παραγόντων HIF, όπως η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η μεθυλίωση και η σουμοϋλίωση, στοχεύοντας είτε άμεσα τους HIF, είτε άλλους παράγοντες του μονοπατιού (234). Η κάθε τροποποίηση ανάλογα το κατάλοιπο αμινοξέος που στοχεύει, επιδρά διαφορετικά, προωθώντας ή αναστέλλοντας την κυτταρική λειτουργία των παραγόντων αυτών. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α στη Thr796 από την κινάση της καζεΐνης 2 CK2, εμποδίζει την υδροξυλίωση του από την υδροξυλάση FIH, επάγοντας την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (235). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α στην σερίνη 247 από την κινάση της καζεΐνης 1 CK1δ, εμποδίζει την σύνδεση του με τον ARNT, αναστέλλοντας την δράση του HIF-1 (236).

2.2.2 Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF και παραγόντων του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία από τη σουμοϋλίωση

Όπως αναφέρεται παραπάνω, μία εκ των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που συμμετέχει στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία των παραγόντων HIF είναι η σουμοϋλίωση (40). Παρακάτω, αναλύεται ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο μονοπάτι των HIF, αλλά και στη ρύθμιση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.

- HIF-α και ARNT

Οι HIF-α υπομονάδες έχει βρεθεί ότι σουμοϋλιώνονται, στα κατάλοιπα λυσίνης K391 και K477 για τον HIF-1α και στο κατάλοιπο K394 για τον HIF-2α με το αποτέλεσμα της τροποποίηση αυτής στη ρύθμιση των HIF-α να ποικίλλει. Όσον αφορά τον HIF-1α, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η σουμοϋλίωση από την ισομορφή SUMO-1 προωθεί την σταθεροποίηση του αυξάνοντας την μεταγραφική του δράση. Συγκεκριμένα, η αύξηση της σύνδεσης του HIF-1α με τη SUMO-1, είτε μετά από την υπερέκφραση της SUMO-1, είτε μετά από την επαγωγή πρωτεϊνών που ενισχύουν την σουμοϋλίωση όπως η πρωτεΐνη RSUME και η E3 λιγάση της οικογένειας Polycomb Cbx4, οδήγησε στην σταθεροποίηση του HIF-1α και στην επαγωγή της μεταγραφικής

δράσης του HIF-1 (237-240). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο. Μεταλλάγματα του HIF-1α που δεν μπορούν να σουμοϋλιωθούν παρουσίασαν αυξημένη μεταγραφική ικανότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (241), ενώ η αύξηση της σουμοϋλίωσης του HIF-1α μετά από την αποσιώπηση της ισοπεπτιδάσης SENP1, οδήγησε στην επαγωγή της αποικοδόμησης του από το πρωτεάσωμα (242). Αντίστοιχα, η μείωση της σουμοϋλίωσης του μετά από την αποσιώπηση της E3 λιγάσης PIASy, ενίσχυσε τη σταθεροποίησή του (243). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν πως η ισοπεπτιδάση SENP1 είναι στόχος των HIF και συμμετέχει σε ένα κύκλο θετικής ρύθμισης, ενισχύοντας τη δράση τους σε βιολογικές διεργασίες των καρκινικών κυττάρων όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η διατήρηση της βλαστικότητας (136, 244, 245). Όσον αφορά τον HIF-2α, βρέθηκε ότι η σουμοϋλίωση του από τη SUMO-2 προωθεί την αποικοδόμηση του και η τροποποίηση αυτή ρυθμίζεται από την ισοπεπτιδάση SENP1 (246).

Πέραν των HIF-α και η HIF-β υπομονάδα ή ARNT ρυθμίζεται από τις SUMO. Τόσο σε πειράματα *in vitro*, όσο και *in vivo*, ο ARNT βρέθηκε ότι σουμοϋλιώνεται από την SUMO-1 στο κατάλοιπο K245. Η λυσίνη αυτή βρίσκεται εντός της επικράτειας ετεροδιμερισμού PAS και η σύζευξη της SUMO σε αυτήν μέσω της E3 λιγάσης PIAS1, οδήγησε σε αναστολή της μεταγραφικής δράσης των HIF και στην κατάργηση της αλληλεπίδρασης του ARNT με την πρωτεΐνη PML στα πυρηνικά σωμάτια (247).

- ***PHDs και FIH***

Οι υδροξυλάσες έχουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των HIF γι' αυτό υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο. Στον άνθρωπο, υπάρχουν τρεις ισομορφές των PHD που συνδέονται με την απόκριση στην υποξία. Μία εξ αυτών, η PHD3 έχει βρεθεί ότι επάγεται στην υποξία ρυθμίζοντας αρνητικά τους HIF κατά την παρατεταμένης διάρκειας υποξία (248). Η υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου μορφή της PHD3 βρέθηκε να σουμοϋλιώνεται μετά από ταυτόχρονη υπερέκφραση των SUMO2/3. Η τροποποίηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF, χωρίς όμως αυτό να οφείλεται στην άμεση μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α (249). Αντίθετα, η υδροξυλάση FIH βρέθηκε ότι σουμοϋλιώνεται από τις SUMO2/3 στην υποξία σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος, οδηγώντας την προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, ενισχύοντας έτσι την μεταγραφική δράση των HIF (250).

- ***Πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL)***

Η πρωτεΐνη pVHL διαμεσολαβεί την πολύ-ουβικιτίνωση των HIF-α κατά την νορμοξία, οδηγώντας τους προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η pVHL σουμοϋλιώνεται στο κατάλοιπο K171 μέσω της E3 λιγάσης PIASy. Η τροποποίηση αυτή ανέστειλε την δράση της pVHL, οδηγώντας στην σταθεροποίηση του HIF-1α (251).

- ***CBP/p300***

Οι πρωτεΐνες CBP (CREB binding protein) και p300 αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες εκ των οποίων και οι HIF και δρουν ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές. Η p300 βρέθηκε ότι σουμοϋλιώνεται από την SUMO-1 στα κατάλοιπα K1020 και K1024 και η τροποποίηση αυτή προσέλκυσε την από-ακετυλάση των ιστονών HDAC6, καταστέλλοντας την μεταγραφή γονιδίων (252-254). Αντίθετα, η απομάκρυνση της SUMO-1 από την p300 μέσω της ισοπεπτιδάσης SENP3 οδήγησε στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1 (147). Ομοίως με την p300, η πρωτεΐνη CBP τροποποιείται από την SUMO-1 στα κατάλοιπα K999, K1034 και K1057, και προσελκύει έτσι την από-ακετυλάση των ιστονών HDAC2, οδηγώντας στην καταστολή της μεταγραφής γονιδίων (253).

2.3 Ρύθμιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης από την υποξία

Πέραν της ρύθμισης των συντελεστών του μονοπατιού της υποξίας από τη σουμοϋλίωση, έχει βρεθεί πως και η υποξία με τη σειρά της επηρεάζει την σουμοϋλίωση πρωτεϊνών.

Κατά την ισχαιμία, η παρεμπόδιση της ροής του αίματος στον παρακείμενο ιστό, οδηγεί στην μείωση της παροχής οξυγόνου και θρεπτικών, δημιουργώντας στο σημείο εκείνο υποξικές συνθήκες. Η σουμοϋλίωση έχει μελετηθεί εκτενώς στο πλαίσιο της ισχαιμίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των σουμοϋλιωμένων από τις SUMO2/3 πρωτεϊνών αυξάνονται σημαντικά στον εγκέφαλο τρωκτικών μετά από ισχαιμικό στρες και η ρύθμιση αυτή βρέθηκε ότι έχει νευροπροστατευτικό ρόλο (157, 255, 256). Επιπλέον, η υπερέκφραση της SUMO1 ή της SUMO2 σε κύτταρα νευροβλαστώματος τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε χαμηλές συνθήκες οξυγόνου και στερησης γλυκόζης (συνθήκη που αναφέρεται ως Oxygen and Glucose Deprivation, OGD), οδήγησε σε αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, ενώ αντίθετα κατά την

αποσιώπηση της έκφρασης της SUMO1, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά (257). Σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες, η έκφραση των ισοπεπτιδασών SENP1 και SENP3 βρέθηκε αυξημένη σε νευρικά κύτταρα και κύτταρα του μυοκαρδίου ποντικών τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες OGD, ενώ η αποσιώπηση συγκεκριμένα της SENP3 στις αντίστοιχες συνθήκες οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο (258-260).

Όσον αφορά τη σημασία της σουμοϋλίωσης στην υποξία, πολύ λιγότερα είναι γνωστά. Παρά τις αναφορές για μαζική αύξηση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε *in vitro* και *in vivo* ισχαιμικά μοντέλα, στην υποξία μελέτες εντοπίζουν εστιασμένες αλλαγές στη σουμοϋλίωση πρωτεϊνών-στόχων. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο μελέτες, μία εκ των οποίων αποτελεί προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, οι οποίες στηρίζονται σε πειράματα πρωτεομικής ανάλυσης των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επώαστηκαν για 24-48 ώρες παρουσία 1 % O₂ (261, 262). Αναλυτικότερα, η μελέτη των Kunz et al. αναφέρει ότι σε κύτταρα HeLa που επώαστηκαν για 24 ώρες στην υποξία (1 % O₂), η καταλυτική δράση των ισοπεπτιδασών SENP1 και SENP3 αναστάλθηκε, προκαλώντας την αύξηση της σουμοϋλίωσης από τη SUMO-1 μίας μικρής ομάδας πρωτεϊνών (261).

Όσον αφορά τη προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Βιοχημείας (262), αντίστοιχα, σε καρκινικά κύτταρα HeLa τα οποία επώαστηκαν στην υποξία (1 % O₂) για 48 ώρες, δεν παρατηρήθηκε μαζική αλλαγή στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης, παρά στοχευμένες αλλαγές στη σουμοϋλίωση πρωτεϊνών-στόχων. Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 62 πρωτεΐνες, των οποίων η σύζευξη είτε με τη SUMO-1, είτε με τις SUMO-2/3 μεταβλήθηκε κατά την υποξία. 28 από αυτές, αφορούσαν κυρίως ένζυμα της γλυκόλυσης, η σουμοϋλίωση των οποίων επάχθηκε στην υποξία, πιθανόν λόγω της παράλληλης επαγωγής των επιπέδων έκφρασης τους από τους HIF. Προέκυψε, όμως και μία ομάδα 24 πρωτεϊνών, των οποίων η σουμοϋλίωση μεταβλήθηκε στην υποξία, ενώ τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα παρέμειναν σταθερά. Η πλειοψηφία αυτών των πρωτεϊνών αφορά παράγοντες που συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής, όπως για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2A (Transcription factor AP-2 alpha ή AP2α), η αποσουμοϋλίωση του οποίου στην υποξία, βρέθηκε πως μπορεί να ενισχύσει την δραστικότητα του HIF-1 *in vitro* (262).

Μία επιπλέον πρωτεΐνη που συγκαταλέγεται στην παραπάνω ομάδα, της οποίας η σουμοϋλίωση, συγκεκριμένα από τη SUMO-1, βρέθηκε να μειώνεται στην υποξία,

είναι η εξωριβονουκλεάση EXOSC10. Η σουμοϋλίωση της EXOSC10 σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου, αποτέλεσε το κεντρικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Οι γνωστές κυτταρικές λειτουργίες της EXOSC10 αναφέρονται στη συνέχεια.

3. Η εξωριβονουκλεάση Exosome component 10 (EXOSC10)

Η πρωτεΐνη EXOSC10 (αναφέρεται και ως PM/Scl-100 ή RRP6 λόγω της ομόλογης της στην ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*) είναι ένα ένζυμο με δράση 3'-5' εξωριβονουκλεάσης και υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στον πυρήνα με ιδιαίτερο εμπλουτισμό στους πυρηνίσκους. Η πρώτη της ταυτοποίηση στον άνθρωπο έγινε σε ασθενείς με σύνδρομο επικάλυψης σκληροδερμίας/πολυμυοσίτιδας (polymyositis/systemic sclerosis overlap syndrome). Στους ασθενείς με το σύνδρομο αυτό, παρατηρήθηκε παραγωγή αντισωμάτων για την στόχευση ενός συμπλόκου πρωτεϊνών, εκ των οποίων μίας πρωτεΐνης των πυρηνίσκων μοριακού βάρους 100 kDa, η οποία αποδείχθηκε ότι αντιστοιχούσε στην EXOSC10, εξ ου και ο όρος PM/Scl-100 (263, 264). Η EXOSC10 έχει μελετηθεί εκτενώς στις ζύμες και λιγότερο στον άνθρωπο, ως μέρος του RNA εξωσώματος (265).

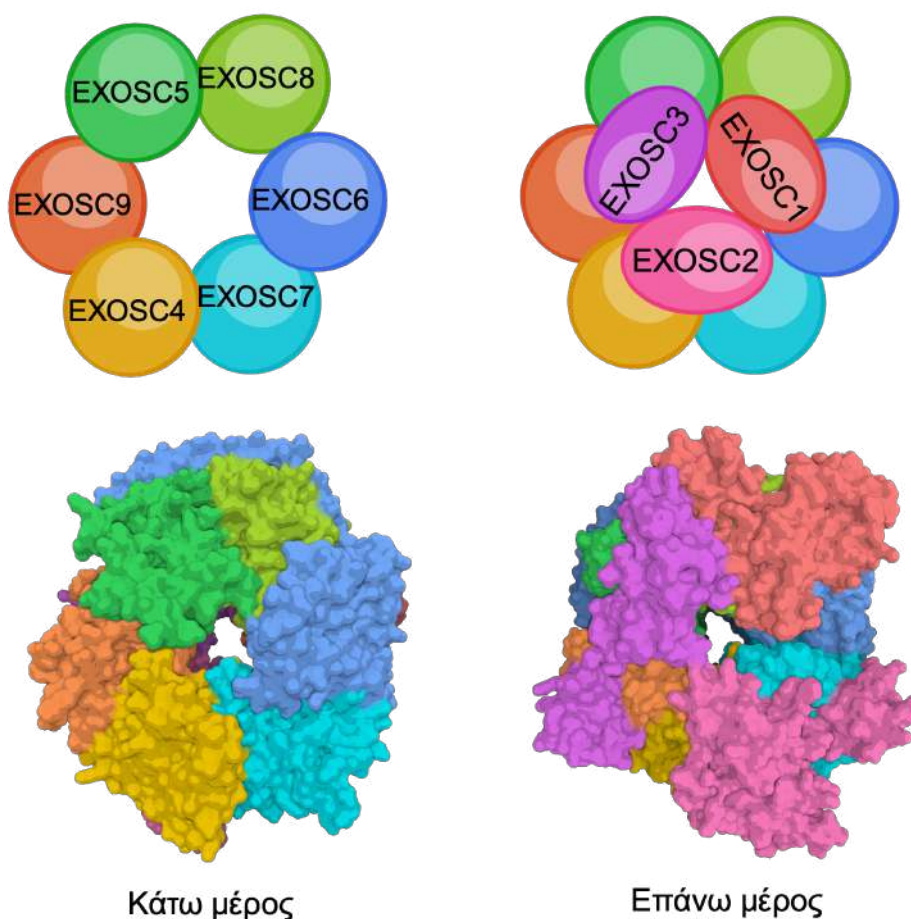
3.1 Το RNA εξώσωμα, οι συμπαράγοντες και τα RNA-στόχοι του

Το RNA εξώσωμα είναι ένα συντηρημένο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο συμμετέχει στην επεξεργασία και αποικοδόμηση σχεδόν όλων των τύπων RNA (266). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα, ο οποίος σε συνεργασία με εξειδικευμένες καταλυτικές υπομονάδες διαθέτει δράση τόσο ενδοριβονουκλεάσης, όσο και 3'-5' εξωριβονουκλεάσης. Η λειτουργία του RNA εξωσώματος καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του με διάφορους συμπαράγοντες και έγκειται στην ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης φυσιολογικών RNA, στην στόχευση και αποικοδόμηση ελαττωματικών RNA και στην επεξεργασία πρώιμων μορφών RNA με σκοπό την τελική τους ωρίμανση (267).

Το RNA εξώσωμα αποτελείται από έναν δομικό πυρήνα στον οποίον συνδέονται, ανάλογα το μέρος του κυττάρου, οι διάφορες καταλυτικές υπομονάδες του, όπως αναλύεται παρακάτω.

Κεντρικός πυρήνας

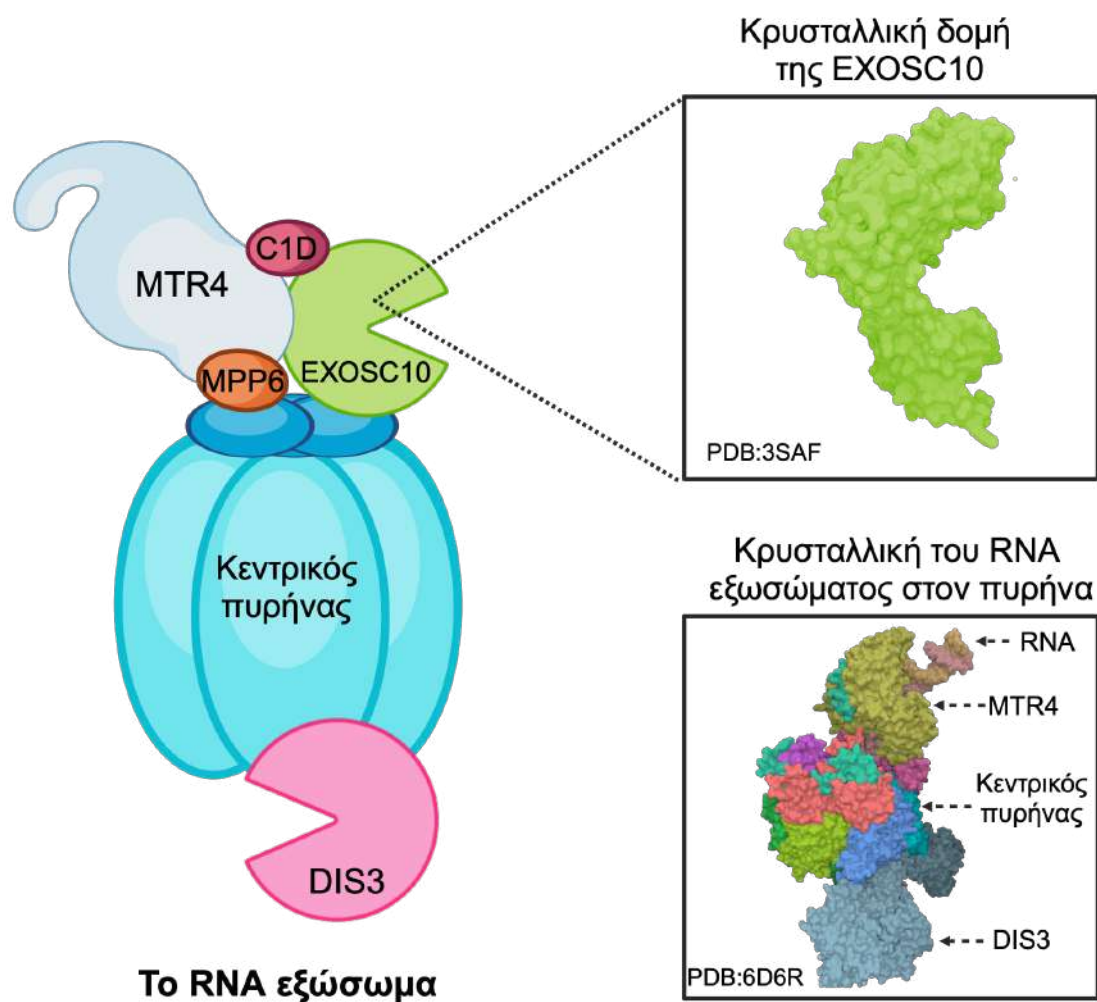
Ο κεντρικός δομικός πυρήνας του RNA εξωσώματος, η δομή του οποίου παρουσιάζεται στην εικόνα 8, αποτελείται από εννιά διακριτές υπομονάδες και στερείται καταλυτικής δράσης (268). Συγκεκριμένα, οι υπομονάδες EXOSC6, EXOSC7, EXOSC4, EXOSC9, EXOSC5 και EXOSC8 σχηματίζουν μέσω των περιοχών PH που διαθέτουν, έναν εξαμερή δακτύλιο. Πάνω στον δακτύλιο σχηματίζεται μία δομή «καπακιού» αποτελούμενη από τις υπομονάδες EXOSC1, EXOSC2 και EXOSC3 (269). Ο δακτύλιος που διαμορφώνεται μετά την στοίχιση των παραπάνω υπομονάδων έχει το κατάλληλο εύρος, ώστε να διαπερνούν μέσα του μονόκλωνα μόρια RNA.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση (πάνω) και κρυσταλλική δομή (κάτω) του κεντρικού δομικού πυρήνα του RNA εξωσώματος που σχηματίζει έναν δακτύλιο, διαμέσου του οποίου μπορεί να περάσουν μονόκλωνα μόρια RNA. Η κρυσταλλική δομή (2NN6) ανακτήθηκε από την βάση δεδομένων PDB. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

Στον πυρήνα, ο κεντρικός δομικός πυρήνας του RNA εξωσώματος συνδέεται με τις 3'-5' εξωριβονουκλεάσες DIS3 και EXOSC10, ενώ στο κυτταρόπλασμα συνδέεται κυρίως με μία άλλη μορφή της DIS3, την DIS3L (Εικόνα 9) (270, 271). Στην καταλυτική υπομονάδα EXOSC10, προσδένονται οι συμπαράγοντες C1D και MPP6, οι οποίοι στρατολογούν στη συνέχεια την ελικάση MTR4 (272). Η MTR4 με τη σειρά της αλληλεπιδρά με άλλους συμπαράγοντες της, προσδίδοντας έτσι την εξειδίκευση στα υποστρώματα του RNA εξωσώματος.

Τρία είναι τα κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συνδέονται με την MTR4. Το πρώτο σύμπλοκο είναι το NEXT (Nuclear Exosome Targeting complex), το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες RBM7 και ZCCHC8 και προσελκύει στο RNA εξώσωμα RNA που αντιστοιχούν σε ιντρόνια μετά την απομάκρυνση τους από pre-mRNA, RNA που προκύπτουν από την μεταγραφή στοιχείων ανοδικά των υποκινητών (PROMoter uPstream Transcripts, PROMTs) ή των ενισχυτών (enhancer RNAs) και άλλα ελαττωματικά στο 3' άκρο RNA του πυρήνα (273, 274). Το δεύτερο σύμπλοκο είναι το PAXT (poly(A) tail exosome targeting complex), το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες PABPN1 και ZFC3H1 και προσελκύει μη κωδικά RNA με εκτεταμένες πέραν του φυσιολογικού poly(A) ουρές (275). Τέλος, το τρίτο σύμπλοκο που αλληλεπιδρά με το RNA εξώσωμα είναι το TRAMP, το οποίο αποτελείται από την πολύ(A)πολυμεράση Trf4/5p και τον παράγοντα ZCCHC7 και αναγνωρίζει ελαττωματικά tRNA, μικρά RNA του πυρήνα και άλλα μη κωδικά RNA (276, 277). Ιδιαίτερα στους πυρηνίσκους, το RNA εξώσωμα μέσω της δράσης της EXOSC10 και της συμμετοχής του συμπλόκου TRAMP συμμετέχει στην επεξεργασία και τελική ωρίμανση των ριβοσωμικών RNA και στην αποικοδόμηση ελαττωματικών πρώιμων rRNA (274). Επιπλέον στόχοι του RNA εξωσώματος είναι mRNA με μικρό χρόνο ημιζωής και ελαττωματικά mRNA. Τα mRNA με μικρό χρόνο ημιζωής περιέχουν στο 3' άκρο τους τα στοιχεία A/U-rich elements, ARE και προσελκύονται στο RNA εξώσωμα μέσω της σύνδεσης στα στοιχεία αυτά ειδικών πρωτεϊνών -AU-RNA binding proteins- και της ελικάσης RHAU (278). Το RNA εξώσωμα στοχεύει, επίσης, ελαττωματικά mRNA που διαθέτουν πρώιμα κωδικόνια λήξης μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης Nonsense-mediated decay (NMD), mRNA που στερούνται κωδικονίου λήξης μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης Non-stop decay (NSD) και mRNA τα οποία προκαλούν την καθυστέρηση του μηχανισμού της μετάφρασης μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης No-go decay (NGD) (279).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του RNA εξωσώματος και των συμπαραγόντων του. Στο κεντρικό δομικό πυρήνα συνδέονται οι καταλυτικές υπομονάδες DIS3 και EXOSC10. Η EXOSC10 με τη σειρά της προσελκύει τους συμπαραγόντες της C1D, MTR4 και MPP6, οι οποίοι διαμεσολαβούν στην τελική αναγνώριση των RNA-υποστρωμάτων. Οι κρυσταλλικές δομές 3SAF για την EXOSC10 και 6D6R για το RNA εξώσωμα ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων PDB. (Δημιουργήθηκε με το Biorender.com)

3.2 Λειτουργικές περιοχές της EXOSC10

Η EXOSC10 διαθέτει τις εξής λειτουργικές περιοχές (280), οι οποίες παρουσιάζονται στην εικόνα 10:

- *PMC2NT*

Η περιοχή polycystin 2 N-terminal PMC2NT βρίσκεται κοντά στο αμινο-τελικό άκρο της EXOSC10 και είναι υπεύθυνη για την σύνδεση της EXOSC10 με τον συμπαράγοντα C1D. Η σύνδεση του C1D στην EXOSC10 δημιουργεί την κατάλληλη επιφάνεια για την πρόσδεση στη συνέχεια της ελικάσης MTR4 (281, 282).

- *EXO*

Η 3'-5' εξωριβονουκλεολυτική δράση της EXOSC10 οφείλεται στην περιοχή EXO. Η EXOSC10 ανήκει στην οικογένεια των νουκλεασών DEDD-Y, οι οποίες παίρνουν το όνομα τους από την ύπαρξη στο ενεργό τους κέντρο, τεσσάρων συντηρημένων καταλοίπων ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος, DEDD, και ενός συντηρημένου κατάλοιπου τυροσίνης (283).

- *HRDC*

Η περιοχή Helicase and RNase D carboxy terminal HRDC είναι μία ρυθμιστική περιοχή τόσο της καταλυτικής δράσης της EXOSC10, όσο και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της κυρίως με το κεντρικό πυρήνα του RNA εξωσώματος (283). Στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχει επίσης και ένα σήμα εντοπισμού στον πυρήνα NLS.



Εικόνα 10: Οι λειτουργικές περιοχές της EXOSC10.

3.3 Οι κυτταρικές λειτουργίες της EXOSC10

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η EXOSC10 μέσω της σύνδεσης της με το RNA εξώσωμα φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό των RNA. Όμως, λίγα είναι μέχρι στιγμής γνωστά για τον ακριβή μηχανισμό δράσης της και την κυτταρική της

λειτουργία. Τα τελευταία χρόνια, μελέτες έχουν αποκαλύψει τον ρόλο της σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες, όπως η επεξεργασία των ριβοσωμικών RNA και η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, καθώς και την σημασία της κατά την εμβρυογένεση.

Μία από τις βασικότερες κυτταρικές λειτουργίες της EXOSC10 στους πυρηνίσκους είναι η επεξεργασία των ριβοσωμικών RNA. Τα ριβοσωμικά RNA μεταγράφονται αρχικά ως ένα κοινό pre-rRNA, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται μία εκτεταμένη διαδικασία «ωρίμανσης», ώστε να προκύψουν τελικά τα ώριμα 18S, 5.8S και 28S rRNA (284). Η EXOSC10 έχει βρεθεί ότι απομακρύνει τις εσωτερικές ενδιάμεσες αλληλουχίες ITS1 και ITS2 από τα πρώιμα 18S και 5.8S rRNA (285-288).

Πέραν από τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, η κυτταρική λειτουργία της EXOSC10 έχει μελετηθεί και κατά την επιδιόρθωση βλαβών του DNA που έχουν να κάνουν με θραύση των δύο αλυσίδων του DNA (DNA double-strand breaks). Υπάρχουν δύο μηχανισμοί επιδιόρθωσης τέτοιων βλαβών, ο ένας είναι μέσω της σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Non homologous end joining, NHEJ) και ο δεύτερος είναι μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (289). Κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό, δημιουργούνται στο σημείο της βλάβης 3' μονόκλωνα άκρα, τα οποία καλύπτονται από την πρωτεΐνη RPA. Η απομάκρυνση της RPA και η σύνδεση της RAD51 οδηγεί τελικά στην εισβολή των αλυσίδων σε ομόλογες αλληλουχίες της αδερφής χρωματίδας και στην επιδιόρθωση έτσι της βλάβης (290). Η EXOSC10 μέσω του RNA εξωσώματος, βρέθηκε ότι στρατολογείται στα σημεία των βλαβών αυτών, ώστε να απομακρύνει μη κωδικά RNA τα οποία προκύπτουν μετά από την ατελή μεταγραφή των μονόκλωνων άκρων και να διευκολύνει έτσι τη σύνδεση των RPA και RAD51, προωθώντας τον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA (291, 292).

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε και ο κρίσιμος ρόλος της EXOSC10 για την εμβρυογένεση των θηλαστικών και τη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, η απενεργοποίηση του γονιδίου της EXOSC10 σε έμβρυα ποντικών οδήγησε σε θνησιμότητα στα πρώτα στάδια, πριν ακόμα το σχηματισμό της βλαστοκύστης (293), ενώ η απουσία της EXOSC10 κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου εμβρύων ποντικών, προκάλεσε την επαγωγή των επιπέδων έκφρασης στόχων του μονοπατιού του p53, οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό θάνατο (294).

Η EXOSC10, πέραν από φυσιολογικές διεργασίες, έχει συσχετιστεί και με την καρκινογένεση. Σε πρόσφατη μεγάλης κλίμακας γενωμική μελέτη σε ασθενείς με 17

διαφορετικούς τύπους καρκίνου σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό, βρέθηκε ότι η EXOSC10 εμφανίζει αυξημένα ποσοστά έκφρασης σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο των όρχεων, του αυχένα και στο μελάνωμα και χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης στο καρκίνο του ήπατος και του θυρεοειδή (295). Μεταγενέστερη μελέτη που εστιάστηκε στο ηπατοκαρκίνωμα, ανέφερε ότι η EXOSC10 υπερεκφράζεται σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ασθενείς που πάσχουν σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα και η αυξημένη αυτή έκφραση συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση και μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης (296). Στην ίδια μελέτη, πειράματα αποσιώπησης της EXOSC10 στις κυτταρικές σειρές HepG2, MHCC97H και Huh-7, αποκάλυψαν την σημασία της για την ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς η απουσία της οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και της κινητικότητας των κυττάρων, καθώς και σε αυξημένη απόπτωση.

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Δημοσιευμένες μελέτες ανίχνευσης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (297, 298) έδειξαν την ομοιοπολική τροποποίηση της εξωριβονουκλεάσης EXOSC10 (μία εκ των καταλυτικών υπομονάδων του RNA εξωσώματος) από την πρωτεΐνη SUMO-1. Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (262), έδειξε για πρώτη φορά πως η σουμοϋλίωση της EXOSC10 ρυθμίζεται (συγκεκριμένα μειώνεται) από τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία).

Απώτερος σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν αφενός η διερεύνηση του ρόλου της σουμοϋλίωσης στη ρύθμιση και λειτουργία της εξωριβονουκλεάσης EXOSC10 και αφετέρου, η αποσαφήνιση της σημασίας της για την κυτταρική απόκριση στην υποξία. Προκειμένου να επιτευχθεί ο παραπάνω σκοπός τέθηκαν οι εξής επιμέρους στόχοι:

-Μελέτη της επίδρασης της υποξίας και της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων HIF στα επίπεδα σουμοϋλίωσης και στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10.

-Αποσαφήνιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης/αποσουμοϋλίωσης και συγκεκριμένα ταυτοποίηση των ενζύμων που πραγματοποιούν τη σύζευξη και απομάκρυνση της SUMO-1 από την EXOSC10 και έλεγχος της επίδρασης της υποξίας σε αυτά.

-Έλεγχος του ρόλου της αποσουμοϋλίωσης της EXOSC10 σε βασικές βιολογικές διαδικασίες των καρκινικών κυττάρων όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η μετανάστευση.

-Διερεύνηση του ρόλου της αποσουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην ρύθμιση της έκφρασης των RNA.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν τα εξής:

- ***pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 WT***

Πρόκειται για τον πλασμιδιακό φορέα *pCDNA 3.1-HA* (Εργ. F. Melchior, ZMBH Γερμανία) ο οποίος φέρει στο 5' άκρο την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον επίτοπο HA (πεπτίδιο YPYDVPDYA που προέρχεται από την πρωτεΐνη Influenza hemagglutinin). Στον παραπάνω φορέα κλωνοποιήθηκε το πλήρες cDNA της EXOSC10 με άκρα BamHI-XbaI (το cDNA αποκτήθηκε από την τράπεζα Gateway Full ORF clones του DKFZ, Χαϊδελβέργη, Γερμανία). Το συγκεκριμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης HA-EXOSC10 σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

- ***pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 K583R / K168R / K201R***

Τα πλασμίδια *pCDNA 3.1-HA EXOSC10 K→R* κατασκευάστηκαν σε προηγούμενη μελέτη (Φιλιπποπούλου X., Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, 2019) και προέκυψαν μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 WT*. Φέρουν μεταλλάξεις αλλαγής λυσίνης σε αργινίνη στις θέσεις K583, K168 και K201. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης HA-EXOSC10 K583R/ K168R/ K201R σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

- ***pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 WT* και *pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 K583R***

Πρόκειται για τον πλασμιδιακό φορέα *pBluescript II SK* (Amersham Biosciences UK Ltd, UK) ο οποίος φέρει κλωνοποιημένο το πλήρες cDNA της EXOSC10 WT ή K583R με άκρα BamHI-XbaI και επιλέχθηκε λόγω της ιδιαίτερης περιοχής πολυσυνδέτη (polylinker) που περιέχει, η οποία φέρει 21 μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, επιτρέποντας την απομόνωσή του ενθέματος από ένα

μεγάλο εύρος περιοριστικών ενδονουκλεασών. Χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο για την τελική κλωνοποίηση του cDNA της EXOSC10 WT ή K583R στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX 4T.1*.

▪ ***pGEX 4T.1-EXOSC10 WT και pGEX 4T.1-EXOSC10 K583R***

Πρόκειται για τον πλασμιδιακό φορέα *pGEX 4T.1* (Amersham Biosciences UK Ltd, UK), ο οποίος φέρει κλωνοποιημένο το πλήρες cDNA της EXOSC10 WT ή K583R με άκρα BamHI-NotI. Ο φορέας αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα. Η έκφραση αυτή γίνεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *tac*, ενώ εντός του φορέα, υπάρχει επίσης το γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί για τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης. Διαθέτει έναν πολυσυνδέτη, ο οποίος στο 5' άκρο του περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και προσδίδει έτσι την ικανότητα έκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών που φέρουν στο αμινο-τελικό τους άκρο τη GST. Χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση και απομόνωση των χιμαιρικών GST-EXOSC10 WT ή K583R από βακτήρια.

▪ ***pGEX 4T.1-USP36 1-420 και pGEX 4T.1-USP36 421-800***

Τα πλασμίδια ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Mushui Dai από το Πανεπιστήμιο του Όρεγκον, ΗΠΑ (68). Φέρουν κλωνοποιημένη την αλληλουχία για την έκφραση των τμημάτων 1-420 και 421-800 της αγρίου τύπου USP36 σε σύντηξη με τον επίτοπο GST. Το τμήμα 1-420 (αναφέρεται και ως λειτουργικό τμήμα) διαθέτει δράση E3 λιγάσης, ενώ το τμήμα 421-800 (αναφέρεται ως μη λειτουργικό) στερείται της ικανότητας αυτής. Χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση και απομόνωση των χιμαιρικών GST-USP36 1-420 και 421-800 από βακτήρια.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Τα πλασμίδια που αναφέρονται στη παρούσα διατριβή, η χρήση και η ανθεκτικότητα τους σε αντιβιοτικά

Όνομα πλασμιδίου	Χρήση	Ανθεκτικότητα	Άκρα
<i>pCDNA 3.1 HA-EXOSC10 WT</i>	Υπερέκφραση της αγρίου τύπου HA-EXOSC10 σε ευκαρυωτικά κύτταρα	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pCDNA 3.1 HA-EXOSC10 K583R</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης HA-EXOSC10 K583R σε ευκαρυωτικά κύτταρα	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pCDNA 3.1 HA-EXOSC10 K168R</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης HA-EXOSC10 K168R σε ευκαρυωτικά κύτταρα	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pCDNA 3.1 HA-EXOSC10 K201R</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης HA-EXOSC10 K201R σε ευκαρυωτικά κύτταρα	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 WT</i>	Αποθηκευτικό πλασμίδιο	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 K583R</i>	Αποθηκευτικό πλασμίδιο	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-XbaI</i>
<i>pGEX 4T.1 EXOSC10 WT</i>	Υπερέκφραση της αγρίου τύπου GST-EXOSC10 σε βακτήρια	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-NotI</i>
<i>pGEX 4T.1 EXOSC10 K583R</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης GST-EXOSC10 K583R σε βακτήρια	Αμπικιλίνη	<i>BamHI-NotI</i>

<i>pGEX 4T.1</i> <i>USP36 1-420</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης <i>GST-USP36 1-420</i> σε βακτήρια	Αμικικιλίνη	-
<i>pGEX 4T.1</i> <i>USP36 421-800</i>	Υπερέκφραση της μεταλλαγμένης <i>GST-USP36 1-800</i> σε βακτήρια	Αμικικιλίνη	-

1.2 Κυτταρικές σειρές

Οι ανθρώπινης προέλευσης κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν οι εξής:

- **HeLa**, αθανатоποιημένα κύτταρα προερχόμενα από αδενοκαρκίνωμα επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (Εργ. F. Melchior, ZMBH Γερμανία)
- **HEK293**, αθανатоποιημένα κύτταρα προερχόμενα από εμβρυικά επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα (Εργ. F. Melchior, ZMBH Γερμανία)
- **HeLa S3** ^{HIF-1α -/ HIF-2α -}, πρόκειται για τον κλώνο S3 των μητρικών κυττάρων HeLa στον οποίο δεν εκφράζεται ο HIF-2α και έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο για την έκφραση του HIF-1α με το σύστημα CRISPR/Cas9. Αποτέλεσαν ευγενική παραχώρηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Ηλία Μυλωνή στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **HeLa Flp-In-EXOSC10 σειρές**, κατασκευάστηκαν στο Εργαστήριο της Dr. Katherine Bohnsack από την υποψήφια διδάκτορα Chairini Thome στο Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν. Ως μητρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα HeLa Flp-In T-Rex (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), η οποία διαμολύνθηκε με τα πλασμίδια που φέρουν το cDNA της EXOSC10 pcDNA5-2xFlag-His6-siinsEXOSC10 (WT or K583R) ή pcDNA5-2xFlag-His6 (πλασμιδιακός φορέας χωρίς ένθεμα) για την δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν επαγόμενα την αγρίου τύπου και την μεταλλαγμένη μορφή της EXOSC10 που φέρει τη μετάλλαξη K583, σε

σύντηξη με τον επίτοπο FLAG. Αναλυτικότερα, οι κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν από την μητρική σειρά **HeLa Flp-In**, ήταν οι εξής:

- **HeLa Flp-In FLAG**: Χρησιμοποιήθηκε ως κοντρόλ σειρά και δημιουργήθηκε από την μητρική σειρά HeLa Flp-In μετά από διαμόλυνση της με το πλασμίδιο pcDNA5-2xFlag-His6 που φέρει την αλληλουχία για την έκφραση του επιτόπου FLAG.

- **HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT**: Δημιουργήθηκε από την μητρική σειρά HeLa Flp-In μετά από διαμόλυνση της με το πλασμίδιο pcDNA5-2xFlag-His6-siinsEXOSC10 WT που φέρει την αλληλουχία για την έκφραση της FLAG-EXOSC10 WT.

- **HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R**: Δημιουργήθηκε από την μητρική σειρά HeLa Flp-In μετά από διαμόλυνση της με το πλασμίδιο pcDNA5-2xFlag-His6-siinsEXOSC10 K583R που φέρει την αλληλουχία για την έκφραση της FLAG-EXOSC10 K583R.

1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ευκαρυωτικών κυττάρων

- **Πλήρες θρεπτικό DMEM** (BioSera, Nuaille, France)

Όλες οι ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές στη παρούσα διατριβή καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, LM-D1111). Το θρεπτικό αυτό είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Πριν τη χρήση του, εμπλουτίστηκε με 100% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) σε τελική συγκέντρωση 10% και 100 U/ml μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης.

- **Βόειος εμβρυϊκός ορός (Fetal Serum Bovine, FBS 100%)** (Gibco, Billings, Montana, USA)

Απομονώνεται από έμβρυα βοοειδών και αποτελεί πηγή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και πρωτεΐνες, που προωθούν την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό των καλλιεργούμενων κυττάρων.

- **Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης** (LM-A4118, BioSera, Nuaille, France)

Προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 100 U/ml για την αποφυγή μικροβιακών επιμολύνσεων των καλλιεργούμενων κυτταρικών σειρών.

- **DMEM -FBS/- αντιβιοτικά**

Πρόκειται για θρεπτικό DMEM χωρίς την προσθήκη ορού και αντιβιοτικών.

- **DMEM +5%FBS**

Το θρεπτικό μέσο αυτό προκύπτει μετά την προσθήκη FBS 100% σε DMEM -FBS/- αντιβιοτικά σε τελική συγκέντρωση του FBS στο διάλυμα 5%.

- **OptiMEM** (Gibco, Billings, Montana, USA)

Αποτελεί ένα εξειδικευμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων το οποίο συνίσταται για χρήση σε πειράματα διαμόλυνσης με τη χρήση λιπιδικής φύσης αντιδραστηρίων.

- **Διάλυμα κρυοσυντήρησης**

Το διάλυμα κρυοσυντήρησης των κυττάρων προκύπτει μετά την προσθήκη DMSO σε τελική συγκέντρωση 10% σε FBS 100%.

- **Διάλυμα Τρυψίνης 0,2 %** (BioSera, Nuaille, France)

Όλα τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή καλλιεργούνται προσκολλόμενα, δημιουργώντας μονοστοιβάδα στην επιφάνεια του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας. Η αποκόλληση τους γίνεται με ενζυμική παρέμβαση με τη χρήση διαλύματος της πρωτεάσης τρυψίνης 0,2 %.

1.4 Βακτηριακά στελέχη

Τα μικροβιακά στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν τα εξής:

- **TOP10** (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση και απομόνωση πλασμιδίων στις διαδικασίες κλωνοποίησης. Διαθέτει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.

- **BL21 CodonPlus-RIL strain 3** (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-EXOSC10 και GST-USP36. Είναι γενετικά τροποποιημένο ώστε να περιέχει πολλαπλά αντίγραφα των υπεύθυνων γονιδίων για την επαρκή έκφραση των σπάνιων στα βακτήρια tRNA που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια για τα αμινοξέα αργινίνη (R), ισολευκίνη (I) και λευκίνη (L). Διαθέτει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη.

1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων

Τα παρακάτω θρεπτικά μέσα περιέχουν συστατικά τα οποία καλύπτουν τις απαιτούμενες ανάγκες πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

- **Θρεπτικό μέσο TYM**

Σύσταση: 2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.1 M NaCl, 10 mM MgSO₄ (διαλυμένα σε ddH₂O). Πριν τη χρήση του αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο. Χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία δεκτικών *E.coli Top10* ή *BL21 RIL*.

- **Θρεπτικό μέσο Luria-Bertani broth (LB)**

Το θρεπτικό αυτό μέσο είναι το πιο διαδεδομένο για την υγρή ή στερεή καλλιέργεια στελεχών *E.coli*.

Σύσταση: 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 gr/L NaCl (διαλυμένα σε ddH₂O). Πριν τη χρήση του αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο. Για την δημιουργία στερεού θρεπτικού LB προστέθηκε άγαρ σε αναλογία 2%. Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια δεκτικών *E.coli Top10* ή *BL21 RIL*.

- **2x YT**

Το θρεπτικό αυτό είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε Yeast Extract σε σύγκριση με το LB και προτιμάται για την μακράς διάρκειας ή μεγάλης βακτηριακής πυκνότητας καλλιέργεια.

Σύσταση: 1.6% Tryptone, 1% Yeast Extract, 5 gr/L NaCl (διαλυμένα σε ddH₂O). Πριν τη χρήση του αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο. Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των *E.coli BL21 RIL*.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- **Αμπικιλλίνη** (100 µg/ml, διαλυμένη σε ddH₂O)
- **Στρεπτομυκίνη** (60 µg/ml, διαλυμένη σε ddH₂O)
- **Χλωραμφενικόλη** (25 µg/ml, διαλυμένη σε αιθανόλη 100%)

1.6 Αντιδραστήρια

Στη διαδικασία κλωνοποίησης του cDNA της EXOSC10 σε πλασμιδιακούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ένζυμα και αντιδραστήρια:

- **KAPA Taq DNA Polymerase** (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)
- **KAPA Taq buffer 1x** (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)
- **dNTP mix 0.2 mM** (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)
- **BamHI-HF** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **XbaI** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **Not-I** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **EcoRV** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **XhoI** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **NcoI** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **SacI** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **CutSmart® buffer 1x** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **T4 DNA ligase** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- **T4 DNA ligase Reaction buffer 1x** (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το εξής kit:

- **NucleoSpin Gel and PCR Clean-up** (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το εξής kit:

- **NucleoSpin Plasmid** (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

Για την διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- **PEI (Polyethilenamine)** (ABM Industries)
- **Lipofectamine RNAimax** (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες για την επίδραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα, οι οποίες παραλήφθηκαν από την εταιρία Sigma – Aldrich (St. Louis, USA) και ήταν οι εξής:

- **MG132:** Είναι μία συνθετική τρι-πεπτιδική αλδεΐδη, η οποία δρα ως αναστολέας του πρωτεασώματος και χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη της ουβικιτίνωσης (διαλυμένο σε DMSO). Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10 μ M.

- **Κυκλοεξιμίδιο:** Είναι ένα αντιμυκητιακό αντιβιοτικό το οποίο φυσικά συναντάται στα βακτήρια του γένους *Streptomyces*. Η μοριακή του δράση έγκειται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω της σύνδεσής του με το 80S ριβόσωμα και επιλέγεται σε μελέτες του χρόνου ημιζωής πρωτεϊνών (διαλυμένο σε DMSO). Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 25 μ g/ml.

- **Ραπαμυκίνη:** Πρόκειται για μία λακτόνη, η οποία φυσικά προέρχεται από τα βακτήρια *Streptomyces hygroscopicus* και έχει χαρακτηριστεί για τη δράση της ως αναστολέας του mTORC1 (διαλυμένη σε DMSO). Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 2 μ M.

- **Δοξυκυκλίνη:** Είναι μία τετρακυκλίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή των κυτταρικών σειρών HeLa Flp-In. Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 1 µg/mL.

- **Ετοποσίδιο:** Δρα ως αναστολέας της τοποισομεράσης II προκαλώντας έμμεσα την ενεργοποίηση της απόπτωσης (διαλυμένη σε DMSO). Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 75µM.

Για την επαγωγή της έκφρασης και τον καθαρισμό των χιμαιρικών GST πρωτεϊνών στα βακτηριακά στελέχη BL21 RIL χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- **Ισοπροπυλ β-d-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG)** (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) σε συγκέντρωση 1 mM για τις GST-EXOSC10 και 0.5 mM για τις GST-USP36 (διαλυμένο σε ddH₂O).

- **Ανηγμένη L-γλουταθειόνη** (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) σε συγκέντρωση 10 mM (διαλυμένη σε Tris 25mM pH 8).

Για την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Immobilon Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

Για την απομόνωση του ολικού RNA, την κατασκευή cDNA και την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- **NucleoZOL** (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- **PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)** (TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan)
- **KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix** (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)

Για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων σε καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- **Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System** (TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan)
- **Caspase-Glo 3/7 Assay System** (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

1.7 Χημικά

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma - Aldrich (St. Louis, USA) και AppliChem (Germany).

1.8 Στήλες χρωματογραφίας

Οι στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν οι εξής:

- **Σφαιρίδια αгарόξης A ή G** (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA)
- **Σφαιρίδια αгарόξης G – SUMO-1:** Πρόκειται για σφαιρίδια αгарόξης G στα οποία έχει συνδεθεί ομοιοπολικά μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SUMO-1 (299). Τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυττάρων.
- **Σφαιρίδια αгарόξης – γλουταθειόνης (GSH)** (Macherey-Nagel, Düren, Germany): Πρόκειται για σφαιρίδια αгарόξης στα οποία έχει καθηλωθεί η γλουταθειόνη (GSH) μέσω του ατόμου θείου που διαθέτει. Χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST από εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων.

1.9 Εκκινητές και Small Interference RNA (siRNA)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή, καθώς και η ακριβής εφαρμογή τους. Οι εκκινητές για τα πειράματα κλωνοποίησης παραλήφθηκαν από την εταιρία Eurofins, ενώ τα siRNA για την αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών και οι εκκινητές για την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου παραλήφθηκαν από τις εταιρείες QIAGEN (Venlo, The Netherlands) και Sigma (St. Louis, USA).

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν και η εφαρμογή τους

Ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία	Εφαρμογή
<i>EXOSC10 For BamHI</i>	<i>5'-TCAGGATCCATGGCGCCAC-3'</i>	<i>Κλωνοποίηση του cDNA της EXOSC10 στον pBluescript II SK</i>

<i>EXOSC10 Rev XbaI</i>	5'-CTCTAGATCATCTCTGTGGCC-3'	Κλωνοποίηση του cDNA της EXOSC10 στον pBluescript II SK
<i>AllStars Negative Control siRNA</i>	<i>Proprietary</i>	Αρνητικό κοντρόλ σε πειράματα αποσιώπησης
<i>siRNA έναντι της EXOSC10 #1</i>	5'-GAAGGCAGCUGAGCAAACATT-3'	Αποσιώπηση της EXOSC10
<i>siRNA έναντι της EXOSC10 #2</i>	5'-UGAGCAGAGUAAUGCAGUATT-3'	Αποσιώπηση της EXOSC10
<i>siRNA έναντι της EXOSC10 #3</i>	5'-AGAUGAAAGUUACGGAUAUTT-3'	Αποσιώπηση της EXOSC10
<i>siRNA έναντι της SENP3</i>	5'-CAAUAAGGAGCUACUGCUATT-3'	Αποσιώπηση της SENP3
<i>siRNA έναντι της USP36 (SI00138082)</i>	5'-CAAGAGCGTCTCGGACACCTA-3'	Αποσιώπηση της USP36
<i>siRNA έναντι της p14 ARF (SI02664403)</i>	5'-TACCGTAAATGTCCATTATA-3'	Αποσιώπηση της p14ARF
<i>siRNA έναντι του HIF-1α</i>	5'-AGGAAGAACTATGAACATAAA-3'	Αποσιώπηση του HIF-1α
<i>siRNA έναντι του HIF-2α</i>	5'-CCCGGATAGACTTATTGCCAA-3'	Αποσιώπηση του HIF-2α
<i>CA9 For</i>	5'-TGGCTGCTGGTGACATCCTA-3'	PCR πραγματικού χρόνου
<i>CA9 Rev</i>	5'-TTGGTTCCCCTTCTGTGCTG-3'	PCR πραγματικού χρόνου
<i>SENP2 For</i>	5'-CAGTTCTCAAAGAAGTCAGATG-3'	PCR πραγματικού χρόνου

SENP2 Rev	5'-GTTTTGACTCCGTGATTTTG-3'	PCR πραγματικού χρόνου
FOLR1 For	5'-GAGGTTCTATGCTGCAGCCA-3'	PCR πραγματικού χρόνου
FOLR1 Rev	5'-CATTAGGGCCAGGCTAAGCA-3'	PCR πραγματικού χρόνου
RPLP1 For	5'-AAGCAGCCGGTGTAATGTTGAG-3'	PCR πραγματικού χρόνου
RPLP1 Rev	5'-CATTGCAGATGAGGCTCCCAATGT-3'	PCR πραγματικού χρόνου

1.10 Αντισώματα

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται λεπτομερώς όλα τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η αραίωση τους για κάθε εφαρμογή (ανοσοαποτύπωση κατά Western: WB, ανοσοφθορισμός: IF) και η προέλευση τους.

Πίνακας 4: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, η αραίωση τους σε κάθε εφαρμογή και η προέλευσή τους

Αντίσωμα	Αραίωση	Προέλευση
<i>anti-EXOSC10 (ab50558)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	WB: 1/2500, IF: 1/500	<i>Abcam</i>
<i>anti- EXOSC10 (B-8: sc-374595)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	WB: 1/1000, IF: 1/250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>anti-UBF (F-9:SC-13125)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	WB: 1/1000, IF: 1/500	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

<i>anti-USP36 (14783-1-AP)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/1000,</i> <i>IF: 1/250</i>	<i>Proteintech</i>
<i>anti-USP36 (68165-1-Ig)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/1000</i>	<i>Proteintech</i>
<i>anti-Phospho-p70 S6 Kinase</i> <i>(Thr389) (108D2)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/1000</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti-p14 ARF (E3X6D)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/500</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti- Fibrillarin (C13C3)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/1000,</i> <i>IF: 1/250</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti- SENP3 (D20A10)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/3000,</i> <i>IF: 1/500</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti-HA-tag (C29F4)</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/5000</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti-β-Tubulin (D3U1W)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/10000</i>	<i>Cell Signaling</i>
<i>anti-NPM1 (MAB937)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/1000,</i> <i>IF: 1/500</i>	<i>Merck Millipore</i>
<i>anti- HIF-1α</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB 1/500,</i> <i>IF: 1/200</i>	<i>(300)</i>
<i>anti-HIF-1α (54/HIF1α 610959)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/5000,</i> <i>IF: 1/100</i>	<i>BD Transduction</i> <i>Laboratories</i>

<i>anti-HIF-2α (NB100-122)</i> <i>πολυκλωνικό – κουνέλι</i>	<i>WB: 1/2000</i>	<i>Novus Europe</i>
<i>M2 clone anti-Flag-tag (F1804)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/2500,</i> <i>IF:1/500</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>anti-SUMO-1</i> <i>πολυκλωνικό - κουνέλι</i>	<i>WB: 1/1000</i>	<i>Ευγενική χορηγία της Καθ.</i> <i>Melchior Frauke</i> <i>(ZMBH, Germany)</i>
<i>anti-SENPI (C-12)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/1000</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>anti-Ubiquitin (F-11)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/1000</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>anti-phosphoserine</i> <i>(Clone 19/pSer, 612546)</i> <i>μονοκλωνικό - ποντίκι</i>	<i>WB: 1/500</i>	<i>BD Transduction</i> <i>Laboratories</i>

Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πρώτων αντισωμάτων στις μεθόδους της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και του έμμεσου ανοσοφθορισμού παραλήφθηκαν από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA) και Cell Signalling (Danvers, MA, USA) και ήταν τα εξής:

Αντισώματα που φέρουν συζευγμένο το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP) και χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western:

- **Secondary antibody anti-rabbit IgG** (αραίωση 1/5000)
- **Secondary antibody anti-mouse IgG** (αραίωση 1/5000)

Αντισώματα που φέρουν συζευγμένα φθοροχρώματα και χρησιμοποιήθηκαν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό:

- **Secondary antibody anti-rabbit IgG Alexa 488** (αραίωση 1/1000)
- **Secondary antibody anti-mouse IgG Alexa 594** (αραίωση 1/1000)

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τεχνικές Μοριακής βιολογίας

Τα πλασμίδια αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας, καθώς μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά ώστε να φέρουν γονίδια για την υπερέκφραση εξωγενών πρωτεϊνών σε βακτηριακά ή ευκαρυωτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, είναι δίκλωνα, κυκλικά μόρια DNA τα οποία συναντώνται φυσιολογικά στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, με κύρια τα βακτήρια. Βρίσκονται σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα ανά κύτταρο και έχουν τη δυνατότητα να αντιγράφονται και να εκφράζονται αυτόνομα από το κύριο μόριο DNA αλλά και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Φέρουν γονίδια τα οποία προσδίδουν πλεονέκτημα στον οργανισμό που τα διαθέτει, όπως για παράδειγμα ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ή την ικανότητα μεταβολισμού συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών. Τα πλασμίδια περιέχουν αλληλουχίες, οι οποίες αναγνωρίζονται και τέμνονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (δημιουργώντας «άκρα») στις οποίες μπορεί να ενσωματωθεί ένα διαφορετικό τμήμα DNA το οποίο έχει επεξεργασθεί με τον ίδιο τρόπο. Η διαδικασία της ένθεσης ενός γονιδίου σε έναν πλασμιδιακό φορέα, η εισαγωγή και ο πολλαπλασιασμός του σε βακτήρια ονομάζεται **πλασμιδιακή κλωνοποίηση**. Για την κατασκευή πλασμιδίων που φέρουν κλωνοποιημένες αλληλουχίες για την έκφραση μορφών της EXOSC10 σε βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι.

2.1.1 Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR). Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται με τη δράση θερμοανθεκτικών πολυμερασών του DNA και την ύπαρξη εκκινητών (συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων DNA) που προσδένονται στην αρχή μίας αλληλουχίας και την αντιγράφουν. Αναλυτικότερα, κατά την PCR επαναλαμβάνονται για πολλαπλούς κύκλους τα παρακάτω βήματα:

⇒ **Αποδιάταξη του DNA:** Η θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες (94 – 98 °C) οδηγεί στον διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA,

⇒ **Υβριδισμός εκκινητών:** Κατά το στάδιο αυτό η θερμοκρασία ελαττώνεται (50 - 65 °C) και οι εκκινητές προσδένονται με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας στο μονόκλωνο DNA,

⇒ **Επιμήκυνση:** Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 - 75 °C και η DNA πολυμεράση δρα προσθέτοντας νουκλεοτίδια συμπληρωματικά στο μονόκλωνο DNA με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του.

Στη παρούσα διατριβή, ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA (cDNA) που κωδικοποιούν για τις διάφορες μορφές της EXOSC10 (αγρίου τύπου WT και μορφή που φέρει τη μετάλλαξη K583R), χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα πλασμίδια *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 WT* και *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 K583R* αντίστοιχα και τους κατάλληλους εκκινητές (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.9 Εκκινητές). Για την ενίσχυση αυτή επιλέχθηκε η υψηλής πιστότητας KAPA Taq πολυμεράση του DNA (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Τα συστατικά των αντιδράσεων της PCR και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Οι τελικές ποσότητες/συγκεντρώσεις των συστατικών και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στις αντιδράσεις PCR

<i>Αντίδραση PCR</i>	<i>Συνθήκες PCR</i>
<i>DNA – μήτρα: 50 ng</i> <i>Εκκινητές: 10 μM EXOSC10 For BamHI</i> <i>10 μM EXOSC10 Rev XbaI</i> <i>Μίγμα νουκλεοτιδίων: 10 mM</i> <i>KAPA Taq buffer: 1x</i> <i>KAPA Taq DNA Polymerase: 0.5 U</i> <i>+ Αποστειρωμένο ddH₂O έως όπου ο</i> <i>τελικός όγκος φτάσει τα 25μl</i>	<i>Αρχική αποδιάταξη : 95 °C, 5 λεπτά</i> <i>x 35 κύκλοι</i> <i>Αποδιάταξη: 98 °C, 30 sec</i> <i>Υβριδισμός εκκινητών: 57 °C, 50 sec</i> <i>Επιμήκυνση: 72 °C, 2.5 λεπτά</i> <i>Τελική επιμήκυνση: 72 °C, 5 λεπτά</i>

2.1.2 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους διαχωρισμού φορτισμένων μορίων, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA εισάγονται εντός ενός στερεού πορώδους υποστρώματος (αναφέρεται ως πηκτή) στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Αναλυτικά, τα στάδια της ηλεκτροφόρησης του DNA και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι τα εξής:

⇒ **Προετοιμασία δειγμάτων DNA:** Στα δείγματα DNA προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης. Το διάλυμα αυτό περιέχει γλυκερόλη και μίγμα χρωστικών ουσιών για την εύκολη εισαγωγή και παρακολούθηση των δειγμάτων στην πηκτή.

⇒ **Προετοιμασία πηκτής αγαρόζης:** Η πηκτή που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση του DNA αποτελείται από αγαρόζη, έναν πολυσακχαρίτη ο οποίος παίρνει την μορφή γέλης σε θερμοκρασίες κάτω των ~ 50 °C, δημιουργώντας ένα πορώδες πλέγμα μέσα από στο οποίο μπορούν να κινηθούν τα μόρια του DNA. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος του προς ανάλυση DNA και κυμαίνεται από 0.7 % (διαχωρισμός μεγάλων μορίων 5-10 kb) σε 2 % (διαχωρισμός μικρών μορίων 0.2-1 kb). Απαραίτητο βήμα για την τελική οπτικοποίηση είναι η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στη πηκτή, το οποίο παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και φθορίζει μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (302-366 nm).

⇒ **Διαχωρισμός δειγμάτων στη πηκτή αγαρόζης:** Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μετά από εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE και της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα της. Τα φορτισμένα μόρια του DNA λόγω του αρνητικού τους φορτίου μετακινούνται εντός της πηκτής από το αρνητικό ηλεκτρόδιο προς το θετικό. Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μέγεθος τους. Όσο μεγαλύτερα είναι, τόσο δυσκολότερα μετακινούνται εντός των πόρων της πηκτής, άρα καλύπτουν μικρότερη απόσταση από το σημείο φόρτωσης. Η οπτικοποίηση του DNA γίνεται μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Πειραματική διαδικασία

25 μl από τα προϊόντα της PCR ή 500 ng πλασμιδίου αναμείχθηκαν με ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (Loading buffer, 1x: 0.04% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.04% κυανό του ξυλενίου, 5% γλυκερόλη, 10mM EDTA) σε τελική συγκέντρωση 1x. Παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 2 % : 2 gr αγαρόζης διαλύθηκαν σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA) και θερμάνθηκαν στα μικροκύματα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Έπειτα, έγινε προσθήκη 10 μl διαλύματος EtBr 10 mg/ml και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο, έως ότου στερεοποιηθεί. Η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις θέσεις φόρτωσης και

ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 20 λεπτά σε σταθερή τάση 120 V. Η οπτικοποίηση του DNA έγινε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία με τη χρήση του οργάνου Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System (Uvitec Cambridge, Cambridge, UK).

2.1.3 Απομόνωση και καθαρισμός των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Μετά την ολοκλήρωση της PCR και πριν την περαιτέρω χρήση τους, οι αντιδράσεις της PCR υπέστησαν ένα επιπλέον στάδιο «καθαρισμού» με σκοπό το διαχωρισμό του προϊόντος τους από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης. Ο διαχωρισμός γίνεται με την απομόνωση των προϊόντων της PCR μετά από την ηλεκτροφόρηση τους από πηκτή αγαρόζης και τον καθαρισμό τους μέσω της χρήσης στηλών που φέρουν μεμβράνη πυριτίου (silica). Ο καθαρισμός στηρίζεται στην ικανότητα ισχυρής δέσμευσης του DNA στην μεμβράνη αυτή παρουσία χαοτροπικών αλάτων.

Πειραματική διαδικασία

25 μl αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Η ζώνη που αντιστοιχούσε στο επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπηκε προσεκτικά από τη πηκτή και καθαρίστηκε με τη χρήση του εμπορικού kit «NucleoSpin Gel and PCR Clean-up» (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Συνοπτικά, στο κομμάτι της πηκτής προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος Binding Buffer NTI και θερμάνθηκε ώστε να ρευστοποιηθεί η αγαρόζη. Το μίγμα αγαρόζης-DNA μεταφέρθηκε στη στήλη πυριτίου και φυγοκεντρήθηκε. Η στήλη εκπλύθηκε με το διάλυμα αιθανόλης Wash Buffer NT3 και το δεσμευμένο DNA εκλούστηκε σε 20 μl ελαφρώς αλκαλικού διαλύματος χαμηλής αλατότητας Elution Buffer NE. Η συγκέντρωση του απομονωμένου τμήματος DNA προσδιορίστηκε μετά από μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm με το φασματοφωτόμετρο Nano Drop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

2.1.4 Πέψεις τμημάτων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (θέσεις αναγνώρισης) στο DNA και το πέπτουν σε μικρότερα τμήματα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, έγινε χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών για:

⇒ την δημιουργία συμπληρωματικών «άκρων» μεταξύ των προϊόντων της PCR (αντιστοιχούν στις μορφές του cDNA για την αγρίου τύπου EXOSC10 WT και για αυτή που φέρει τη μετάλλαξη K583R) και των πλασμιδιακών φορέων *pBLUESCRIPT II SK* και *pGEX 4T.1* στους οποίους ενσωματώθηκαν (πέψεις κλωνοποίησης)

⇒ την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης του γονιδίου της EXOSC10, στους φορείς αυτούς (διαγνωστικές πέψεις).

Πειραματική διαδικασία

⇒ Για την ένθεση του γονιδίου της EXOSC10 στον πλασμιδιακό φορέα *pBLUESCRIPT II SK*:

1 µg του πλασμιδιακού φορέα *pBLUESCRIPT II SK* και 250 ng cDNA της EXOSC10 (καθαρού PCR προϊόντος μετά από ηλεκτροφόρηση DNA) επωάστηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις για 3 ώρες στους 37 °C με 1 Unit των ενδονουκλεασών **BamHI** και **XbaI** σε CutSmart buffer 1x (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για τις διαγνωστικές πέψεις που επιβεβαίωσαν την επιτυχή κατασκευή των πλασμιδίων *pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 WT* και *pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 K583R*:

1 µg πλασμιδίου επωάστηκε για 1 ώρα στους 37 °C με 1 Unit των ενδονουκλεασών που αναφέρονται στους παρακάτω 3 συνδυασμών:

- **BamHI – NotI**
- **XhoI**
- **NcoI – SacI**

⇒ Για την ένθεση του γονιδίου της EXOSC10 στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX 4T.1*:

1 µg του πλασμιδιακού φορέα *pGEX 4T.1* και 1 µg του πλασμιδίου *pBLUESCRIPT II SK EXOSC10 (WT ή K583R)* επωάστηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις για 3 ώρες στους 37 °C με 1 Unit των ενδονουκλεασών **BamHI** και **NotI** σε CutSmart buffer 1x (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για τις διαγνωστικές πέψεις που επιβεβαίωσαν την επιτυχή κατασκευή των πλασμιδίων *pGEX 4T.1 EXOSC10 WT* και *pGEX 4T.1 EXOSC10 K583R*:

1 µg πλασμιδίου επώαστηκε για 1 ώρα στους 37 °C με 1 Unit των ενδονουκλεασών που αναφέρονται στους παρακάτω 3 συνδυασμών:

- **BamHI - NotI**
- **BamHI - XhoI**
- **EcoRV – XhoI**

Οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 6, ενώ τα συστατικά των αντιδράσεων πέψης και οι ποσότητες τους στον πίνακα 7.

Πίνακας 6: Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν και οι θέσεις αναγνώρισης τους. Με τη κάθετο (|) σημαίνεται το σημείο τομής του ενζύμου.

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Θέση αναγνώρισης
<i>BamHI</i>	5'...G GATCC...3' 3'...CCTAG G...5'
<i>XbaI</i>	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC T...5'
<i>NotI</i>	5'...GC GGCCGC ...3' 3'...CGCCGG CG...5'
<i>XhoI</i>	5'...C TCGAG...3' 3'...GAGCT C...5'
<i>NcoI</i>	5'...C CATGG...3' 3'...GGTAC C...5'
<i>SacI</i>	5'...GAGCT C...3' 3'...C TCGAG...5'
<i>EcoRV</i>	5'...GAT ATC ...3' 3'...CTA TAG...5'

Πίνακας 7: Οι συγκεντρώσεις/ ποσότητες των συστατικών των αντιδράσεων πέψης

Συστατικά αντίδρασης πέψης DNA	Ποσότητα/Συγκέντρωση
<i>DNA</i>	<i>1 μg πλασμιδίου ή 250 ng cDNA</i>
<i>Ένζυμο</i>	<i>1 Unit</i>
<i>CutSmart® buffer</i>	<i>1x</i>

2.1.5 Ενσωμάτωση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς - Αντίδραση λιγάσης

Η τελική ενσωμάτωση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA και του πλασμιδιακού φορέα στα οποία, μετά από κατεργασία με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, έχουν δημιουργηθεί συμπληρωματικά άκρα πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης λιγάσης. Συγκεκριμένα, η λιγάση του DNA που χρησιμοποιείται προέρχεται από τον βακτηριοφάγο T4 (ονομάζεται T4 DNA λιγάση) και καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των συμπληρωματικών 5' φωσφορικών και των 3' υδροξυλικών άκρων δίκλωνων μορίων DNA.

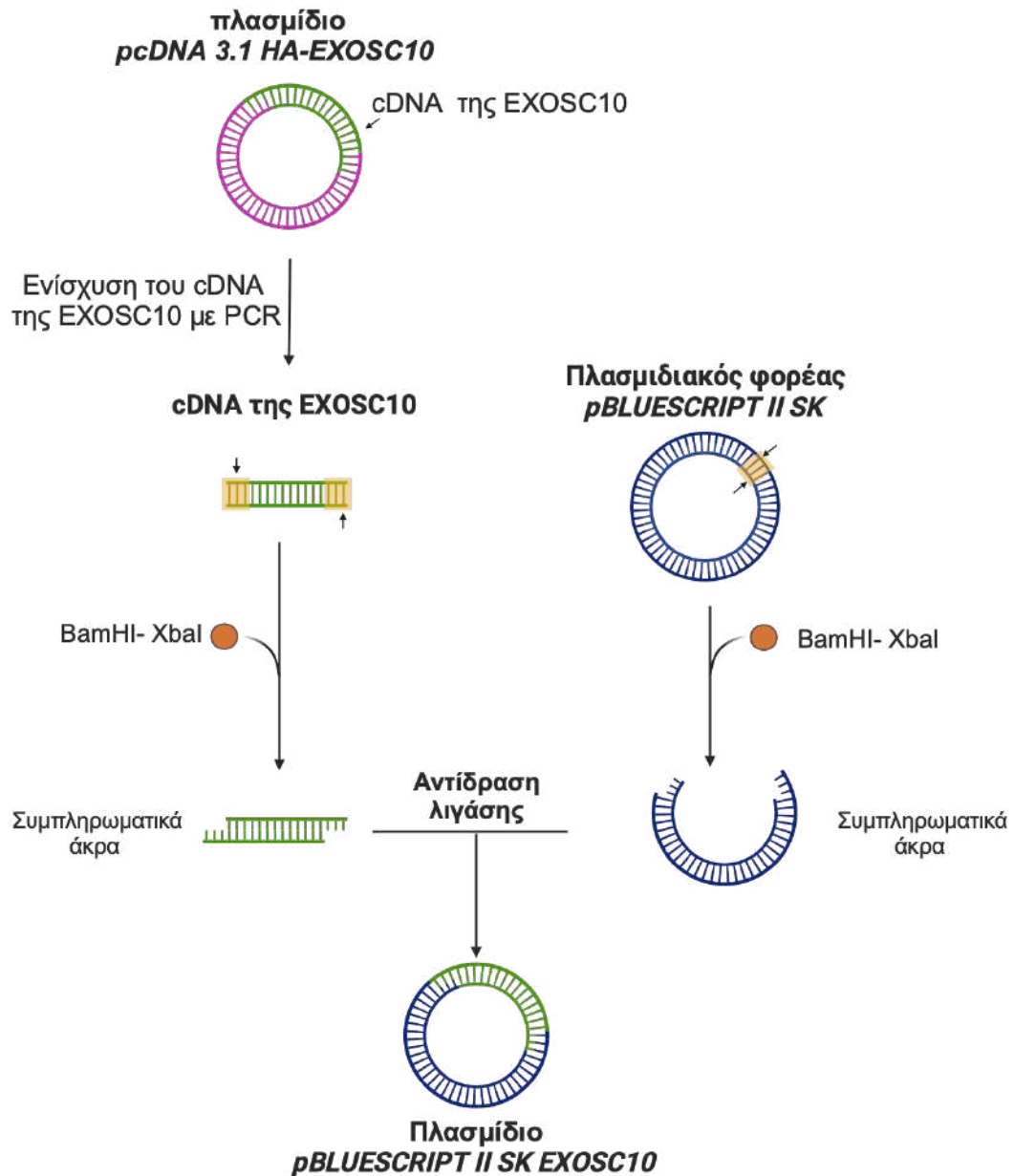
Πειραματική διαδικασία

Για την κατασκευή των πλασμιδίων *pBLUESCRIPT II SK EXOSC10* και *pGEX 4T.1 EXOSC10* δημιουργήθηκαν αντιδράσεις λιγάσης που περιείχαν σε αναλογία 1 (φορέας) :6 (ένθεμα) τους πλασμιδιακούς φορείς *pGEX 4T.1* ή *pBLUESCRIPT II SK* και το cDNA της EXOSC10 παρουσία του ενζύμου T4 DNA λιγάσης (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Οι αντιδράσεις αυτές επώαστηκαν για 16 ώρες στους 16 °C. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8) παρουσιάζονται αναλυτικά τα συστατικά των αντιδράσεων λιγάσης και οι τελικές τους συγκεντρώσεις/ποσότητες.

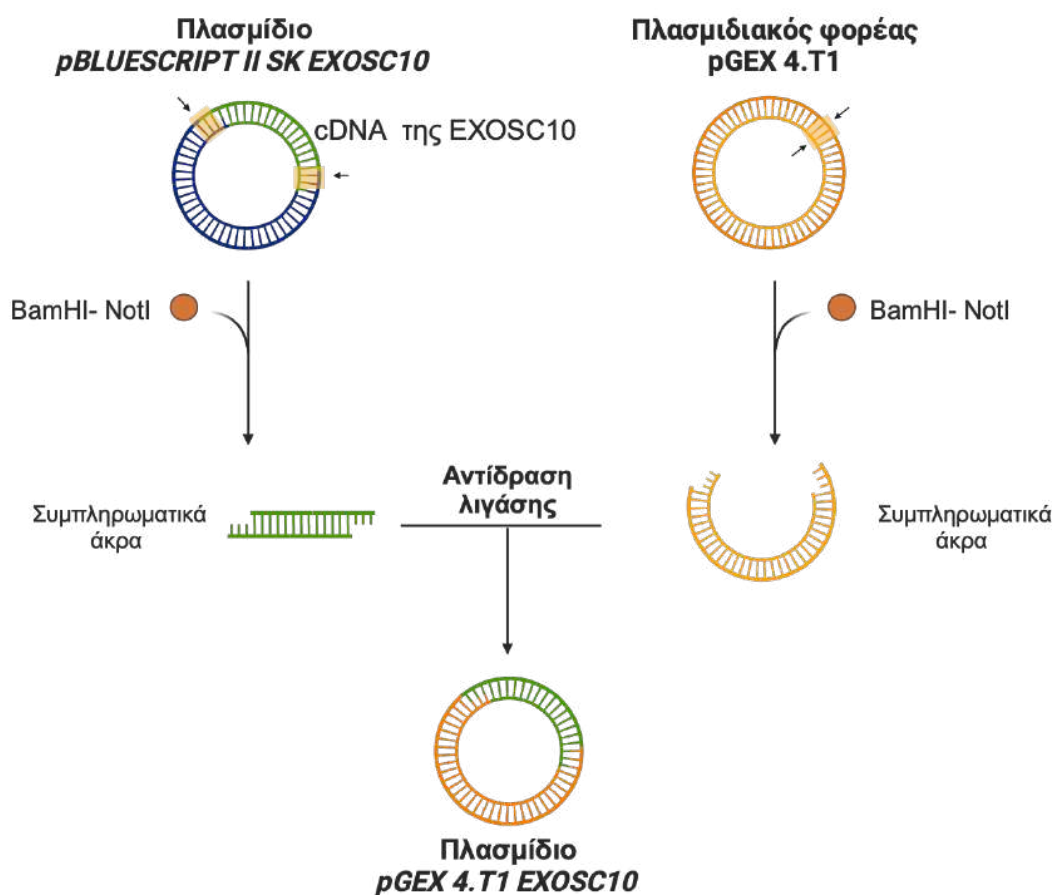
Πίνακας 8: Οι συγκεντρώσεις/ ποσότητες των συστατικών των αντιδράσεων πέψης

Συστατικά αντίδρασης λιγάσης	Ποσότητα/Συγκέντρωση
<i>Ένθεμα</i>	<i>150 ng</i>
<i>Πλασμιδιακός φορέας</i>	<i>25 ng</i>
<i>Ένζυμο T4 DNA λιγάση</i>	<i>1 Unit</i>
<i>T4 DNA ligase Reaction buffer</i>	<i>1x</i>

Στα σχεδιαγράμματα των εικόνων 11 και 12, παρουσιάζεται η διαδικασία της κλωνοποίησης του cDNA της EXOSC10 στους πλασμιδιακούς φορείς *pBLUESCRIPT II SK* και *pGEX 4T.1* αντίστοιχα.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της κλωνοποίησης του cDNA της EXOSC10 στον πλασμιδιακό φορέα *pBLUESCRIPT II SK*.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της κλωνοποίησης του cDNA της EXOSC10 στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX 4.T1*.

2.1.6 Πολλαπλασιασμός πλασμιδίων σε βακτηριακές καλλιέργειες

Η εισαγωγή πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα ονομάζεται **μετασχηματισμός** και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για:

⇒ Την εισαγωγή των πλασμιδίων που παραλήφθηκαν μετά την αντίδραση λιγάσης στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli Top10* με σκοπό τον έλεγχο της ορθότητας τους και την παραλαβή τους σε μεγάλες ποσότητες.

⇒ Την εισαγωγή των πλασμιδίων *pGEX 4T.1 EXOSC10 (WT και K583R)* ή *pGEX 4T.1-USP36 (1-420 και 421-800)* στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli BL21-RIL* με σκοπό την έκφραση των αντίστοιχων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-EXOSC10 και GST-USP36.

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά κύτταρα προκειμένου να αποκτήσουν την ικανότητα εύκολης πρόσληψης του εξωγενούς πλασμιδιακού DNA μέσω της κυτταρικής τους μεμβράνης πρέπει να καταστούν δεκτικά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω κατεργασίας των κυττάρων με μία σειρά διαλυμάτων που περιέχουν CaCl_2 , τα θετικά ιόντα Ca^{2+} του οποίου εξουδετερώνουν την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου πλασμιδιακού DNA και της βακτηριακής μεμβράνης, διευκολύνοντας στη συνέχεια, την εισαγωγή του εντός των κυττάρων.

Πειραματική διαδικασία

Για την δημιουργία δεκτικών κυττάρων *E.coli Top10* ή *BL21-RIL*, 5 ml θρεπτικού TYM (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων) εμπλουτισμένο με 5 μl του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη ή χλωραμφενικόλη εμβολιάστηκαν με μικρή ποσότητα παγωμένης καλλιέργειας *Top10* ή *BL21-RIL* αντίστοιχα και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37 °C. Έπειτα, έγινε αραίωση της αρχικής καλλιέργειας 1/100 σε 50 ml TYM απουσία αντιβιοτικού και η νέα καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση στους 37 °C, έως ότου η οπτική απορρόφηση φτάσει το 0.4 ($\text{OD}_{600} = 0.4$). Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000 x g για 5 λεπτά με σκοπό την παραλαβή των κυττάρων στο ίζημα, επαναιώρηση αυτών σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30mM CH_3COOK , 50mM MnCl_2 , 100mM KCl , 10mM CaCl_2 , 15% γλυκερόλη) και επώαση για 10 λεπτά στους 4 °C. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στα 4000 x g για 5 λεπτά, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II (10mM MOPS, 75mM CaCl_2 , 10mM KCl , 20% γλυκερόλη) και επώασθηκε για επιπλέον 1 ώρα στους 4 °C. Μετά το πέρας της επώασης, τα βακτηριακά κύτταρα μοιράστηκαν ανά 50 μl σε αποστειρωμένα eppendorfs και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με θερμικό σοκ

Ο τελικός μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηρίων *E.coli* γίνεται με την μέθοδο του θερμικού σοκ. Συγκεκριμένα, η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας στα δεκτικά κύτταρα επηρεάζει την εξωτερική λιπιδική στοιβάδα, επιτρέποντας την πρόσληψη μικρών μορίων DNA, όπως είναι τα πλασμίδια.

Πειραματική διαδικασία

20 µl αντιδράσεων λιγάσης ή 100 ng γνωστού πλασμιδίου προστέθηκαν σε 50 µl δεκτικών κυττάρων *E.coli Top10* ή *BL21-RIL* και επώστηκαν στους 4 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42 °C για 50 δευτερόλεπτα και αφέθηκαν να ανακάμψουν για 2 λεπτά στον πάγο. Μετά την ανάκαμψη, έγινε προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων) και επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 37 °C απουσία αντιβιοτικών. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 4000 x g, απομακρύνθηκαν 800 µl υπερκείμενου και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στα υπόλοιπα 200 µl θρεπτικού. Το επαναιώρημα μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri που περιέχει στερεό θρεπτικό LB (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων) παρουσία αμικικιλίνης για τα *Top10* ή αμικικιλίνης και χλωραμφαινικόλης για τα *BL21-RIL* αντίστοιχα και επώστηκε για 16 ώρες στους 37 °C με σκοπό την ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά επιλογής στερεών αποικιών.

2.1.7 Απομόνωση πλασμιδίων από βακτηριακές καλλιέργειες

Η απομόνωση των πλασμιδίων από τις βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit “NucleoSpin Plasmid” της εταιρίας Macherey-Nagel. Το kit αυτό στηρίζεται στην αλκαλική λύση των βακτηριακών κυττάρων παρουσία του ισχυρού ανιονικού απορρυπαντικού SDS και στην δέσμευση του πλασμιδιακού DNA σε στήλη πυριτίου, επιτρέποντας την ταχύτατη απομόνωση του από τις βακτηριακές καλλιέργειες.

Πειραματική διαδικασία

5 ml υγρού θρεπτικού LB παρουσία αμικικιλίνης εμβολιάστηκαν με μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων *E.coli Top10* και επώστηκαν υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης, οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα που περιείχε τα κύτταρα επαναιωρήθηκε σε έτοιμο διάλυμα λύσης παρουσία του SDS για 10 λεπτά (Buffer A1 + A2). Έπειτα, έγινε εξουδετέρωση του αρχικού διαλύματος (με προσθήκη του Buffer A3) και φυγοκέντρηση στα 12.000 x g για την απομάκρυνση στο ίζημα των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών, του γενωμικού DNA και των θραυσμάτων των μεμβρανών. Το πλασμιδιακό DNA που ήταν διαλυτό στο υπερκείμενο δεσμεύτηκε σε

στήλη που φέρει μεμβράνη πυριτίου. Η στήλη εκπλύθηκε με διάλυμα αιθανόλης (Buffer A4) για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων διαλυτών μακρομορίων που πιθανών δεσμεύτηκαν, και το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε σε 50 μl ελαφρώς αλκαλικού διαλύματος χαμηλής αλατότητας Elution Buffer AE. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε προσδιορίστηκε μετά από μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm με το φασματοφωτόμετρο Nano Drop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση χιμαιρικών GST πρωτεϊνών

Ένας ευρέως διαδεδομένος τρόπος για την παραλαβή σε μεγάλες ποσότητες μίας επιθυμητής πρωτεΐνης είναι η υπερέκφραση και απομόνωση της σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες βακτηρίων. Η πρωτεΐνη αυτή που εκφράζεται, φέρει συνήθως έναν επίτοπο για την εύκολη απομόνωση της.

2.2.1 Επαγωγή της έκφρασης χιμαιρικών GST πρωτεϊνών σε κύτταρα BL21-RIL

Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την υπερέκφραση των GST-EXOSC10 και GST-USP36 πρωτεϊνών σε βακτήρια *E.coli* ήταν τα εξής:

⇒ **Μετασχηματισμός των βακτηρίων *E.coli* BL21-RIL** (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.4 Βακτηριακά στελέχη) με τα πλασμίδια *pGEX 4T.1 EXOSC10* (WT και K583R) ή *pGEX 4T.1-USP36* (1-420 και 421-800) που φέρουν κλωνοποιημένο το πλήρες cDNA της EXOSC10 (WT ή K583R) ή την αλληλουχία για την έκφραση τμημάτων της USP36 (1-420 και 421-800) (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.1 Πλασμίδια). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που προκύπτουν από τον φορέα *pGEX 4T.1* είναι σε σύντηξη με τον επίτοπο GST.

⇒ **Επαγωγή της έκφρασης των GST-EXOSC10 και GST-USP36.** Η έκφραση των ανασυνδυασμένων αυτών πρωτεϊνών ελέγχθηκε μέσω του συστήματος του οπερονίου της λακτόζης. Συγκεκριμένα, στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX 4T.1*, η έκφραση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις GST-EXOSC10 και GST-USP36 γίνεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή *tac*, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με αλληλουχίες του χειριστή *lac* operator. Εντός του φορέα, υπάρχει το γονίδιο *lacI* από το οποίο εκφράζεται σταθερά ο καταστολέας του οπερονίου της λακτόζης, ο οποίος συνδέεται στον χειριστή και εμποδίζει την μεταγραφή του παρακείμενων αλληλουχιών.

Για την επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-EXOSC10 και GST-USP36, προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο ο παράγοντας IPTG (Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside) (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Το IPTG είναι ένα μοριακό ανάλογο της αλλολακτόζης, το οποίο δεν μεταβολίζεται από τα βακτήρια και δρα προσδένοντας στον καταστολέα, εμποδίζοντας τον να συνδεθεί στο χειριστή και επιτρέποντας έτσι την ελεύθερη έκφραση των GST-EXOSC10 και GST-USP36.

Πειραματική διαδικασία

Για την έκφραση των χιμαιρικών GST-EXOSC10 και GST-USP36, 100 ng των πλασμιδίων *pGEX 4.T1 EXOSC10 (WT ή K583R)* και *pGEX 4.T1 USP36 (1-420 και 421-800)* αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli BL21-RIL*. 20 ml υγρού θρεπτικού LB παρουσία αμικικιλίνης εμβολιάστηκαν με μία μεμονωμένη αποικία των μετασχηματισμένων κυττάρων και επώαστηκαν υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37 °C. Μέρος της καλλιέργειας αυτής αραιώθηκε σε αναλογία 1/50 σε 2 λίτρα υγρού θρεπτικού 2 x YT (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια βακτηρίων) και επώαστηκε εκ νέου στους 37 °C έως ότου η οπτική απορρόφηση φτάσει το 0.5 (OD₆₀₀ = 0.5). Η καλλιέργεια ψύχθηκε στην κατάλληλη θερμοκρασία και έγινε προσθήκη του παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM για τις GST-EXOSC10 και 0.5 mM για τις GST-USP36. Ακολούθησε επώαση για τον απαιτούμενο χρόνο με στόχο την υπερέκφραση των χιμαιρικών GST πρωτεϊνών. Οι ακριβείς συνθήκες για την υπερέκφραση των GST-EXOSC10 και GST-USP36 πρωτεϊνών αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 9 και 10).

Πίνακας 9: Οι συνθήκες για την υπερέκφραση των GST-EXOSC10 πρωτεϊνών

Υπερέκφραση των GST-EXOSC10 WT / K583R	
<i>Πλασμίδιο</i>	<i>pGEX 4.T1 EXOSC10 WT / K583R</i>
<i>Συγκέντρωση IPTG</i>	<i>1 mM</i>
<i>Θερμοκρασία καλλιέργειας</i>	<i>18 °C</i>
<i>Χρόνος επώασης για την υπερέκφραση</i>	<i>16 ώρες</i>

Πίνακας 10: Οι συνθήκες για την υπερέκφραση των GST-USP36 πρωτεϊνών

Υπερέκφραση των GST-USP36 1-420 / 421-800	
<i>Πλασμίδιο</i>	<i>pGEX 4.T1 USP36 1-420 / 421-800</i>
<i>Συγκέντρωση IPTG</i>	<i>0.5 mM</i>
<i>Θερμοκρασία καλλιέργειας</i>	<i>25 °C</i>
<i>Χρόνος επώασης για την υπερέκφραση</i>	<i>4 ώρες</i>

2.2.2 Καθαρισμός των χημικών GST πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας

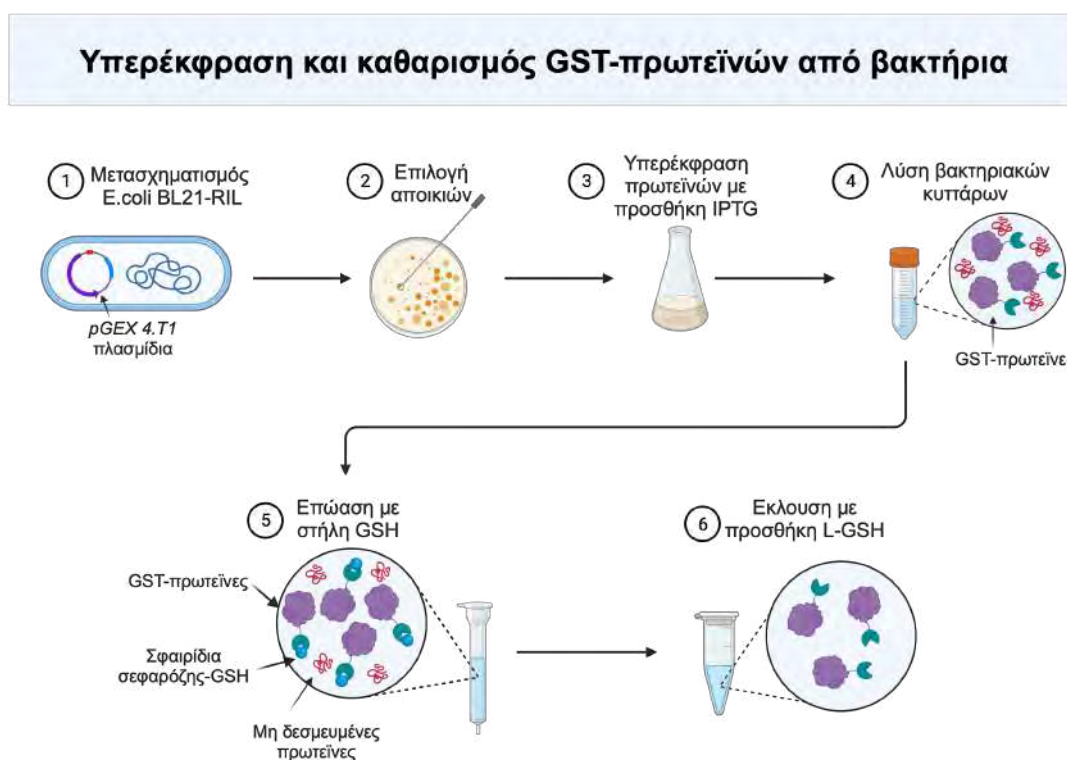
Όπως αναφέρεται παραπάνω, οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται σε βακτήρια φέρουν έναν επίτοπο για την εύκολη απομόνωσή τους. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX 4.T1 είναι σε σύντηξη με την πρωτεΐνη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase, GST). Ο επίτοπος GST έχει μέγεθος 26 kDa και βρίσκεται στο N-τελικό άκρο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η απομόνωση των GST-πρωτεϊνών γίνεται μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας. Οι στήλες αγκιστείας που χρησιμοποιούνται φέρουν καθηλωμένη την γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο (Glu-Cys-Cly) το οποίο αποτελεί ισχυρό υπόστρωμα για την GST. Οι GST-πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί στη στήλη-GSH εκλύονται με την προσθήκη διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης ανηγμένης L-GSH, η οποία δρα ανταγωνιστικά προς αυτές για την σύνδεση με την καθηλωμένη GSH.

Ένα, εξίσου σημαντικό σημείο για τον καθαρισμό των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών αποτελεί το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το διάλυμα αυτό πρέπει να περιέχει το κατάλληλο pH και την ποσότητα αλάτων, ώστε να διατηρείται η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη διαλυτή. Για την αποφυγή πρωτεόλυσης του δείγματος, σε όλα τα διαλύματα για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και τόσο αυτά όσο και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι παγωμένα στους 4 °C.

Πειραματική διαδικασία

Μετά το πέρας της επώασης με σκοπό την υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων GST-EXOSC10 και GST-USP36 (βλ. Γ. 2. Μέθοδοι - 2.2.1 Επαγωγή της έκφρασης χημικών GST πρωτεϊνών σε κύτταρα BL21-RIL), πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στα 4000 x g στους 4 °C με σκοπό την παραλαβή των κυττάρων στο ίζημα.

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 20 ml κατάλληλου διαλύματος λύσης (για τις GST-EXOSC10: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 % γλυκερόλη, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween20, για τις GST-USP36: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% v/v Triton x-100, 1 mM DTT) και λύθηκαν με την χρήση υπερήχων (3 λεπτά, κύκλοι του 1 λεπτού: 20 δευτερόλεπτα ON – 40 δευτερόλεπτα OFF, σε ένταση 50 %). Το διαλυτό κλάσμα που περιείχε τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 45 λεπτά στα 20.000 x g στους 4 °C, και επώαστηκε υπό ανάδευση για 2 ώρες με σφαιρίδια αφαρόζης που φέρουν καθηλωμένη τη GSH (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.8 Στήλες χρωματογραφίας). Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με 100 ml διαλύματος λύσης και οι δεσμευμένες GST-πρωτεΐνες εκλούστηκαν μετά από επώαση των σφαιριδίων υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C σε 2 ml διαλύματος έκλουσης που περιείχε 10 mM L- GSH (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Στην εικόνα 13, παρουσιάζεται συνολικά η διαδικασία υπερέκφρασης και απομόνωσης των ανασυνδυασμένων GST-πρωτεϊνών σε βακτήρια *E.coli*.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας υπερέκφρασης και απομόνωσης των GST-πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

2.3 Καλλιέργεια και χειρισμός ευκαρυωτικών κυττάρων

Πέραν των πειραμάτων *in vitro*, ένα μεγάλο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλάμβανε την χρήση ευκαρυωτικών κυττάρων, με σκοπό την μελέτη της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 *in cellulo*. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν ανθρώπινα αθανатоποιημένα κύτταρα. Ο όρος αθανатоποιημένα αντιστοιχεί σε κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί από ανθρώπινους ιστούς και έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να έχουν την ικανότητα συνεχούς πολλαπλασιασμού ώστε να διατηρούνται σε καλλιέργεια για εκτεταμένο χρόνο. Ο χειρισμός των ευκαρυωτικών κυττάρων γινόταν αυστηρά εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζονται ασηπτικές συνθήκες.

2.3.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων μέσω τρυψινοποίησης

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή, είχαν την ιδιότητα της προσκόλλησης και του σχηματισμού μονοστοιβάδας στην επιφάνεια του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας. Κάθε φορά που τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κάλυπταν το 70-80 % της επιφάνειας αυτής, μέρος τους μεταφερόταν για ανακαλλιέργεια σε νέο τρυβλίο. Η αποκόλληση των κυττάρων γινόταν ενζυμικά με τη μέθοδο της τρυψινοποίησης.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε με τη χρήση αντλίας κενού αέρος και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) για την απομάκρυνση ασθενώς προσκολλημένων ή νεκρών κυττάρων αλλά και της περίσσειας θρεπτικού. Προστέθηκε στα κύτταρα κατάλληλη ποσότητα διαλύματος της πρωτεάσης τρυψίνης (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ευκαρυωτικών κυττάρων) ώστε να καλυφθεί πλήρως όλη η επιφάνεια του τρυβλίου και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 37 °C. Ακολούθησε προσθήκη 9x όγκων πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM για την επαναιώρηση των κυττάρων και την αναστολή της δράσης της τρυψίνης (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ευκαρυωτικών κυττάρων). Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν πλήρως και μέρος αυτών μεταφέρθηκε με την κατάλληλη αραίωση (συνήθως 1/5 ή 1/10) σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας.

2.3.2 Μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων

Πάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα μπορούν να συντηρηθούν μακροχρόνια, όταν δεν βρίσκονται σε καλλιέργεια, μετά από ψύξη σε κατάλληλο διάλυμα κρυοσυντήρησης και αποθήκευση σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Το διάλυμα κρυοσυντήρησης (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ευκαρυωτικών κυττάρων) αποτελείται από ορό FBS εμπλουτισμένο με τον οργανικό διαλύτη DMSO, ο οποίος δρα ως κρυοπροστατευτικό, μειώνοντας τον κίνδυνο καταστροφής των κυττάρων κατά τη διαδικασία του παγώματος.

Πειραματική διαδικασία

Ακολουθώντας την διαδικασία της τρυψινοποίησης (βλ. Γ. 2. Μέθοδοι -2.3.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων μέσω τρυψινοποίησης), τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 700 x g. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε πλήρως σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος κρυοσυντήρησης (1 ml για κάθε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας 10 cm, 80 % πληρότητας) και μοιράστηκε σε cryovials. Τα cryovials μεταφέρθηκαν, απευθείας, σε ειδική δεξαμενή εμβαπτισμένη σε ισοπροπανόλη και τοποθετήθηκαν στους -80 °C για 16 ώρες. Η ισοπροπανόλη έχει το χαρακτηριστικό ότι παγώνει ανά 1 βαθμό το λεπτό, εξασφαλίζοντας έτσι τις βέλτιστες συνθήκες για το αργό και σταδιακό πάγωμα των κυττάρων. Μετά την πλήρη ψύξη τους, τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν εντός δεξαμενής υγρού αζώτου.

Επανέναρξη καλλιέργειας κυττάρων μετά από πάγωμα

Σε αντίθεση με τη διαδικασία παγώματος, η οποία πρέπει να γίνει αργά και σταδιακά, η επανέναρξη της καλλιέργειας πρέπει να γίνει σύντομα, ώστε να εξασφαλιστεί ο βέλτιστος αριθμός ζωντανών κυττάρων μετά τη διαδικασία.

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα μετά τη μεταφορά τους από το υγρό άζωτο αφέθηκαν για 2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37 °C ώστε να ξεπαγώσουν. Μεταφέρθηκαν σε falcon και έγινε η σταδιακή προσθήκη (ανά σταγόνα) 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου θερμασμένου στους 37 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 700 x g, απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου που περιέχει το διάλυμα κρυοσυντήρησης, επαναιώρηση του

ιζήματος των κυττάρων σε φρέσκο πλήρες θρεπτικό DMEM προ-θερμασμένου στους 37 °C και μεταφορά σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂.

2.3.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια

Ομοίως με τα βακτήρια, τα πλασμίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε ευκαρυωτικά κύτταρα με στόχο την παροδική ή σταθερή υπερέκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Η διαδικασία της εισαγωγής εξωγενών μορίων νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα ονομάζεται διαμόλυνση και μπορεί να διεκπεραιωθεί με ποικίλους τρόπους. Υπάρχουν φυσικές μέθοδοι, όπως είναι η μικροένεση και η ηλεκτροδιάτρηση αλλά και χημικοί μέθοδοι, όπως η χρήση κατιονικών πολυμερών ή λιποσωμάτων. Όσον αφορά την έκφραση του πλασμιδιακού DNA που εισέρχεται, η μέθοδος της διαμόλυνσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως σταθερή (stable) ή ως παροδική (transient). Κατά τη μόνιμη διαμόλυνση, το μεταφερόμενο DNA ενσωματώνεται στο κυτταρικό γονιδίωμα και μετά από διαδικασία θετικής επιλογής (επιλογή με βάση ενός γονιδίου-μάρτυρα όπως για παράδειγμα ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό) προκύπτουν κλώνοι μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία εκφράζουν μόνιμα και σταθερά την επιθυμητή πρωτεΐνη. Από την άλλη, κατά την παροδική διαμόλυνση, η έκφραση του εισαγόμενου DNA διαρκεί για μικρό διάστημα (συνήθως για 24-72 ώρες) και τα επίπεδά της ποικίλλουν τόσο ανά κύτταρο όσο και ανά πείραμα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τόσο παροδικά όσο και σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές.

Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Για την παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο PEI (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Πρόκειται για ένα υδρόφιλο, κατιονικό πολυμερές, το οποίο επιλέγεται κυρίως για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το πολυμερές αυτό φέρει θετικό φορτίο, το οποίο αλληλεπιδρά με το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA σχηματίζοντας σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα DNA-PEI αλληλεπιδρούν με τη σειρά τους με την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων, προωθώντας την είσοδο τους με ενδοκύτωση. Η ποσότητα του αντιδραστηρίου PEI που χρησιμοποιείται είναι ανάλογη της

ποσότητας του πλασμιδιακού DNA και εξαρτάται από το εμβαδόν του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας.

Στη παρούσα διατριβή έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa και HEK293 με σκοπό την υπερέκφραση της αγρίου τύπου HA-EXOSC10 και μορφών της που φέρουν μεταλλάξεις στις θέσεις K168, K201, K583.

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα HeLa ή HEK293 επιστρώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 10cm ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να εμφανίζουν 70-80 % πληρότητα. 15 µg των πλασμιδίων *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10* (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.1 Πλασμίδια) και 30 µl αντιδραστηρίου PEI (αναλογία: 1 πλασμιδιακό DNA / 2 PEI) προστέθηκαν σε 1.5 ml θρεπτικού DMEM -FBS/- αντιβιοτικά (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ανθρώπινων κυττάρων) και το μίγμα επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα DNA-PEI. Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα μεταφέρθηκε στα κύτταρα, στα οποία είχε προηγηθεί η αντικατάσταση του πλήρες θρεπτικού με 4.5 ml DMEM +5% FBS (συνολικός όγκος: 6 ml) (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ανθρώπινων κυττάρων). Η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης FBS και η απουσία αντιβιοτικών είναι καθοριστική για την επιτυχή και αποδοτική διαμόλυνση των κυττάρων. Τα κύτταρα αφέθηκαν παρουσία του μίγματος για 4 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% CO₂), ώστε να προσλάβουν τα σύμπλοκα και στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με 8 ml φρέσκου πλήρες θρεπτικού DMEM.

Σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In

Για την μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική λειτουργία της EXOSC10 χρησιμοποιήθηκαν σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa, οι οποίες μπορούν να εκφράζουν σταθερά, μορφές της EXOSC10 σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.2 Κυτταρικές σειρές). Οι σειρές αυτές κατασκευάστηκαν στο Εργαστήριο της Dr. Katherine Bohnsack στο Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν από την υποψήφια διδάκτορα Chairini Thome στα πλαίσια συνεργασίας μας με τη συγκεκριμένη ομάδα, με τη χρήση του συστήματος Flp-In T-Rex της εταιρίας Thermo Fischer Scientific. Στην μητρική κυτταρική σειρά Flp-In έχουν ενσωματωθεί σταθερά στο γονιδίωμα τα στοιχεία FRT (Flp Recombination target), αλληλουχίες που

αναγνωρίζονται από την ρεκομπινάση Flp. Μέσω του συστήματος αυτού, επιτρέπεται η σταθερή ενσωμάτωση μίας επιθυμητής αλληλουχίας εντός των αλληλουχιών FRT με ομόλογο ανασυνδυασμό, υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV/TetO₂. Αυτό επιτυγχάνεται με την διαμόλυνση των μητρικών κυττάρων Flp-In με τα κατάλληλα πλασμίδια που φέρουν την αλληλουχία προς ενσωμάτωση, μία αλληλουχία που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και την αλληλουχία για την έκφραση εξωγενώς της ρεκομπινάσης Flp. Η έκφραση υπό τον υποκινητή CMV/TetO₂ γίνεται επαγόμενα με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνης.

Στη παρούσα μελέτη, η μητρική σειρά HeLa Flp-In διαμολύνθηκε με το κατάλληλο πλασμίδιο που έφερε την αλληλουχία για την έκφραση μορφών της EXOSC10 σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG (FLAG-EXOSC10 WT και FLAG-EXOSC10 K583R) ή με πλασμίδιο που έφερε μόνο τον επίτοπο FLAG και έγινε επιλογή των θετικών κλώνων με τη χρήση των αντιβιοτικών βλαστοσιδίνη (σε τελική συγκέντρωση 1 µg/mL) και υγρομυκίνη (σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL).

2.3.4 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με siRNA – Αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών

Πέραν των πειραμάτων υπερέκφρασης με τη χρήση πλασμιδίων, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων με ειδικά μόρια siRNA, με σκοπό την αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών. Τα μόρια αυτά όντας συμπληρωματικά ως προς το mRNA από το οποίο προκύπτει η εκάστοτε πρωτεΐνη, προσδένονται σε αυτό οδηγώντας το προς αποικοδόμηση από ενδονουκλεάσες των κυττάρων, αναστέλλοντας έτσι την έκφραση της πρωτεΐνης. Η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνης (Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen). Πρόκειται για ένα κατιονικό λιπιδικής φύσης αντιδραστήριο, το οποίο σχηματίζει λιποσώματα περικλείοντας εντός τους τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα. Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και εισέρχονται μέσω ενδοκύτωσης.

Πειραματική διαδικασία

Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις πειραμάτων αποσιώπησης:

Αποσιώπηση ενδογενών πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa

Κύτταρα HeLa επιστρώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 10cm με κατάλληλη αραίωση ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να εμφανίζουν 50-60 % πληρότητα. Για την δημιουργία των συμπλόκων λιποφεκταμίνης-siRNA παρασκευάστηκαν αρχικά δύο μίγματα. Στο πρώτο μίγμα, σε 250 μl θρεπτικού μέσου OptiMEM (βλ. Γ. 1.Υλικά - 1.3 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την καλλιέργεια και συντήρηση ανθρώπινων κυττάρων) προστέθηκαν 10 μl αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνης. Στο δεύτερο μίγμα, σε 250 μl θρεπτικού μέσου OptiMEM, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα siRNA έναντι ενδογενών πρωτεϊνών (του μηχανισμού σουμοϋλίωσης: SENP1, SENP2, SENP3, USP36, p14ARF και των HIF-α υπομονάδων) ώστε να φτάνει την τελική συγκέντρωση των 40 nM (στον συνολικό όγκο των 5 ml στο τρυβλίο καλλιέργειας). Τα δύο μίγματα αναμείχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, τα σύμπλοκα (συνολικός όγκος 500 μl) μεταφέρθηκαν στα επιστρωμένα κύτταρα, τα οποία περιείχαν 4.5 ml θρεπτικού μέσου DMEM -FBS/- αντιβιοτικά και ακολούθησε εκ νέου επώαση για 4 ώρες εντός του επωαστικού κλιβάνου (37 °C, 5% CO₂). Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με 8 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM και τα κύτταρα αφέθηκαν για 24 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση.

Αποσιώπηση της ενδογενούς EXOSC10 στις σειρές HeLa Flp-In

Οι FLAG-EXOSC10 μορφές που εκφράζονται στις κυτταρικές σειρές Flp-In φέρουν μεταλλάξεις που τις κάνουν ανθεκτικές σε συγκεκριμένα siRNA έναντι της EXOSC10, επιτυγχάνοντας την ειδική αποσιώπηση μόνο της ενδογενούς πρωτεΐνης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων HeLa Flp-In με σκοπό την αποσιώπηση της έκφρασης της ενδογενούς EXOSC10 είναι όμοια με την παραπάνω. Η προσέγγιση αυτή διαφέρει στο ότι τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φρεάτια τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας 96-φρεατίων και οι ποσότητες των μιγμάτων για το κάθε φρεάτιο ήταν οι εξής: Μίγμα 1, σε 5 μl OptiMEM προστέθηκαν 0.2 μl αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνης. Μίγμα 2, σε 5 μl OptiMEM προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα 3 διαφορετικών siRNA έναντι της EXOSC10 ώστε να φτάνει την τελική συγκέντρωση των 40 nM (στον συνολικό όγκο των 100 μl σε κάθε φρεάτιο). Τα δύο μίγματα αναμείχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, τα σύμπλοκα (συνολικός όγκος 10 μl) μεταφέρθηκαν στα επιστρωμένα κύτταρα, τα οποία περιείχαν 90 μl θρεπτικού μέσου DMEM -FBS/- αντιβιοτικά και

ακολούθησε εκ νέου επώαση για 4 ώρες εντός του επωαστικού κλιβάνου (37 °C, 5% CO₂). Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με 150 μl πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM και αφέθηκαν για 24 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση.

2.3.5 Επίδραση ουσιών ή υποξίας σε ευκαρυωτικά κύτταρα

⇒ Για την μελέτη της ουβικιτίνωσης της ισοπεπτιδάσης SENP3, έγινε επίδραση στα κύτταρα HeLa με 10 μM του παράγοντα **MG132** για 5 ώρες (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για την μελέτη του χρόνου ημιζωής της SENP3 έγινε επίδραση στα κύτταρα HeLa με 10 μg/ml **κυκλοεξιμιδίου** για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για την μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των SENP3 και EXOSC10 καθώς και της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 μετά από αναστολή του μονοπατιού mTOR, έγινε επίδραση στα κύτταρα HeLa με 2 μM **ραπαμυκίνης** για 6 ώρες (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για την επαγωγή της έκφρασης των μορφών FLAG-EXOSC10 στα κύτταρα HeLa Flp-In έγινε προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του αντιβιοτικού **δοξυκυκλίνης** σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για την μελέτη του ρόλου της EXOSC10 στην αναστολή της απόπτωσης, έγινε επίδραση στα κύτταρα HeLa Flp-In με 75 μM **ετοποσιδίου** για 8 ώρες (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

⇒ Για την επώαση των κυττάρων σε συνθήκες **υποξίας 1 % O₂** χρησιμοποιήθηκε ο υποξικός θάλαμος INVIVO₂ (Baker Ruskinn) του εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.4 Μέθοδοι που αφορούν τη μελέτη πρωτεϊνών

2.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παρουσία της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία φέρει αρνητικό φορτίο και όταν προσδεθεί σε θετικά φορτία των

πρωτεϊνών υπό όξινες συνθήκες, αλλάζει από καφέ χρώμα σε μπλε με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm.

Πειραματική διαδικασία

5 μ l δείγματος (διάλυμα πρωτεϊνών προς μέτρηση) ή διαλύματος λύσης (δείγμα «τυφλό») αραιώθηκαν σε 95 μ l ddH₂O και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για 5 λεπτά και φωτομέτρηση στα 595 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα έγινε με βάση την οπτική απορρόφηση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης (BSA).

2.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης. Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών έναντι αυτών αντισωμάτων. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος απομονώνεται μετά από τη καθήλωση του σε ένα στερεό υπόστρωμα (π.χ. σφαιρίδια αгарόζης). Η καθήλωση του αντισώματος στο στερεό υπόστρωμα μπορεί να γίνει είτε με τη δημιουργία ενός ισχυρού χημικού δεσμού ή μέσω αλληλεπίδρασης με ενδιάμεσες πρωτεΐνες. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αгарόζης στα οποία έχουν συνδεθεί ομοιοπολικά οι πρωτεΐνες A του οργανισμού *S.aureus* ή G του οργανισμού *Streptococcus*. Οι πρωτεΐνες A και G αποτελούν μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αυτών και εμφανίζουν μεγάλη αγγιστεία με τις ανοσοσφαιρίνες διαφόρων οργανισμών. Η πρωτεΐνη A συνδέεται με τις ανοσοσφαιρίνες IgM, IgA, IgD και σε μικρότερο βαθμό με την πλειοψηφία των IgG, ενώ η πρωτεΐνη G συνδέεται ειδικά με τις ανοσοσφαιρίνες IgG.

Οι συνθήκες που πραγματοποιείται η ανοσοκατακρήμνιση μπορεί να είναι αποδιατακτικές ή μη αποδιατακτικές. Στις αποδιατακτικές συνθήκες, τα εκχυλίσματα των κυττάρων προετοιμάζονται με κατάλληλο διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση ισχυρών απορρυπαντικών, όπως για παράδειγμα του ανιονικού απορρυπαντικού SDS. Τα απορρυπαντικά αυτά εξασφαλίζουν τόσο την λύση των κυττάρων όσο και την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, καταργώντας έτσι όλες τις μη-ομοιοπολικές ή ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Αντίθετα, για την

μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών και την απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων, η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιείται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Σε αυτές τις συνθήκες, η λύση των κυττάρων στηρίζεται στη χρήση ήπιου διαλύματος λύσης που περιέχει μη ιονικά απορρυπαντικά, όπως το Triton X-100 και το NP-40, διατηρώντας έτσι τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Πολύ σημαντικό βήμα για την επιτυχία της μεθόδου είναι η προσθήκη αναστολέων πρωτεασών καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας για την αποφυγή πρωτεόλυσης. Συνολικά, η πειραματική διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης χωρίζεται σε 3 στάδια: στην προετοιμασία των κυτταρικών λυμάτων, στην επώαση με το στερεό υπόστρωμα και στην τελική έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών. Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις ανοσοκατακρήμνισης, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

Ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η απομόνωση όλων των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών με SUMO1 από εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με γνωστό δημοσιευμένο πρωτόκολλο (299). Οι συνθήκες της συγκεκριμένης ανοσοκατακρήμνισης ήταν αποδιατακτικές για να αποφευχθεί η κατακρήμνιση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με την SUMO-1 και το στερεό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα με αντίσωμα έναντι της SUMO-1 (βλ. Γ.1. Υλικά -1.8 Στήλες χρωματογραφίας) για την ειδική δέσμευση των σουμοϋλιωμένων από τη SUMO-1 πρωτεϊνών. Επιπλέον, για την εξασφάλιση της ακεραιότητας της σύνδεσης των SUMO στο διάλυμα, χρησιμοποιήθηκε ο μη αντιστρεπτός αναστολέας των SUMO ισοπεπτιδασών, NEM (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια).

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των κυτταρικών λυμάτων

Τα επιστρωμένα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα PBS 1x και έγινε προσθήκη διαλύματος λύσης RIPA (1% SDS) (20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-νατρίου pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate, 1% SDS). Έγινε απόξεση των κυττάρων και ολοκλήρωση της διαδικασίας λύσης με τη χρήση υπερήχων (2 λεπτά, κύκλοι των 20 δευτερολέπτων: 5 δευτερόλεπτα ON – 15 δευτερόλεπτα OFF, σε ένταση 30 %). Τα κυτταρικά λύματα αραιώθηκαν σε αναλογία 1/10 με διάλυμα λύσης RIPA (-SDS) (20 mM ρυθμιστικό

διάλυμα φωσφορικών-νατρίου pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate), με σκοπό την αραίωση του απορρυπαντικού SDS σε τελική συγκέντρωση 0.1 %. Η αραίωση αυτή είναι απαραίτητη, καθώς η πολύ υψηλή συγκέντρωση SDS αναστέλλει την δέσμευση των πρωτεϊνών με το αντίσωμα. Για την παραλαβή του διαλυτού κυτταρικού εκχυλίσματος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 13.000 x g για 30 λεπτά στους 4 °C. Στο σημείο αυτό, 1/10 της συνολικής ποσότητας των εκχυλισμάτων κρατήθηκε ως δείγμα των κυτταρικών εκχυλισμάτων πριν την ανοσοκατακρήμνιση.

Δέσμευση σε σφαιρίδια αραρόζης και έκλουση

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford (βλ. Γ.2.Μέθοδοι - 2.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford). 1 mg εκχυλίσματος πρωτεϊνών επώαστηκε υπό ανάδευση με 10 µl σφαιριδίων SUMO-1, τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί σε διάλυμα RIPA (0.1 % SDS) (20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-νατρίου pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate, 0.1% SDS), για 16 ώρες στους 4 °C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με το ίδιο διάλυμα για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών (10 λεπτά επώαση υπό ανάδευση στους 4 °C και φυγοκέντριση στα 700 x g για 5 λεπτά). Η έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών έγινε με επώαση των σφαιριδίων για 10 λεπτά στους 37 °C με 40 µl διαλύματος SDS Laemmli Loading buffer (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη). Στα εκλούσματα έγινε προσθήκη DTT σε τελική συγκέντρωση 10 mM και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 95 °C.

Ανοσοκατακρήμνιση ενδογενών πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Για την μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ενδογενούς EXOSC10, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση EXOSC10-IP υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες είτε σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, είτε σε εκχυλίσματα απομονωμένων πυρήνων, όπως αναλύεται παρακάτω.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των ολικών κυτταρικών λυμάτων

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές και συλλέχθηκαν με απόξεση σε 1 ml παγωμένου διαλύματος PBS 1x. Φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 400 x g, το κυτταρικό ίζημα

επαναιωρήθηκε σε 400 µl παγωμένου διαλύματος λύσης total IP buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA) και επώαστηκε για 30 λεπτά στον πάγο. Η λύση των κυττάρων υποβοηθήθηκε με χαμηλής ένταση υπερήχους (4 κύκλοι του 1 λεπτού: 15 δευτερόλεπτα ON /OFF ανά 1 δευτερόλεπτο – 45 δευτερόλεπτα OFF, σε ένταση 10 %) και το διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντριση για 30 λεπτά στα 15.000 x g στους 4 °C. Τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της EXOSC10 για 3 ώρες στους 4 °C.

Για την παραλαβή των πυρήνων, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 300 µl διαλύματος λύσης κυτταροπλάσματος (10 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.3% NP-40) και επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε ομογενοποίηση με τη χρήση Dounce και παραλαβή του ιζήματος των πυρήνων μετά από φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 1200 x g στους 4 °C. Το ίζημα εκπλύθηκε μία φορά με 800 µl παγωμένου διαλύματος λύσης κυτταροπλάσματος και οι απομονωμένοι πυρήνες λύθηκαν σε 300 µl παγωμένου διαλύματος λύσης πυρήνων (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA) για 5 λεπτά στον πάγο. Ομοίως με πριν, η λύση των πυρήνων υποβοηθήθηκε με χαμηλής ένταση υπερήχους (25 δευτερόλεπτα: ON /OFF ανά 1 δευτερόλεπτο, σε ένταση 10 %), το διαλυτό πυρηνικό κλάσμα παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντριση για 30 λεπτά στα 15.000 x g στους 4 °C και επώαστηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της EXOSC10 για 12 ώρες στους 4 °C. Το 1/10 της συνολικής ποσότητας των εκχυλισμάτων κρατήθηκε ως δείγμα των κυτταρικών εκχυλισμάτων πριν την ανοσοκατακρήμνιση.

Δέσμευση σε σφαιρίδια αгарόζης και έκλυση

Τα ολικά ή πυρηνικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν επώαστηκαν υπό ανάδευση με 10 µl σφαιριδίων αгарόζης πρωτεΐνης G, τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο κατάλληλο διάλυμα λύσης, για 1 ώρα στους 4 °C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με διάλυμα λύσης για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών (2 λεπτά επώαση υπό ανάδευση στους 4 °C και φυγοκέντριση στα 700 x g για 5 λεπτά). Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών έγινε με επώαση των σφαιριδίων για 10 λεπτά στους 37 °C με 40 µl διαλύματος SDS Laemmli Loading buffer. Στα εκλούσματα έγινε προσθήκη DTT σε τελική συγκέντρωση 10 mM και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 95 °C.

2.4.3 Ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την ανάλυση των πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, γνωστή ως SDS-PAGE. Κατά τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα το μοριακό τους βάρος εντός μίας πηκτής πολυακρυλαμιδίου, στα άκρα της οποίας εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα. Στα δείγματα των προς ανάλυση πρωτεϊνών προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης SDS Laemmli Loading buffer. Το διάλυμα αυτό περιέχει SDS, το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες, τις αποδιατάσσει, ενώ παράλληλα τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μετακινούνται έτσι εντός της πηκτής, από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο προς τον θετικά φορτισμένο. Η πηκτή παρασκευάζεται από ακρυλαμίδιο, ο πολυμερισμός του οποίου δημιουργεί ένα πλέγμα δια μέσω του οποίου διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από δύο παράγοντες: το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και το TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο). Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα επιστοιβάξης, όπου εισέρχονται τα δείγματα κατά την εκκίνηση της ηλεκτροφόρησης και έχει σταθερή σύσταση, και το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και κυμαίνεται σύμφωνα με τις προς ανάλυση πρωτεΐνες. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, τόσο στενότερο το πλέγμα, με αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό μικρότερων πρωτεϊνών

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία δειγμάτων

Στα δείγματα των προς ανάλυση πρωτεϊνών προστέθηκε το διάλυμα φόρτωσης SDS Laemmli Loading buffer και θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 95 °C πριν την ηλεκτροφόρηση τους.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφόρηση

Στη παρούσα διατριβή, κατασκευάστηκαν πηκτές περιεκτικότητας πολυακρυλαμιδίου 7%, 8% και 15%. Αρχικά, προετοιμάστηκε το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού (0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 7-15 % ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0.04% APS, 0.1% TEMED). Μετά τη προσθήκη των πολυμεριστικών

παραγόντων APS και TEMED, το διάλυμα αφέθηκε να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στην συνέχεια, κατασκευάστηκε αντίστοιχα και το πήκτωμα επιστοιβάξης (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 4 % ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0.04% APS, 0.1% TEMED). Μετά τη σταθεροποίηση της, η πηκτή μεταφέρθηκε εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit, Hoefer, MA, USA) και καλύφθηκε πλήρως με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (0.05 M Tris, 0.38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8.3). Τα δείγματα εισήχθησαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση τους έγινε υπό σταθερή ένταση ρεύματος 20 mA για 2 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα είτε αναλύθηκε με διάλυμα χρωστικής Coomassie brilliant blue, είτε χρησιμοποιήθηκε για ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπως αναλύονται παρακάτω.

2.4.4 Χρώση πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Coomassie brilliant blue

Προκειμένου να οπτικοποιηθούν οι πρωτεΐνες που βρίσκονται εντός της πηκτής ακρυλαμιδίου μετά από την ηλεκτροφόρηση τους με SDS-PAGE, η πηκτή επώαστηκε υπό ανάδευση με 50 ml διαλύματος χρωστικής Coomassie brilliant blue (0.1 % Coomassie brilliant blue, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 15 λεπτά. Η απομάκρυνση της περίσσειας μη δεσμευμένης χρωστικής έγινε μετά από 3 εκπλύσεις της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (10% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για συνολικά 60 λεπτά.

2.4.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται και μονιμοποιούνται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω της μεθόδου της ηλεκτρομεταφοράς. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη γίνεται με την χρήση ειδικών για αυτές αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται δύο ειδών αντισώματα: το πρώτο αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την προς ανάλυση πρωτεΐνη και ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει τις σταθερές περιοχές του πρώτου και βρίσκεται σε σύνδεση με ένα ένζυμο, την υπεροξειδάση του χρένου. Η τελική ανίχνευση γίνεται μετά από επώαση του υποστρώματος του ενζύμου αυτού με τη μεμβράνη και την ανίχνευση της παραχθείσας χημειοφωταύγειας.

Πειραματική διαδικασία

Η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν υπό ήπια ανάδευση για 15 λεπτά σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (125 mM Tris-βορικό pH 8.5, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT). Στη συνέχεια, αυτά τα δύο τοποθετήθηκαν εφαπτόμενα ανάμεσα σε ειδικά χαρτιά Whatman και πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά για 70 λεπτά σε συνθήκες σταθερής ένταση ρεύματος 80 mA σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς σε ημί-ξηρες συνθήκες (semi-dry transfer device, Biophoretics, NV, USA). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκε με διάλυμα της χρωστικής Ponceau (2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ), για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών στην μεμβράνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα γάλακτος κορεσμού (5% γάλα σκόνη διαλυμένο σε PBS 1X - 0.1% Tween 20), ώστε να δεσμευθούν όλες οι μη-ειδικές θέσεις της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε 3 φορές με διάλυμα πλύσης (PBS 1X - 0.1% Tween 20) και επωάστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 4 °C με το πρώτο ειδικό αντίσωμα για την ανίχνευση της προς μελέτη πρωτεΐνης (διαλυμένο σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού). Μετά το πέρας τη επώασης, η μεμβράνη εκπλύθηκε 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης και επωάστηκε εκ νέου για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο (διαλυμένο σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού). Μετά τη σύνδεση και του δεύτερου αντισώματος ακολούθησαν 3 πλύσεις για 5 λεπτά και επώαση της μεμβράνης με το εμφανιστικό διάλυμα (βλ. Γ.1.Υλικά - 1.6 Αντιδραστήρια). Το σήμα χημειοφωταύγειας που εκλύθηκε ανιχνεύθηκε με τη χρήση της συσκευής Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System (Uvitec Cambridge, Cambridge, UK)..

2.4.6 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Η παρατήρηση του σήματος των πρωτεϊνών εντός των κυττάρων μπορεί να γίνει με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η μέθοδος αυτή χωρίζεται στα εξής στάδια: πρώτα τα κύτταρα μετά από χημική κατεργασία μονιμοποιούνται σε καλυπτρίδες και οι μεμβράνες τους γίνονται διαπερατές. Προστίθεται ένα πρώτο αντίσωμα που αναγνωρίζει την προς μελέτη πρωτεΐνη και έπειτα, ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει τις σταθερές περιοχές του πρώτου. Η ιδιαιτερότητα του δεύτερου

αντισώματος είναι ότι βρίσκεται συζευγμένο με ένα φθορόχρωμα. Τα φθοροχρώματα είναι χημικές ουσίες που διαθέτουν την ικανότητα φθορισμού μετά από διέγερση τους με υπεριώδες φως. Η παρατήρηση του φθορισμού γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στη παρούσα διατριβή, η παρατήρηση έγινε συγκεκριμένα με μικροσκόπιο φθορισμού συνεστιακής μικροσκοπίας. Η συνεστιακή μικροσκοπία συνίσταται για την παρατήρηση με ευκρίνεια τρισδιάστατων ακανόνιστων δομών όπως για παράδειγμα, οι πυρηνίσκοι.

Πειραματική διαδικασία

Για την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία. Αφού εκπλύθηκαν με διάλυμα PBS 1x, μονιμοποιήθηκαν μετά από επώαση με διάλυμα φορμαλδεΐδης (3.7 % φορμαλδεΐδη σε PBS 1X) για 5 λεπτά. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με PBS 1x και οι μεμβράνες των κυττάρων έγιναν διαπερατές μετά από επώαση με διάλυμα διαπερατότητας (0.2 % Triton-X-100 σε PBS 1X) για 5 λεπτά στους 4 °C. Επαναλήφθηκαν ομοίως 3 πλύσεις και τα μονιμοποιημένα και διαπερατά κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα κορεσμού BSA (3% BSA σε PBS 1X-0.1% Tween20). Στη συνέχεια, προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ομοίως το δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει συζευγμένο το φθορόχρωμα Alexa. Τέλος, οι καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10 µl MOWIOL (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA), στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα ουσία DAPI. Το DAPI έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στο DNA, επιτρέποντας έτσι την χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Η παρατήρηση και λήψη των φωτογραφιών των κυττάρων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) μέσω του προγράμματος Zen.

2.4.7 *In vitro* σουμοϋλίωση

Μία βασική μέθοδος για την μελέτη της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών είναι η δοκιμή της *in vitro* σουμοϋλίωσης. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει αρχικά, την έκφραση και απομόνωση από βακτήρια των πρωτεϊνών SUMO, του E1 ενζύμου His-Aos1/Uba2, του E2 ενζύμου Ubc9 και του λειτουργικού τμήματος με δράση E3 λιγάσης της RanBP2. Έπειτα, οι πρωτεΐνες αυτές επωάζονται σε αντιδράσεις παρουσία του ATP

ώστε να καταλύσουν την σουμοϋλίωση μίας πρωτεΐνης-υποστρώματος. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις εξής περιπτώσεις:

⇒ Για τον έλεγχο της ικανότητας μίας πρωτεΐνης να σουμοϋλιωθεί και την εύρεση των θέσεων που συμβαίνει αυτό, με την δημιουργία μεταλλάξεων σε πιθανές λυσίνες-στόχους σουμοϋλίωσης.

⇒ Για τον έλεγχο της καταλυτικής ικανότητας μίας πρωτεΐνης με πιθανή δράση SUMO E3 λιγάσης, στη σουμοϋλίωση ενός πρότυπου-υποστρώματος ή για την εύρεση ειδικών για την SUMO E3 λιγάση υποστρωμάτων.

Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η ικανότητα σουμοϋλίωσης *in vitro* των χημικών πρωτεϊνών GST-EXOSC10 WT και K583R παρουσία είτε του λειτουργικού τμήματος της E3 λιγάσης RanBP2 His-RanBP2-BD3-4 2304-3062 ώστε να ταυτοποιηθεί αν η λυσίνη K583 είναι η κύρια θέση σουμοϋλίωσης της EXOSC10, είτε των τμημάτων της GST-USP36 1-420 και 421-800 για να ελεγχθεί αν η USP36 καταλύει την σύζευξη της SUMO-1 στην αγρίου τύπου EXOSC10.

Πειραματική διαδικασία

20 μ l των αντιδράσεων σουμοϋλίωσης προετοιμάστηκαν στον πάγο, όπου πρώτα προστέθηκαν οι GST-EXOSC10 WT/K583R, SUMO-1, Ubc9, His-Aos1/Uba2, His-RanBP2-BD3-4 2304-3062/GST-USP36 1-420/ GST-USP36 421-800 σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM HEPES pH 7.3, 110 mM οξικό κάλιο, 2 mM οξικό μαγνήσιο, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.05% Tween 20, 0.2 mg/ml BSA) με τελική την προσθήκη 5 mM ATP και επώστηκαν για 2 ή 4 ώρες στους 30 °C. Μετά την επώαση, οι αντιδράσεις σταμάτησαν με την προσθήκη ίσου όγκου SDS Laemmli Loading buffer. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις των αντιδράσεων *in vitro* σουμοϋλίωσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 11).

Πίνακας 11: Οι συγκεντρώσεις/ποσότητες των συστατικών των αντιδράσεων *in vitro* σουμοϋλίωσης

Συστατικά αντίδρασης <i>in vitro</i> σουμοϋλίωσης	Συγκέντρωση
GST-EXOSC10	0.25 μ M
hSUMO1	9 μ M
E2 (Ubc9)	25, 100, 500 nM

<i>E1 (His-Aos1/untagged Uba2)</i>	<i>70nM</i>
<i>His-RanBP2-BD3-4 (aa 2304-3062) ή GST-USP36 1-420 ή GST-USP36 421-800</i>	<i>100nM</i>
<i>ATP</i>	<i>5 mM</i>
<i>SUMOylation assay buffer</i>	<i>1X</i>

2.5 Μέθοδοι που αφορούν στην μελέτη RNA

2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα

Η απομόνωση του ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου NuceloZOL (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη και φαινόλη. Προκαλεί την λύση των κυττάρων, την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την αποδέσμευση τους από τα νουκλεϊκά οξέα, την απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών και επιτρέπει τον διαχωρισμό του RNA από τις πρωτεΐνες και το DNA.

Πειραματική διαδικασία

Στα επιστρωμένα σε φρεάτιο τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας 6-φρεατίων προστέθηκαν 500 µl αντιδραστηρίου NucleoZOL και συλλογή των κυτταρικών λυμάτων σε erppendorf. Έπειτα, προστέθηκαν 200 µl αποστειρωμένου ddH₂O, ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαχωρισμός του RNA από το DNA και τις πρωτεΐνες έγινε μετά από φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στα 12.000 x g. Το RNA που εμπεριέχεται διαλυμένο στην υδατική φάση, μεταφέρθηκε σε νέο Erppendorf, ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης 100 % και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το RNA κατακρημνίστηκε μετά από φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στα 12.000 x g στους 4 °C. Το ίζημα εκπλύθηκε με 600 µl διαλύματος αιθανόλης 70 % και αφέθηκε για 5 λεπτά στους 25 °C ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε 20 µl αποστειρωμένου ddH₂O και αποθηκεύτηκε στους -80 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

2.5.2 Σύνθεση cDNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης μορίων RNA. Πρώτο βήμα για τη πραγματοποίηση της μεθόδου αυτής, είναι η μετατροπή του RNA σε cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Η κατασκευή του cDNA έγινε με το εμπορικό kit PrimeScript RT της εταιρίας TaKaRa. Το kit αυτό περιλαμβάνει μία αντίστροφη μεταγραφάση, μίγμα νουκλεοτιδίων και τους εκκινητές oligo-dT για την ενίσχυση των πολυαδενυλιωμένων μορίων RNA. Η σύσταση των αντιδράσεων σύνθεσης cDNA παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) και οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 5 λεπτά στους 25 °C, 15 λεπτά στους 37 °C, 5 δευτερόλεπτα στους 85 °C.

Πίνακας 12: Οι τελικές ποσότητες/συγκεντρώσεις των συστατικών των αντιδράσεων σύνθεσης cDNA

<i>Συστατικά αντίδρασης cDNA</i>	<i>Συγκέντρωση/Ποσότητα</i>
<i>RNA</i>	<i>500 ng</i>
<i>Εκκινητές oligo dT</i>	<i>25 pmol</i>
<i>RT PrimeScript buffer</i>	<i>1x</i>
<i>Αντίστροφη μεταγραφάση</i>	<i>0.5 U</i>

Στη συνέχεια, οι αντιδράσεις cDNA αραιώθηκαν 1/10 σε ddH₂O και χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων mRNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR της εταιρίας Kapa Biosystems (USA). Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει μία πολυμεράση για την ενίσχυση του DNA, μίγμα νουκλεοτιδίων και την φθορίζουσα SYBR Green, η οποία δεσμεύεται στα δίκλωνα μόρια DNA που ενισχύονται και εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού των μορίων DNA που έχουν αντιγραφεί. Οι αντιδράσεις Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του μηχανήματος LightCycler 96 της εταιρίας Roche Life Science (Switzerland), η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) και οι

συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 95 °C για 3 λεπτά, 40 κύκλοι των 95 °C για 10 sec / 60 °C για 20 sec / 72 °C για 1 sec, και 95 °C για 5 sec, 65 °C για 1 λεπτό, 97 °C για 30 sec.

Πίνακας 13: Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών των αντιδράσεων *Real-Time PCR*

<i>Συστατικά αντίδρασης Real-Time PCR</i>	<i>Συγκέντρωση/Ποσότητα</i>
<i>cDNA</i>	<i>1/10 αραίωση</i>
<i>Εκκινητές</i>	<i>200 nM</i>
<i>KAPA SYBR FAST qPCR</i>	<i>1x</i>

2.5.3 Αλληλούχηση ολικού RNA

Η αλληλούχηση του ολικού RNA που απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Dr. Katherine Bohnsack και την υποψήφια διδάκτορα Chairini Thome στο NGS Integrative Genomics Core Unit (NIG) του Πανεπιστημίου του Γκέτινγκεν στη Γερμανία. 10 µg ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA βιβλιοθηκών με τη χρήση του kit TrueSeq Stranded Total RNA της εταιρίας Illumina (San Diego, USA), αφού είχε προηγηθεί η απομάκρυνση των ριβοσωμικών RNA. Το cDNA που κατασκευάστηκε αλληλουχήθηκε με τη μέθοδο HiSeq 4000 Sequencing System (Illumina, San Diego, USA). Η ποιότητα των τμημάτων που προέκυψαν μετά την αλληλούχηση ελέγχθηκε με το πρόγραμμα FASTQC (v0.11.9). Για την ταυτοποίηση των τμημάτων αυτών έγινε στοίχιση με το πρότυπο ανθρώπινο γονιδίωμα GRCh38.p13 (hg38) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STAR (v2.7.10a). Η ανάλυση της διαφορικής ρύθμισης των RNA μεταξύ των συγκρινόμενων συνθηκών έγινε με το πρόγραμμα DESeq2 (v1.36.0).

2.6 Μέθοδοι μελέτης βιολογικών διεργασιών στις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων μελέτης βιολογικών διεργασιών στις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In, η πορεία της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1^η μέρα: Επίστρωση 5.000 κυττάρων σε φρεάτια τρυβλίων καλλιέργειας 96-φρεατίων για τα πειράματα μέτρησης κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή 180.000 σε φρεάτια τρυβλίων καλλιέργειας 6-φρεατίων για το πείραμα προσδιορισμού της μεταναστευτικής ικανότητας.

2^η μέρα: Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA έναντι της EXOSC10 για την αποσιώπηση της έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης (βλ. Γ.2. Μέθοδοι - 2.3.4 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με siRNA – Αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών)

3^η μέρα: Προσθήκη στο θρεπτικό μέσο δοξυκυκλίνης και επώαση για 5 ώρες (βλ. Γ.2. Μέθοδοι - 2.3.5 Επίδραση ουσιών ή υποξίας σε ευκαρυωτικά κύτταρα) με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών FLAG και FLAG-EXOSC10. Μετά το πέρας της επώασης αυτής, ξεκίνησε η μέτρηση των χρονικών διαστημάτων των 0, 24 και 48 ωρών για τις διαδικασίες που αναφέρονται παρακάτω.

2.6.1 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων HeLa Flp-In προσδιορίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System της εταιρίας TaKaRa (Otsu, Shiga, Japan). Πρόκειται για μία χρωματομετρική μέθοδο κατά την οποία το τετραζόλιο (σε μορφή άλατος) που προστίθεται στα κύτταρα, μετατρέπεται σε προϊόν φορμαζάνης (απορροφά στα 490 nm) από τις αφυδρογονάσεις των ενεργών μεταβολικά κυττάρων.

Πειραματική διαδικασία

Για την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης προστέθηκε στα κύτταρα μίγμα WST-1 και θρεπτικού DMEM +/- σε αναλογία 1:10 και πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 ώρα στον επωαστικό κλίβανο. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης έγινε στα 490 nm με τη χρήση του μηχανήματος Tecan Spark Multimode microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.6.2 Μέτρηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7

Η απόπτωση των κυττάρων HeLa Flp-In προσδιορίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Caspase-Glo της εταιρίας Promega. Το αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της απόπτωσης μέσω του

προσδιορισμού της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7 με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, περιέχει μία λουσιφεράση και το υπόστρωμα της το οποίο είναι σε σύντηξη με την τετραπεπτιδική αλληλουχία DEVD. Η αλληλουχία αυτή αναγνωρίζεται από τις κασπάσες 3/7, οι οποίες δρουν, ελευθερώνοντας το υπόστρωμα της λουσιφεράσης. Έτσι, η ένταση του φωτός που εκπέμπεται σε κάθε δείγμα είναι ανάλογη της δράσης των κασπασών 3/7.

Πειραματική διαδικασία

Για την μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών 3/7, τα κύτταρα λύθηκαν με τη χρήση μίγματος αντιδραστήριου Caspase-Glo και θρεπτικού μέσου DMEM +/- σε αναλογία 1:1 και πραγματοποιήθηκε επώαση για 30 λεπτά υπό ανάδευση στο σκοτάδι. Η μέτρηση της χημειοφωταύγειας έγινε με τη χρήση του μηχανήματος Tecan Spark Multimode microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.6.3 Δοκιμασία επούλωσης τραύματος

Η μετανάστευση των κυττάρων HeLa Flp-In προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να μετακινούνται εντός μίας κενής περιοχής («πληγής») στο τρυβλίο καλλιέργειας. Κατά την δοκιμασία αυτή, μειώνεται η συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, ώστε να ανασταλεί εν μέρη ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και έτσι, οι παρατηρούμενες αλλαγές στην πλήρωση της κενής περιοχής να οφείλονται κατά βάση στη μετακίνηση των κυττάρων και όχι στον πολλαπλασιασμό τους.

Πειραματική διαδικασία

Στα επιστρωμένα κύτταρα HeLa Flp-In, τα οποία αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να σχηματίζουν μία πλήρης πυκνότητας μονοστοιβάδα, έγινε απόξεση των κυττάρων με τη μορφή μίας κάθετης τομής διαμέσου του τρυβλίου με τη χρήση ρύγχους. Αμέσως ακολούθησε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε DMEM με περιεκτικότητα ορού FBS 1 %. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν και έγινε παρατήρηση του εμβαδού της τομής σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης για τα χρονικά διαστήματα των 0, 24 και 48 ωρών.

2.7 Προγράμματα βιοπληροφορικής, στατιστικής ανάλυσης και οπτικοποίησης

⇒ GraphPad Prism 6

Η στατιστική επεξεργασία και οπτικοποίηση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του πακέτου GraphPad Prism 6, τα οποία εκφράζονται στα διαγράμματα ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (Standard deviation, SD). Η σύγκριση μεταξύ δύο συνθηκών έγινε με τη δοκιμασία Student's t-test, ενώ η σύγκριση πολλαπλών συνθηκών έγινε με τη δοκιμασία ANOVA, όπου ****P < 0.0001, ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05, ns: εκτός στατιστικής σημαντικότητας.

⇒ ImageJ

Οι εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα FiJi-ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Για την ποσοτικοποίηση του σήματος της EXOSC10, στα αρχικά αρχεία εικόνων (8-bit) έγινε αφαίρεση του θορύβου ("subtract background"). Με τη χρήση του εργαλείου "threshold" καθορίστηκαν τα όρια συνολικά των κυττάρων, των πυρηνίσκων και των πυρήνων για κάθε κύτταρο και στη συνέχεια υπολογίστηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα "integrated density" (IntDen) για το κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Οι τιμές ενσωματωμένης πυκνότητας του πυρηνόπλάσματος προέκυψαν μετά από αφαίρεση των τιμών των πυρηνίσκων από τις αντίστοιχες για κάθε κύτταρο τιμές του πυρήνα ($\text{IntDen}_{\text{πυρηνόπλασμα}} = \text{IntDen}_{\text{πυρήνας}} - \text{IntDen}_{\text{πυρηνίσκος}}$), ενώ του κυτταροπλάσματος μετά από αφαίρεση των τιμών των πυρήνων από τις αντίστοιχες για κάθε κύτταρο συνολικά τιμές ($\text{IntDen}_{\text{κυτταρόπλασμα}} = \text{IntDen}_{\text{ολικό}} - \text{IntDen}_{\text{πυρήνας}}$).

⇒ Rstudio

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης του RNA, καθώς και η ανάλυση οντολογίας (GOanalysis) έγιναν με τη χρήση του προγράμματος Rstudio.

⇒ BioRender

Η δημιουργία των σχηματικών απεικονίσεων που παρουσιάζονται στη παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε με τη χρήση του προγράμματος σχεδίασης BioRender (Toronto, Canada).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως, αναφέρεται στην εισαγωγή (βλ. Α.Εισαγωγή-2.3 Ρύθμιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης από την υποξία), ποσοτική πρωτεομική ανάλυση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα HeLa (262), αποκάλυψε μία ομάδα πρωτεϊνών-στόχων των οποίων η σουμοϋλίωση αλλάζει στην υποξία (1% O₂), χωρίς να αλλάζουν τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα, υποδηλώνοντας τη πιθανή βιολογική σημασία της ρύθμισης αυτής για την κυτταρική απόκριση και προσαρμογή στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου.

Ένας από τους στόχους με την μεγαλύτερη παρατηρούμενη αλλαγή ήταν ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποικοδόμηση και επεξεργασία RNA, η εξωριβονουκλεάση EXOSC10 (296). Το ένζυμο αυτό βρέθηκε ότι σουμοϋλιώνεται, συγκεκριμένα από την SUMO-1 ισομορφή, και η τροποποίηση αυτή μειώθηκε δραματικά στην υποξία, ενώ όπως αναφέρεται παραπάνω δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση της (262).

Στόχος λοιπόν της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η λεπτομερής μελέτη τόσο του μηχανισμού σουμοϋλίωσης της EXOSC10 όσο και του βιολογικού ρόλου της τροποποίησης αυτής στο πλαίσιο της κυτταρικής απόκρισης κατά την υποξία (1% O₂).

1. Μελέτη του μηχανισμού σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην υποξία

1.1 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας και της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων HIF στη σουμοϋλίωση και στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10

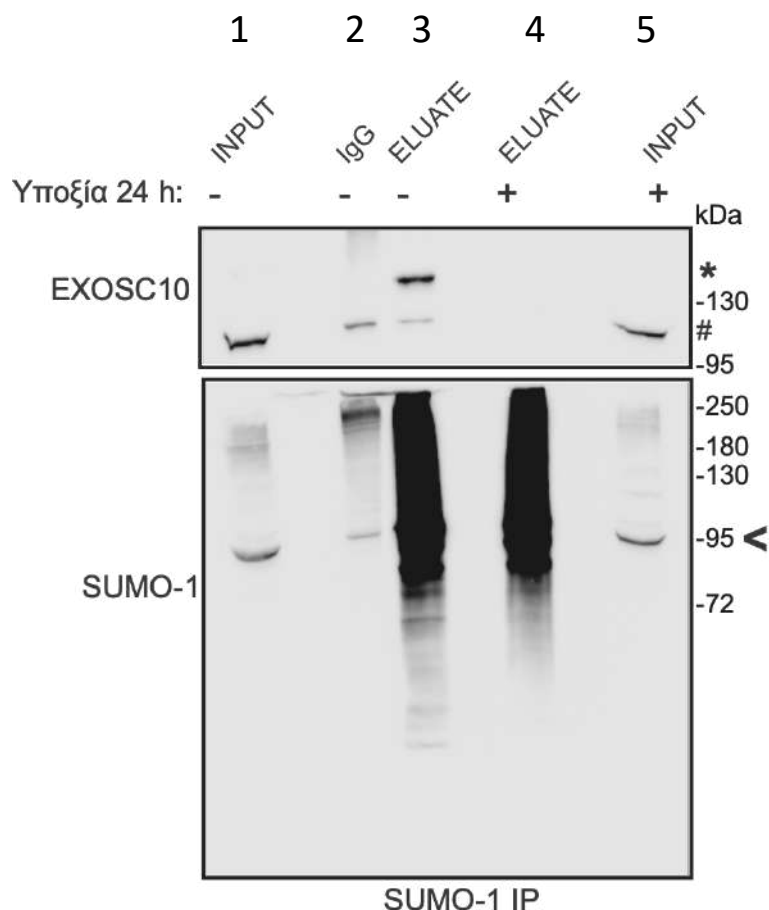
1.1.1 Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στην σουμοϋλίωση της ενδογενούς EXOSC10

Για την επιβεβαίωση των προηγούμενων δημοσιευμένων αποτελεσμάτων μελέτης της αποσουμοϋλίωσης της EXOSC10 σε κύτταρα HeLa, αλλά και για τον έλεγχο της καθολικότητας ή ιστοειδικότητας του φαινομένου αυτού, μελετήθηκε μία δεύτερη κυτταρική σειρά, τα HEK293 (εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα), ως προς την σουμοϋλίωση της EXOSC10 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O₂).

Κύτταρα HEK293 επώαστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία (1% O₂), τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα παραλήφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα

ανοσοκατακρήμνισης των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών, σύμφωνα με γνωστό δημοσιευμένο πρωτόκολλο (βλ. Γ.2.Μέθοδοι - 2.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών). Για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SUMO-1, ενώ κυτταρικά εκχυλίσματα επωάστηκαν επίσης με σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με ανοσοσφαιρίνες IgG (συνθήκη αρνητικού μάρτυρα). Δείγματα των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων πριν την έναρξη της ανοσοκατακρήμνισης (inputs), καθώς και τα εκλούσματα των συζευγμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών (eluates) που προέκυψαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην εικόνα 14.

Όσον αφορά στην ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs), χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της EXOSC10 και της SUMO-1 βλέπουμε ότι τόσο η έκφραση της ενδογενούς EXOSC10 όσο και των συνολικά σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών από την SUMO-1, δεν αλλάζει σημαντικά ανάμεσα στην νορμοξία και την υποξία (Εικόνα 14, διαδρομές 1 και 5). Όσον αφορά την ανάλυση των εκλουσμάτων (eluates),δείχθηκε με αντίσωμα έναντι της SUMO-1 ότι τόσο στην νορμοξία (Εικόνα 14, διαδρομή 3), όσο και στην υποξία (Εικόνα 14, διαδρομή 4) κατακρημνίστηκε ίση ποσότητα σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών, όπως φαίνεται και από τα επίπεδα της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζεται με <). Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, επιβεβαίωσε την σουμοϋλίωση της στη νορμοξία (Εικόνα 14, διαδρομή 3, με # συμβολίζεται η μη τροποποιημένη ενδογενής πρωτεΐνη, ενώ 20 kDa περίπου ανοδικά, με * η σουμοϋλιωμένη μορφή της), ενώ η σουμοϋλίωση εξαφανίστηκε στην υποξία (Εικόνα 14, διαδρομή 4), επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα σε καρκινικά κύτταρα HeLa (262).



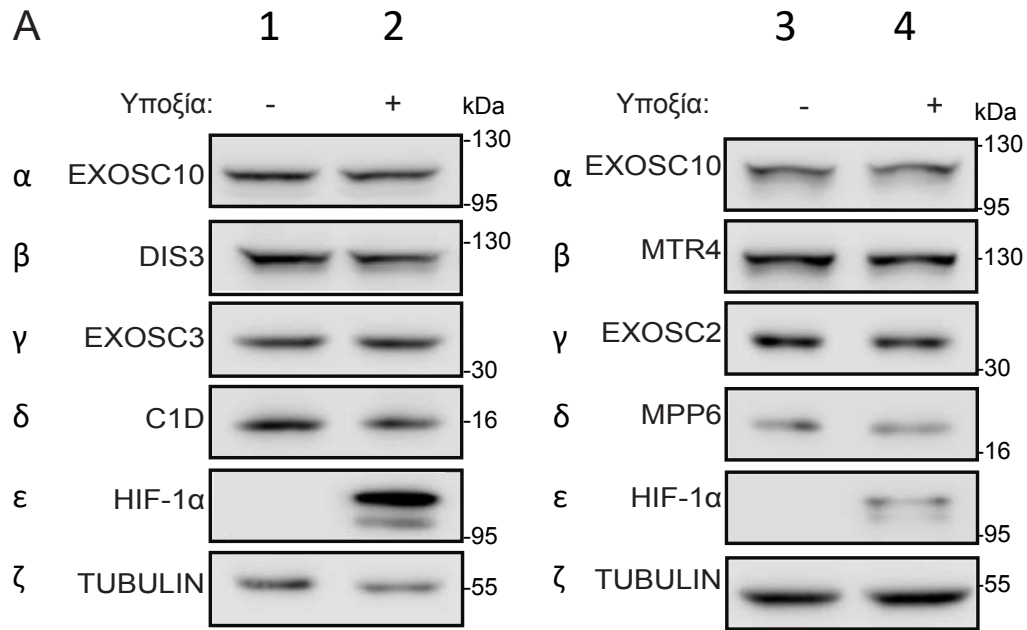
Εικόνα 14: Η EXOSC10 αποσυνμοϋλιώνεται στην υποξία στα κύτταρα HEK293. Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 σε κύτταρα HEK293 που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας (1% O₂) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα των σφαιριδίων (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10 και της SUMO-1 (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με * και η μη τροποποιημένη μορφή με #. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Εκτός της σουμοϋλίωσης, έγιναν πειράματα μελέτης των ενδογενών πρωτεϊνικών επιπέδων της EXOSC10 αλλά και άλλων συστατικών του RNA εξωσώματος σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂). Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία και υποξία, τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα παραλήφθηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 15).

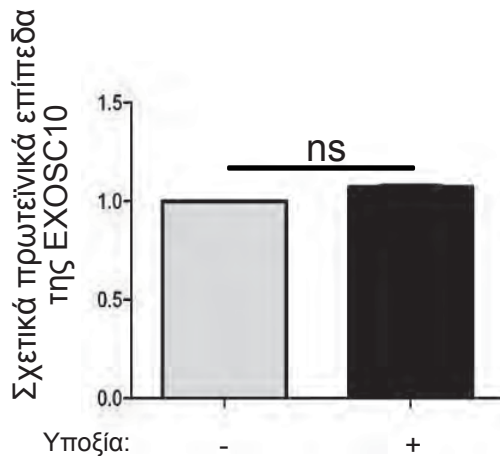
Αρχικά, η ανίχνευση του HIF-1α με ειδικό αντίσωμα, επιβεβαίωσε την ύπαρξη υποξίας στο συγκεκριμένο πείραμα (Εικόνα 15, πάνελ ε, διαδρομές 2 και 4). Με

αντίσωμα έναντι της ενδογενούς EXOSC10, φαίνεται η έκφραση της στην υποξία, η οποία δεν διαφέρει σε σύγκριση με την έκφραση της στη νορμοξία (Εικόνα 15, πάνελ α, διαδρομές 2 και 4, σε σχέση με τις διαδρομές 1 και 3). Μετά από ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της EXOSC10 από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) (Εικόνα 15B), επιβεβαιώθηκε ότι η υποξία δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την έκφραση της ενδογενούς EXOSC10.

Ομοίως, ελέγχθηκε και η έκφραση των υπόλοιπων υπομονάδων του RNA εξωσώματος στην υποξία. Με ειδικό αντίσωμα έναντι της DIS3,δείχθηκε ότι η έκφραση ούτε της δεύτερης καταλυτικής υπομονάδας, πέραν της EXOSC10, επηρεάζεται στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία (Εικόνα 15, πάνελ 1, σύγκριση διαδρομών 1 και 2), ενώ το ίδιο δείχθηκε και για τις δομικές πρωτεΐνες του «καπακιού» EXOSC2 (Εικόνα 15, πάνελ γ, σύγκριση διαδρομών 3 και 4) και EXOSC3 (Εικόνα 15, πάνελ γ, σύγκριση διαδρομών 1 και 2) και για τους συμπαραγόντες της EXOSC10, C1D (Εικόνα 15, πάνελ δ, σύγκριση διαδρομών 1 και 2), MPP6 (Εικόνα 15, πάνελ δ, σύγκριση διαδρομών 3 και 4) και MTR4 (Εικόνα 15, πάνελ β, σύγκριση διαδρομών 3 και 4).



B



Εικόνα 15: Η έκφραση της ενδογενούς *EXOSC10* και άλλων υπομονάδων του *RNA* εξωσώματος δεν επηρεάζεται από την υποξία. *A)* Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων του *RNA* εξωσώματος, *EXOSC10*, *DIS3*, *EXOSC3*, *C1D*, *MTR4*, *EXOSC2* και *MPP6* σε κύτταρα *HeLa* που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας (1% O_2) με *SDS-PAGE* και ανοσοαποτύπωση κατά *Western*. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των ενδογενών *EXOSC10*, *DIS3*, *EXOSC3*, *C1D*, *MTR4*, *EXOSC2* και *MPP6*, του *HIF-1α* (δείκτης δράσης υποξίας) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). *B)* Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της *EXOSC10* σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (+). Στον άξονα *Y*, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές των επιπέδων της *EXOSC10* κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα προκύπτουν

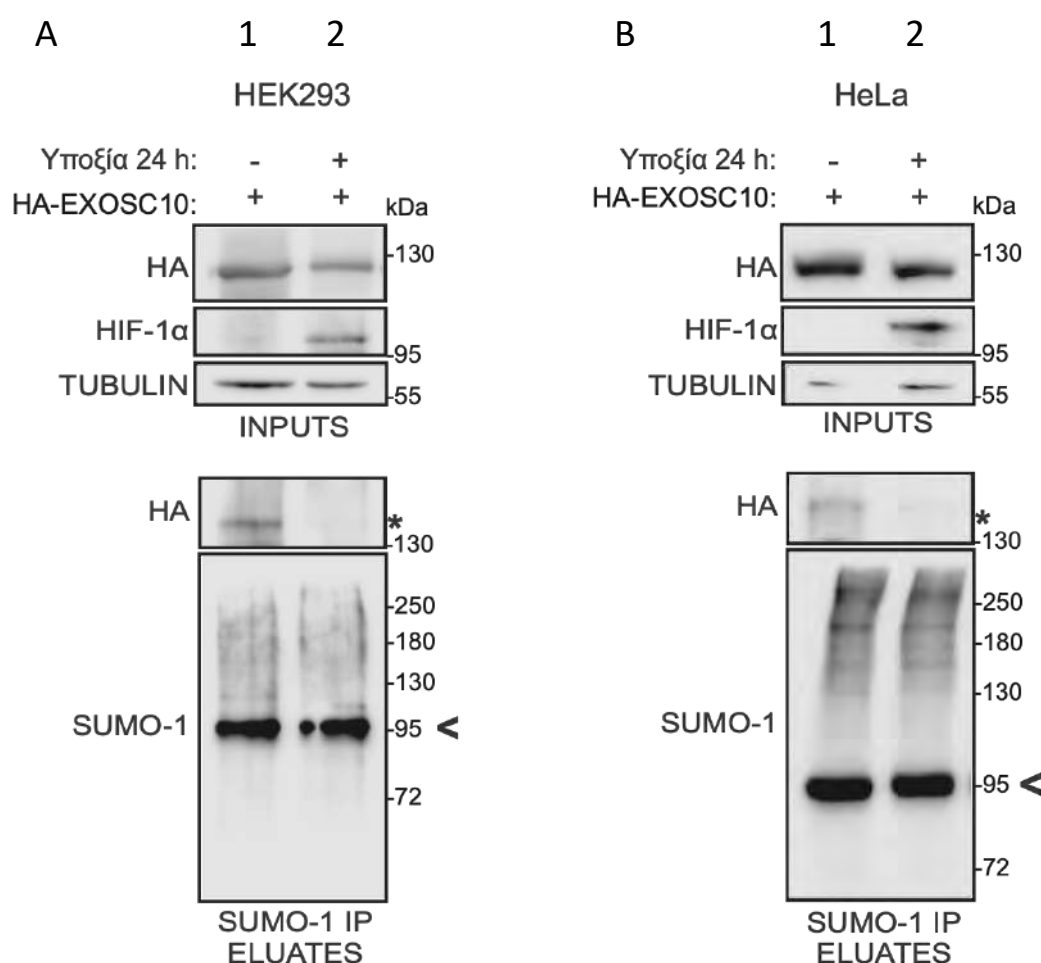
από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα (ns , $P > 0.05$). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) και η στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.

1.1.2 Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στην σουμοϋλίωση της υπερεκφρασμένη HA-EXOSC10

Αντίστοιχο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης και ανίχνευσης της σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 (βλ. 1.1.1), επαναλήφθηκε με την υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου μορφή της. Κύτταρα HEK293 και HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που φέρει κλωνοποιημένη την αλληλουχία για την έκφραση της αγρίου τύπου EXOSC10 σε σύντηξη με τον επίτοπο HA (βλ. Γ. 2.Μέθοδοι - 2.3.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια). Τα κύτταρα επώσθησαν αντίστοιχα στην νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες και στη συνέχεια στα κυτταρικά λύματα πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (SUMO-1 IP). Τα δείγματα των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και τα εκλούσματα (eluates) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western και παρουσιάζονται στην εικόνα 16.

Όσον αφορά την ανάλυση των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs), χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1α, ανιχνεύθηκε η σταθεροποίηση του ως ένδειξη ύπαρξης υποξίας (εικόνα 16A, διαδρομή 2 και εικόνα 16B, διαδρομή 2), ενώ με αντισώματα έναντι του επιτόπου HA και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος inputs) επιβεβαιώθηκε η επιτυχής έκφραση της HA-EXOSC10 σε όμοια επίπεδα στις συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, τόσο στα κύτταρα HEK293 (εικόνα 16A, διαδρομές 1 και 2), όσο και στα κύτταρα HeLa (εικόνα 16B, διαδρομές 1 και 2). Όσον αφορά στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της SUMO-1 επιβεβαιώθηκε η ίση ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε νορμοξία και υποξία, λαμβάνοντας υπόψιν και τα επίπεδα της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων) (εικόνα 16A, διαδρομές 1 και 2 και εικόνα 16B, διαδρομές 1 και 2). Ανοσοανίχνευση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA, έδειξε την σουμοϋλίωση και της υπερεκφρασμένης HA-EXOSC10 στην νορμοξία (εικόνα 16A, διαδρομή 1 και εικόνα 16B, διαδρομή 1, η σουμοϋλιωμένη μορφή σημειώνεται με *), η οποία μειώθηκε κατά πολύ στην υποξία (εικόνα 16A, διαδρομή 2 και εικόνα 16B,

διαδρομή 2) και στις δύο κυτταρικές σειρές, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα (της 1.1.1) για την ενδογενή πρωτεΐνη.



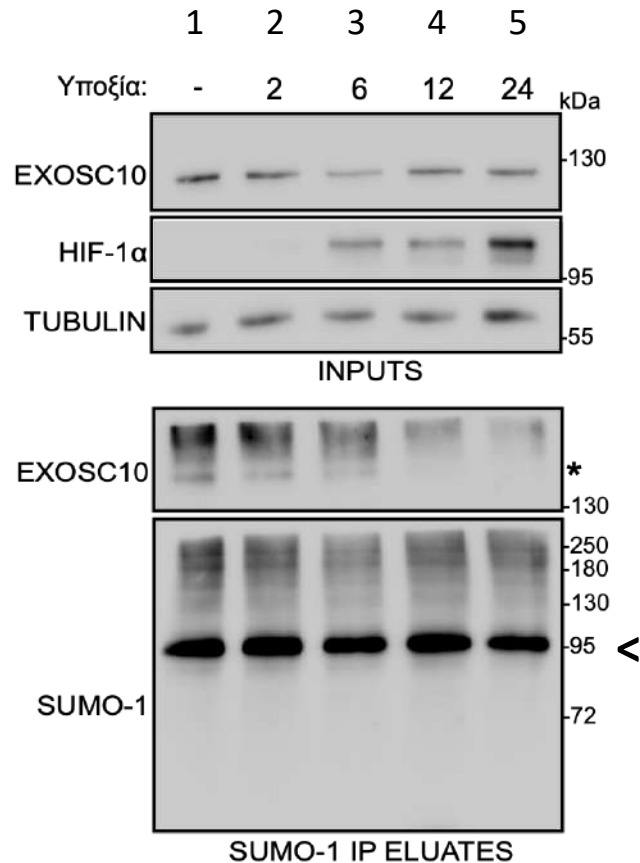
Εικόνα 16: Η υπερεκφρασμένη HA-EXOSC10 αποσυμυλιώνεται στην υποξία. Έλεγχος της συμυλίωσης της υπερεκφρασμένης HA-EXOSC10 σε κύτταρα HEK293 (A) και HeLa (B) που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας (1% O₂) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα των σφαιριδίων (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του επιτόπου HA για την ανίχνευση της υπερεκφρασμένης HA-EXOSC10, του HIF-1α (δείκτης δράσης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης συμυλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Σε κάθε περίπτωση, αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η συμυλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με * και η μη τροποποιημένη μορφή με #. Με < συμβολίζεται η συμυλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Από τα παραπάνω πειράματα, προκύπτει λοιπόν, ότι η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 συμβαίνει στην υποξία σε καρκινικά (HeLa) και μη καρκινικά κύτταρα (HEK293) και η ρύθμιση αυτή δεν οφείλεται σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης.

1.1.3 Διερεύνηση του ρόλου των μεταγραφικών παραγόντων HIF στην αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 κατά την υποξία

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η παρατηρούμενη αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 σχετίζεται με την επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων HIF και την εξαρτώμενη από τους HIF μεταγραφική ρύθμιση, κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 2, 6, 12 και 24 ώρες στην υποξία (1% O₂) και τα επίπεδα σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 αναλύθηκαν με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης SUMO-1 IP. Στην εικόνα 17, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και των εκλουσμάτων (eluates) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Όσον αφορά την ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs), χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της υπομονάδας HIF-1α δείχθηκε η σταθεροποίηση της μετά το πέρας 6 ωρών επώασης στην υποξία, με τα επίπεδα της να εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένα στις 24 ώρες (εικόνα 17, διαδρομές 3,4 και 5). Στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της SUMO-1, επιβεβαιώθηκε η ίση ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε όλες τις συνθήκες λαμβάνοντας υπόψιν και τα επίπεδα της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζεται με <) (εικόνα 17, διαδρομές 1-5). Μετά από ανοσοανίχνευση με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, φάνηκε η σουμοϋλίωση της στην νορμοξία (εικόνα 17, διαδρομή 1, συμβολίζεται με *), τα επίπεδα της οποίας ξεκίνησαν να μειώνονται από τις 2 κιόλας πρώτες ώρες στην υποξία, φτάνοντας τις 24 ώρες όπου και εξαφανίστηκαν πλήρως, όπως ήταν αναμενόμενο (εικόνα 17, διαδρομές 2-5). Άρα, η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 λαμβάνει χώρα κατά τις πρώτες κιόλας ώρες της υποξίας και συμβαίνει ασυγχρόνιστα από την σταθεροποίηση του HIF-1α.

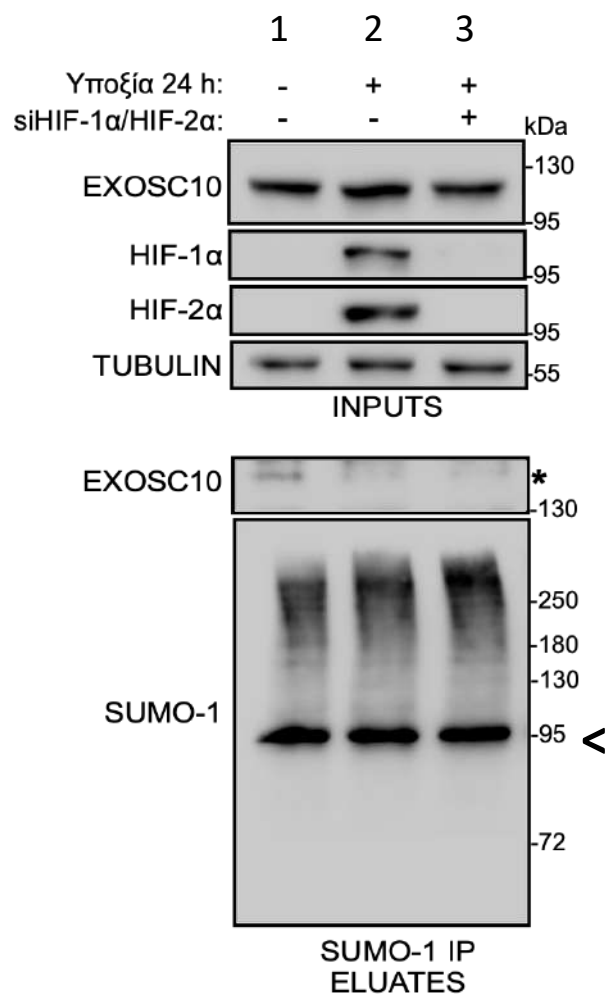


Εικόνα 17: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας στην αποσυνυμύλιωση της EXOSC10. Έλεγχος της συνυμύλιωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν στη νορμοξία ή για 2, 6, 12 και 24 ώρες (διαδρομές 2-5) στην υποξία (1% O₂) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα των σφαιριδίων (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, του HIF-1α (δείκτης δράσης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης συνυμυλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η συνυμυλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η συνυμυλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Προκειμένου να διευκρινιστεί πλήρως η πιθανή σχέση του φαινομένου της αποσυνυμύλιωσης της EXOSC10 και της δράσης των παραγόντων HIF, επαναλήφθηκε το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης SUMO-1 IP, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa στα οποία είχε προηγηθεί η παροδική αποσιώπηση δυο ισομορφών των HIFα (βλ. Γ.2.Μέθοδοι - 2.3.4 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με siRNA – Αποσιώπηση της έκφρασης πρωτεϊνών). Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα siRNA έναντι των HIF-1α και HIF-2α για 24

ώρες και στην συνέχεια επωάστηκαν εκ νέου για επιπλέον 24 ώρες στην υποξία (1% O₂). Ως κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα νορμοξικών ή υποξικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν με non-targeting siRNA (αναφέρεται ως sint). Στην εικόνα 18B αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και των εκλουσμάτων (eluate) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αρχικά, στα ολικά εκχυλίσματα, με αντισώματα έναντι των HIF-1α και HIF-2α ανιχνεύτηκε η σταθεροποίηση τους στην συνθήκη κοντρόλ της υποξίας (εικόνα 18, διαδρομή 2), ενώ τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα μειώθηκαν δραματικά στη συνθήκη με το siRNA που τους στοχεύει (εικόνα 18, διαδρομή 3). Με αντίσωμα έναντι της EXOSC10,δείχθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δεν επηρεάστηκαν από την απουσία των HIF-α, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της EXOSC10 στην υποξία δεν ελέγχεται από την σταθεροποίηση των παραγόντων HIF. Στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της SUMO-1 και την ανίχνευση των επιπέδων της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζονται με <), επιβεβαιώθηκε η ίση ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε όλες τις συνθήκες. Όσον αφορά την EXOSC10, μετά από χρήση του κατάλληλου αντισώματος, ανιχνεύθηκε επιτυχώς η σουμοϋλιωμένη μορφή της στην νορμοξία (εικόνα 18, διαδρομή 1, συμβολίζεται με *), η οποία μειώθηκε και πάλι στην υποξία όπως ήταν αναμενόμενο (εικόνα 18, διαδρομή 2). Αντίστοιχη, όμως μείωση παρουσιάστηκε και στην υποξία απουσία των HIF-α (εικόνα 18, διαδρομή 3), υποδεικνύοντας πως πέραν της έκφρασης, ούτε η σουμοϋλίωση της EXOSC10 εξαρτάται από την σταθεροποίηση των παραγόντων HIF στην υποξία.

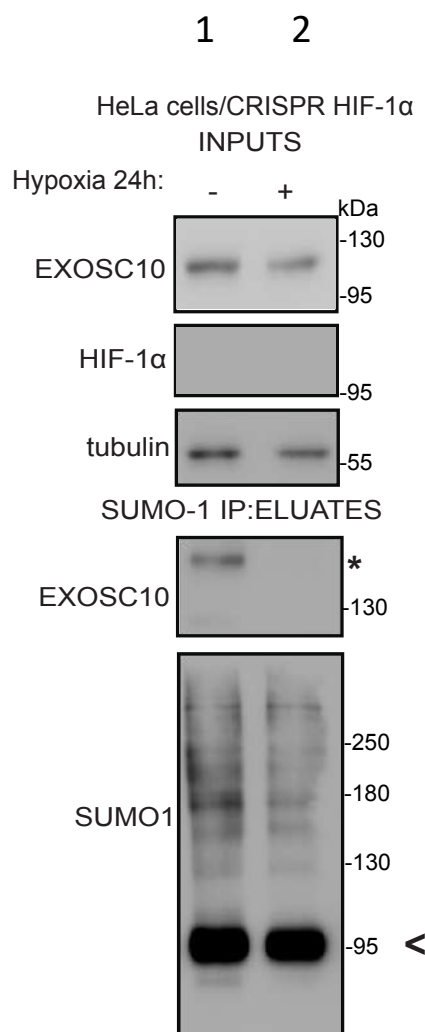


Εικόνα 18: Η αποσυνμούλιωση της EXOSC10 κατά την υποξία είναι ανεξάρτητη της δράσης των HIF. Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία διαμολύνθηκαν είτε με nt siRNA (-), είτε με siRNA έναντι των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α (+) και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα των σφαιριδίων (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α (έλεγχος αποσιώπησης και δείκτες δράσης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Πέραν των κυττάρων HeLa στα οποία έγινε παροδική αποσιώπηση των υπομονάδων HIFα, για το ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα HeLa στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο για την έκφραση του HIF-1α με τη τεχνολογία

CRISPR/Cas9, ενώ παράλληλα ο συγκεκριμένος αυτός κυτταρικός κλώνος S3 δεν εκφράζει τον HIF-2α. Τα κύτταρα αυτά αναφέρονται ως HeLa S3^{HIF-1α⁻/HIF-2α⁻}, κατασκευάστηκαν από την Υποψ. διδάκτορα Χριστίνα Αρσένη ως κομμάτι της διδακτορικής της διατριβής (Ερευνητική ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή Ηλία Μυλωνή, μέλος του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) και αποτέλεσαν ευγενική παραχώρηση. Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα, τα κύτταρα HeLa S3^{HIF-1α⁻/HIF-2α⁻} επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία για 24 ώρες και τα επίπεδα σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 αναλύθηκαν με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης SUMO-1 IP. Στην εικόνα 19B αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και των εκλουσμάτων (eluate) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Όσον αφορά τα ολικά εκχυλίσματα, με αντίσωμα έναντι της υπομονάδα HIF-1α επιβεβαιώθηκε η αδυναμία έκφρασης της (εικόνα 19, διαδρομή 2), ενώ με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, δείχθηκε και πάλι ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δεν επηρεάζονται απουσία του HIF-1α (εικόνα 19, σύγκριση διαδρομών 1 και 2), συμφωνώντας με το προηγούμενο πείραμα αποσιώπησης. Στα εκλούσματα, επιβεβαιώθηκε η ίση ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών στις δύο συνθήκες με τον έλεγχο των επιπέδων της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζονται με <). Με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, ανιχνεύτηκε επιτυχώς η σουμοϋλίωση της στην νορμοξία (εικόνα 19, διαδρομή 1, συμβολίζεται με *), η οποία εξαφανίστηκε στην υποξία (εικόνα 19, διαδρομή 2), επαληθεύοντας τα αποτελέσματα του πειράματος αποσιώπησης των HIF-α (Εικόνα 18).



Εικόνα 19: Η αποσυμυλίωση της EXOSC10 κατά την υποξία είναι ανεξάρτητη της δράσης των HIF. Έλεγχος της συμυλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa S3^{HIF-1α-/-/HIF-2α-/-}, τα οποία δεν εκφράζουν τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α, και επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα των σφαιριδίων (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, του HIF-1α, της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης συμυλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η συμυλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η συμυλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

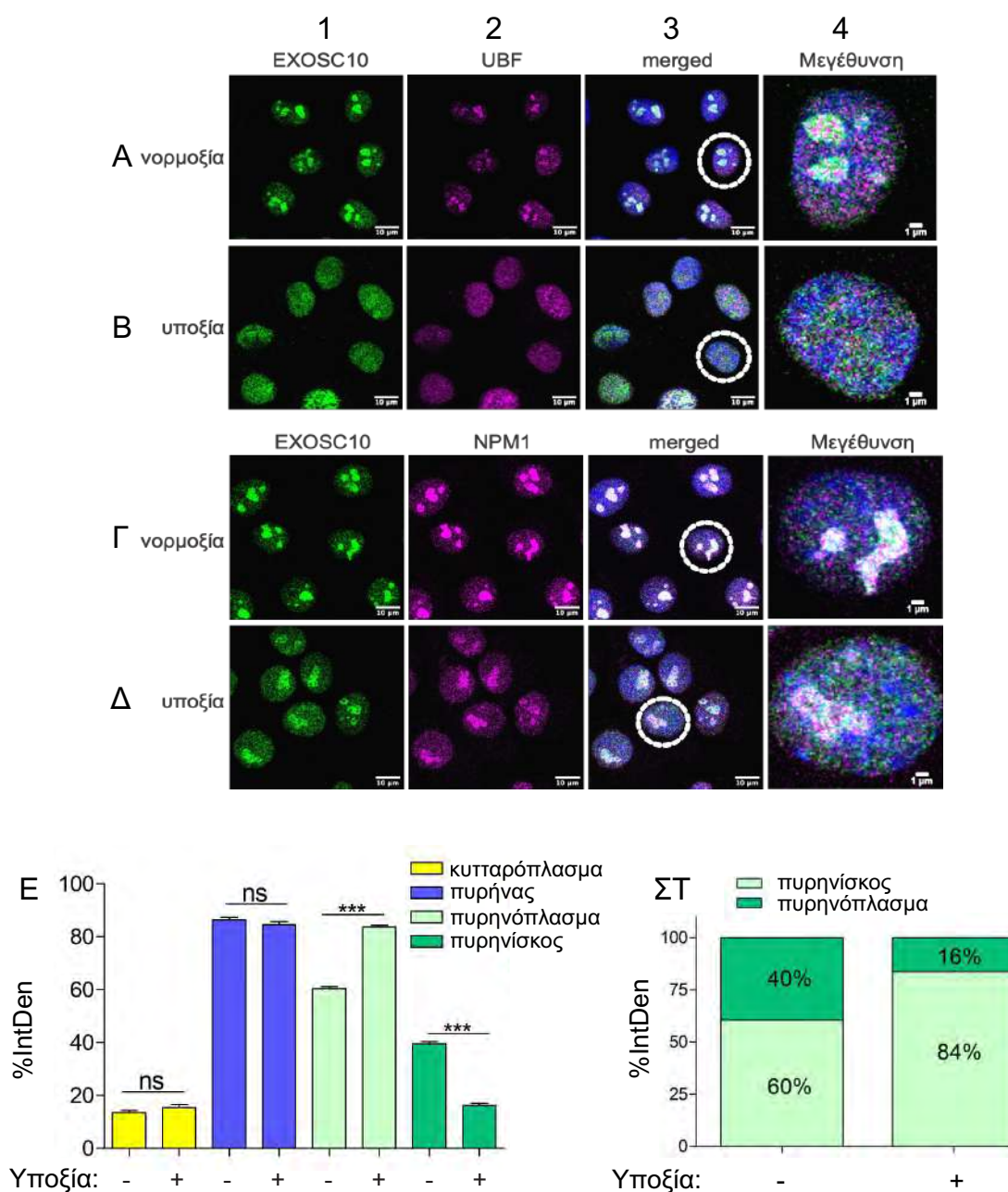
Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι η υποξία δεν επηρεάζει τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της EXOSC10 αλλά προκαλεί την

αποσουμοϋλίωση της, η οποία συμβαίνει άμεσα και ανεξάρτητα από την σταθεροποίηση και δράση των παραγόντων HIF.

1.1.4 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10 και πρωτεϊνών του πυρηνίσκου

Με αφορμή προηγούμενα προκαταρκτικά πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού που έδειξαν μετακίνηση της EXOSC10 στην υποξία σε καρκινικά κύτταρα (Φιλιπποπούλου Χ., μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, 2019) αλλά και προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως το αποτέλεσμα της αποσουμοϋλίωσης στην βιολογική λειτουργία της EXOSC10, πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου.

Ειδικότερα, ελέγχθηκε η επίδραση της υποξίας στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10 και άλλων χαρακτηριστικών ενδογενών πρωτεϊνών των πυρηνίσκων. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και ακολούθησε πείραμα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλ. Γ.2.Μέθοδοι - 2.4.7 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό). Όσον αφορά την EXOSC10, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα, με ιδιαίτερο εμπλουτισμό στους πυρηνίσκους (Εικόνα 20, A1 και Γ1, πράσινη χρώση), όπως φαίνεται από τον συνεντοπισμό της με 2 πρωτεΐνες μάρτυρες του πυρηνίσκου ((Εικόνα 20, A3 και Γ3 και αντίστοιχη μεγέθυνση A4 και Γ4). Η πρώτη είναι η πρωτεΐνη UBF (Upstream Binding Factor) (Εικόνα 20, A2, μωβ χρώση), η οποία εντοπίζεται κυρίως στο ινιδικό κέντρο (fibrillar center) του πυρηνίσκου και συμμετέχει στην μεταγραφή του ριβοσωμικού DNA (301). Η δεύτερη είναι η NPM1 (Εικόνα 20, Γ2, μωβ χρώση), η οποία εντοπίζεται κυρίως στο κοκκιώδες μέρος (granular component) του πυρηνίσκου και όπως αναφέρεται στην εισαγωγή, συμμετέχει στην βιογένεση των ριβοσωμάτων (302). Μετά την επώαση των κυττάρων για 24 ώρες στην υποξία, το σήμα της EXOSC10 στους πυρηνίσκους μειώθηκε, ενώ αυξήθηκε το σήμα της στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 20, B1 και Δ1, πράσινη χρώση). Ομοίως, το σήμα στους πυρηνίσκων τόσο της UBF (Εικόνα 20, B2, μωβ χρώση) όσο και της NPM1 (Εικόνα 20, Δ2, μωβ χρώση) μειώθηκε, με παράλληλη αύξηση του σήματος τους στο πυρηνόπλασμα.



Εικόνα 20: Η υποξία επάγει την πυρηνική μετακίνηση της EXOSC10. Α) Έλεγχος του εντοπισμού των ενδογενών EXOSC10, UBF (πάνελ Α-Β) και NPM1 (πάνελ Γ-Δ) σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες με συνεστιάκη μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών (EXOSC10: πράσινη χρώση 1Α-Δ, UBF/NPM1: μωβ χρώση, 2Α-Β και 2Γ-Δ αντίστοιχα), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε χρώση, στήλη 3). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm ή 1 μm. Με άσπρο διακεκομμένο πλαίσιο σημαίνεται το κύτταρο που παρουσιάζεται σε μεγέθυνση της κλίμακας 1μm (στήλη 4). Β) Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης EXOSC10 σε κυτταρόπλασμα (κίτρινο), πυρήνα (μπλε), πυρηνίσκους (σκούρο πράσινο) και πυρηνόπλασμα

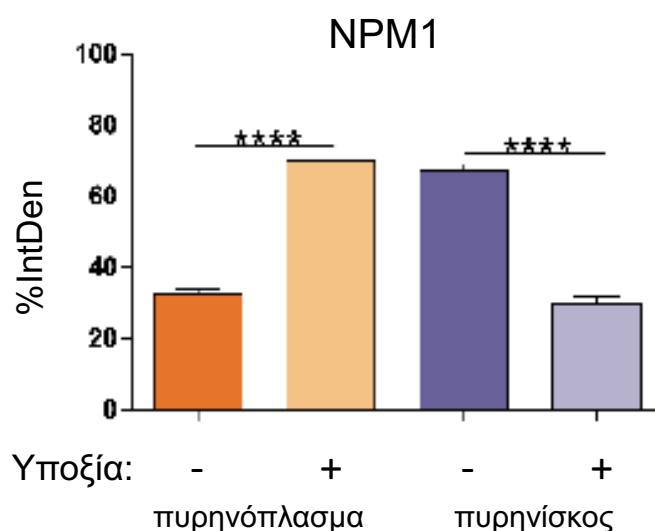
(ανοιχτό πράσινο) σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (1% O₂) (+). Συμπεριλήφθηκαν 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα από τα οποία αναλύθηκαν συνολικά 110 κύτταρα για κάθε συνθήκη (n=100, ***P < 0.001, ns >0.05). Για κάθε κύτταρο υπολογίσθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) των πυρήνων, του πυρηνοπλάσματος και των πυρηνίσκων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εκφράστηκαν ως ποσοστά του συνολικού σήματος ανά κύτταρο. Γ) Έκφραση των αποτελεσμάτων της παραπάνω ποσοτικοποίησης του σήματος φθορισμού της ενδογενούς EXOSC10 ως λόγοι του σήματος πυρηνίσκου/πυρήνα (σκούρο πράσινο) και πυρηνοπλάσματος/πυρήνα (ανοιχτό πράσινο). Η δημιουργία των διαγραμμάτων και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο λόγος του σήματος της EXOSC10 στον πυρηνίσκο σε σχέση με το σήμα στο πυρηνόπλασμα, μετρήθηκε το σήμα φθορισμού της σε κυτταρόπλασμα, πυρήνα, πυρηνόπλασμα και πυρηνίσκους σε νορμοξία και υποξία από 3 ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα, όπου συνολικά μετρήθηκαν 110 κύτταρα ανά συνθήκη. Για την ποσοτικοποίηση αυτή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ (βλ. Γ.2. Μέθοδοι-2.7 Προγράμματα βιοπληροφορικής, στατιστικής ανάλυσης και οπτικοποίησης). Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σήματος της EXOSC10 σε νορμοξία και σε υποξία παρουσιάζονται στην εικόνα 21, εκφρασμένα είτε ως ποσοστό του ολικού σήματος (Εικόνα 21, E), είτε ως ποσοστό του πυρηνικού σήματος (Εικόνα 21, ΣΤ) ανά κύτταρο.

Σύμφωνα με το διάγραμμα της εικόνας 21E, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του σήματος της EXOSC10 στους πυρηνίσκους (p***) και αντίστοιχη αύξηση του σήματος στο πυρηνόπλασμα (p***) στην υποξία συγκριτικά με την νορμοξία, ενώ δεν φαίνεται να αλλάζει σημαντικά στις δύο συνθήκες το σήμα που προέρχεται συνολικά από τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Όπως αποτυπώνεται στο διάγραμμα ΣΤ της εικόνας 21 που αντιστοιχεί στο ολικό πυρηνικό σήμα, το ποσοστό της EXOSC10 που βρίσκεται στους πυρηνίσκους στην νορμοξία είναι 40 % με το ποσοστό στο πυρηνόπλασμα να αφορά το υπόλοιπο 60 %. Ωστόσο στην υποξία, το ποσοστό στους πυρηνίσκους πέφτει στο 16 %, ενώ το ποσοστό στο πυρηνόπλασμα αυξάνεται αντίστοιχα στο 84 %, υποδηλώνοντας την μετακίνηση προς το πυρηνόπλασμα μεγάλου κλάσματος της EXOSC10 στην υποξία.

Αντίστοιχα με την EXOSC10, μετρήθηκε το σήμα φθορισμού και της NPM1 στο πυρηνόπλασμα και τους πυρηνίσκους σε νορμοξία και υποξία από 3 ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα, όπου συνολικά μετρήθηκαν 50 κύτταρα ανά συνθήκη. Όπως

φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 21, και στην περίπτωση της NPM1, το ποσοστό αυτής που βρίσκεται στους πυρηνίσκους στην νορμοξία (~70 %) μειώνεται κατά το ήμισυ στην υποξία (~30%) (p****) με το ποσοστό στο πυρηνόπλασμα να αυξάνεται ανάλογα (p****) (~35% στην νορμοξία, ~70% στην υποξία).



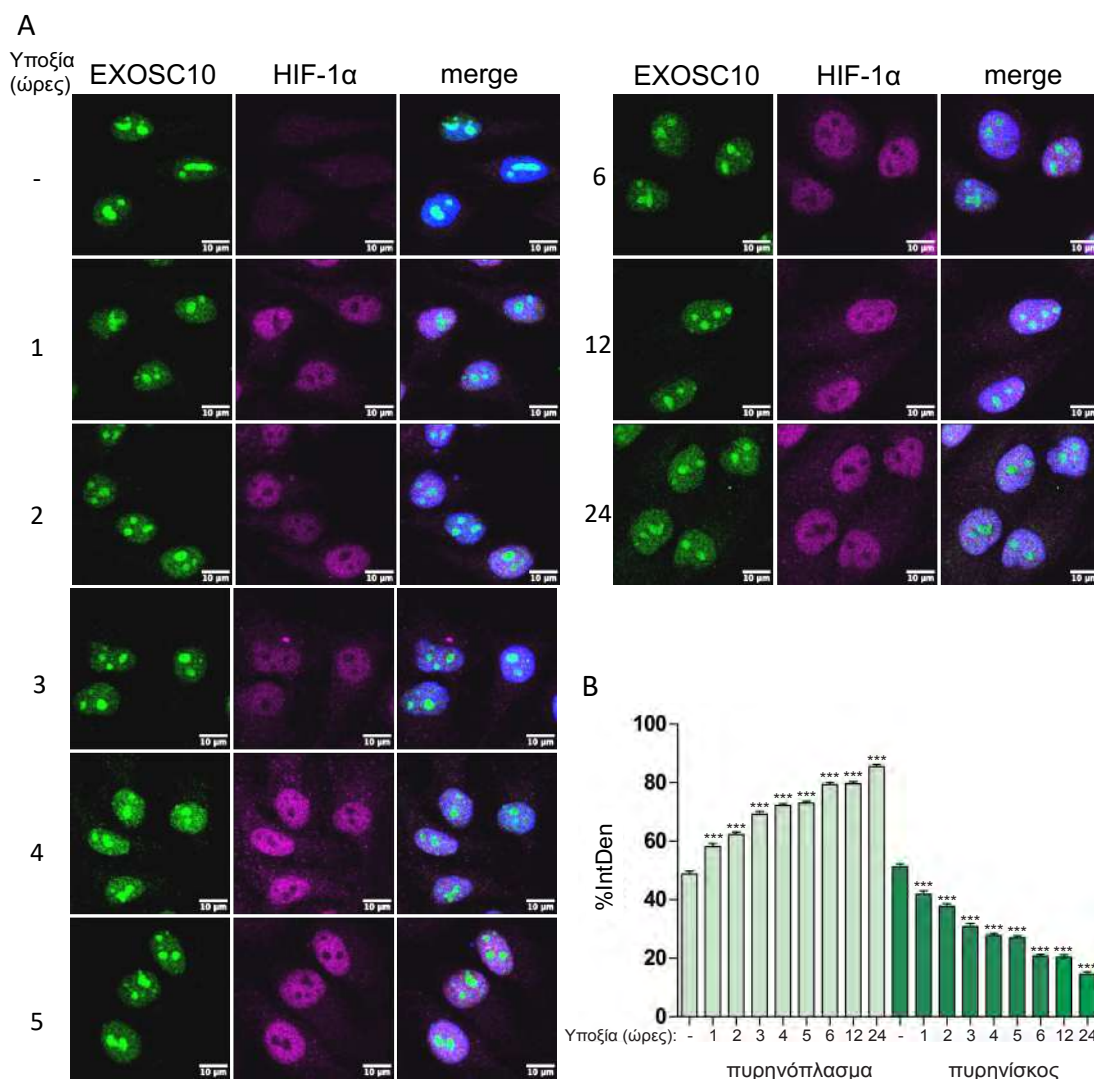
Εικόνα 21: Η υποξία επάγει την πυρηνική μετακίνηση της NPM1. Α) Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης NPM1 σε πυρηνόπλασμα (πορτοκαλί) και πυρηνίσκους (μωβ) σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (1% O₂) (+). Συμπεριλήφθηκαν 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα από τα οποία αναλύθηκαν συνολικά 50 κύτταρα για κάθε συνθήκη. Για κάθε κύτταρο υπολογίσθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) του πυρήνα, του πυρηνοπλάσματος και των πυρηνίσκων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εκφράστηκαν ως ποσοστά του πυρηνικού σήματος ανά κύτταρο (n=50, ****P < 0.0001). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Συνεπώς, εκτός από την σουμοϋλίωση, η υποξία βρέθηκε ότι ρυθμίζει και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι πέραν της EXOSC10, και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης UBF και της NPM1 φάνηκε να επηρεάζεται, υποδεικνύοντας πιθανόν μία γενικότερη αλλαγή της αρχιτεκτονικής των συμπλόκων του πυρηνίσκου σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου.

Για να εξακριβώσουμε, με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, πότε ακριβώς χρονικά κατά το πέρας της υποξίας ξεκινάει να συμβαίνει η μετακίνηση της EXOSC10, επαναλάβουμε το παραπάνω πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού συνεστιακής μικροσκοπίας, αυτή τη φορά επωάζοντας τα κύτταρα για τα χρονικά διαστήματα 1-6,

12 και 24 ωρών στην υποξία (1% O₂) και ελέγχοντας με τα κατάλληλα αντισώματα τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10 και του HIF-1α.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 22A, ένα μικρό κλάσμα της EXOSC10 ξεκινάει να διαχέεται προς το πυρηνόπλασμα από τη πρώτη κιόλας ώρα της επώασης στην υποξία (Εικόνα 22A, πάνελ 1, πράσινη χρώση), και η μετακίνηση αυτή συνεχίζει να υφίσταται προοδευτικά έως και τις 24 ώρες (Εικόνα 22A, πάνελ 2-24, πράσινη χρώση).



Εικόνα 22: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας στην ανακατανομή του πυρηνικού σήματος της EXOSC10. A) Έλεγχος του εντοπισμού της ενδογενούς EXOSC10 (πράσινη χρώση), και της υπομονάδας HIF-1α (μωβ χρώση) σε καρκινικά κύτταρα HeLa με συνεστιακή μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε νορμοξία (-) ή για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα σε υποξία (1% O₂). Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε χρώση, merge). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm. B) Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης EXOSC10 σε πυρηνίσκους (σκούρο πράσινο) και πυρηνόπλασμα (ανοιχτό πράσινο) σε νορμοξία (-) ή για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα

σε υποξία (1% O₂). Αφορά 1 βιολογικό πείραμα από το οποίο αναλύθηκαν συνολικά 100 κύτταρα για κάθε συνθήκη (n=100, ***P < 0.001, ns > 0.05). Για κάθε κύτταρο υπολογίσθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) των πυρήνων, του πυρηνόπλάσματος και των πυρηνίσκων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εκφράστηκαν ως ποσοστά του συνολικού σήματος ανά κύτταρο. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Ομοίως με πριν, μετρήθηκε το σήμα φθορισμού της EXOSC10 σε πυρήνα, πυρηνόπλασμα και πυρηνίσκους σε νορμοξία και στα διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης στην υποξία, από συνολικά 100 κύτταρα ανά συνθήκη. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στην εικόνα 22B εκφρασμένα ως ποσοστό του σήματος του πυρήνα ανά κύτταρο. Πράγματι, ένα μικρό (περίπου 10 %) αλλά σημαντικό μέρος του σήματος της EXOSC10 στους πυρηνίσκους μειώνεται στην πρώτη ώρα επώασης στην υποξία (p***) με ανάλογη αύξηση του σήματος στο πυρηνόπλασμα. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται σταδιακά μέχρι τις 24 ώρες επώασης όπου πάνω από το 50 % της πρωτεΐνης που βρισκόταν στους πυρηνίσκους είναι πλέον στο πυρηνόπλασμα.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα της μελέτης του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της EXOSC10, αποκάλυψαν πως μέρος της πρωτεΐνης μετακινείται από τους πυρηνίσκους προς το πυρηνόπλασμα από τις πρώτες κιόλας ώρες επώασης στην υποξία. Μάλιστα, η μετακίνηση αυτή συνάδει χρονικά με την αποσυνμούλιωση της EXOSC10 στην υποξία, υποδεικνύοντας πως αυτά τα δύο γεγονότα πιθανά συνδέονται.

1.2 Ταυτοποίηση των ενζύμων που συμμετέχουν στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας σε αυτά

Η αποσυνμοϋλίωση που παρατηρείται κατά την υποξία πιθανόν οφείλεται είτε σε αναστολή της σουμοϋλίωσης της EXOSC10, είτε στην προώθηση της αποσυνμοϋλίωσης της. Για να διερευνηθεί ακριβώς ο μηχανισμός που συμβαίνει το φαινόμενο αυτό, έπρεπε πρώτα να ταυτοποιηθούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στην ρύθμιση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και στη συνέχεια να μελετηθούν σε συνθήκες υποξίας.

1.2.1 Ταυτοποίηση των SUMO ισοπεπτιδασών που συμμετέχουν στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης της EXOSC10

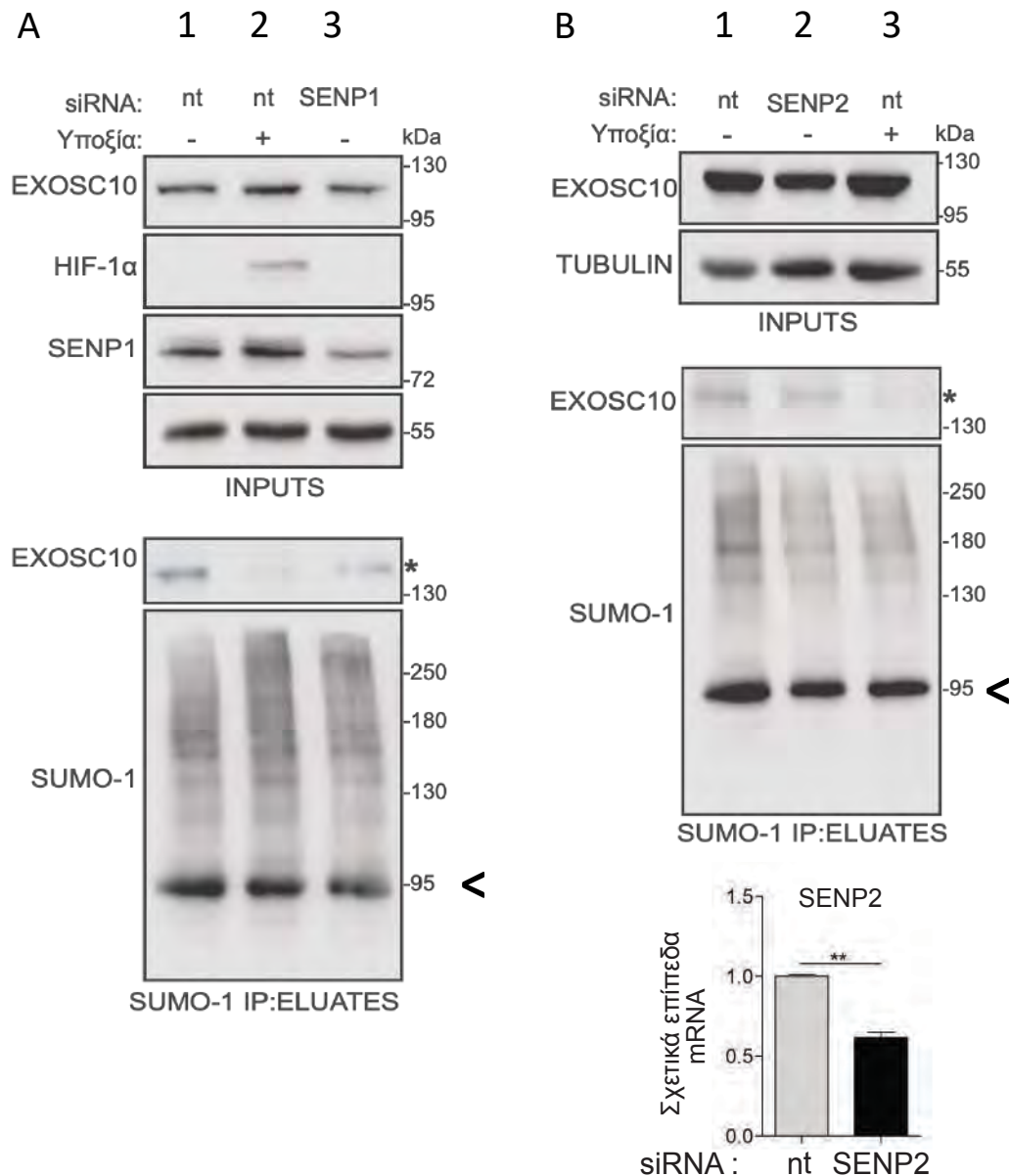
Ο πιο άμεσος τρόπος που θα μπορούσε να εξηγήσει την αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 κατά την υποξία είναι η προώθηση της απομάκρυνσης της SUMO μέσω της επαγωγής ειδικών SUMO ισοπεπτιδασών. Για να ταυτοποιηθεί η υπεύθυνη ισοπεπτιδάση που συμμετέχει στην αποσουμοϋλίωση της EXOSC10, πραγματοποιήθηκε πείραμα αποσιώπησης γνωστών SUMO ισοπεπτιδασών (βλ. Α. Εισαγωγή - 1.1.5 Αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών: Ισοπεπτιδάσες SENP) που βρίσκονται στο πυρηνόπλασμα και στους πυρηνίσκους και ελέγχθηκε η επίδραση της απουσίας αυτών στα επίπεδα σουμοϋλίωσης της EXOSC10.

Αρχικά, επιλέχθηκαν προς μελέτη οι ισοπεπτιδάσες SENP1 και SENP2, οι οποίες είναι γνωστό ότι διαθέτουν τα περισσότερα υποστρώματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ισομορφές. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα siRNA έναντι των SENP1 και SENP2 για 24 ώρες και στην συνέχεια, επώαστηκαν εκ νέου για επιπλέον 24 ώρες στην νορμοξία. Ως συνθήκες κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα νορμοξικών ή υποξικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν με non-targeting siRNA (αναφέρεται ως sint). Τα επίπεδα της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 ελέγχθηκαν με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης SUMO-1 IP. Στην εικόνα 23Α και Β αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και των εκλουσμάτων (eluate) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Όσον αφορά το πείραμα αποσιώπησης της SENP1 (Εικόνα 23Α), στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, με ειδικό αντίσωμα έναντι της SENP1 επιβεβαιώθηκε η επιτυχής αποσιώπηση της στη συνθήκη με το siRNA που την στοχεύει (Εικόνα 23Α, διαδρομή 3), χωρίς να επηρεαστούν τα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα της EXOSC10, ενώ με αντίσωμα έναντι του HIF-1α επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη υποξίας (Εικόνα 23Α, διαδρομή 2). Προχωρώντας στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της SUMO-1, σύμφωνα με τα επίπεδα της σουμοϋλιωμένης RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζονται με <) επιβεβαιώθηκε η ίση ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε όλες τις συνθήκες. Μετά από ανοσοανίχνευση με το κατάλληλο αντίσωμα της EXOSC10, ανιχνεύτηκε επιτυχώς η σουμοϋλιωμένη μορφή της στην νορμοξία (εικόνα 23Α, διαδρομή 1, συμβολίζεται με *), η οποία μειώθηκε

στην υποξία όπως ήταν αναμενόμενο (εικόνα 23A, διαδρομή 2), αλλά δεν βρέθηκε να επηρεάζεται από την απουσία της SENP1 (Εικόνα 23A, διαδρομή 3).

Όσον αφορά το πείραμα αποσιώπησης της SENP2 (Εικόνα 23B), λόγω απουσίας του κατάλληλου αντισώματος, η επιβεβαίωση της αποσιώπησης στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα έγινε μετά από απομόνωση RNA και την ανάλυση των επιπέδων του mRNA της SENP2 με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου (Εικόνα 23B, διάγραμμα), τα οποία παρουσία του siRNA έναντι της SENP2 βρέθηκαν κατά 50 % περίπου μειωμένα σε σχέση με την συνθήκη κοντρόλ (sint). Στα εκλούσματα, η σουμοϋλιωμένη EXOSC10 ανιχνεύθηκε στην νορμοξία (Εικόνα 23B, διαδρομή 1) και βρέθηκε πάλι να μειώνεται στην υποξία (Εικόνα 23B, διαδρομή 3), όμως αντίστοιχα με την περίπτωση της SENP1, η σουμοϋλίωση της EXOSC10 απουσία της SENP2 παρέμεινε ίδια (Εικόνα 23B, διαδρομή 2).

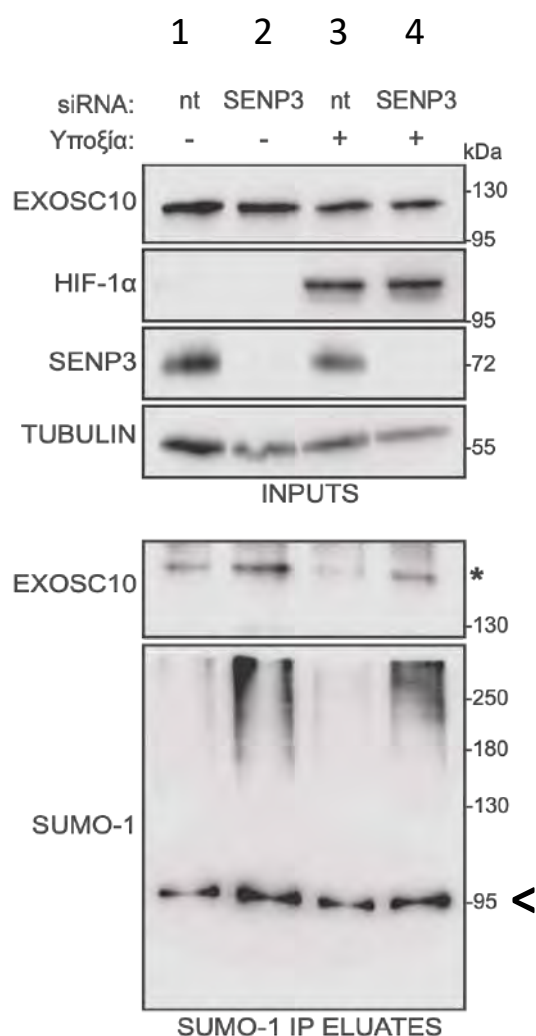


Εικόνα 23: Η αποσυνομιλίωση της EXOSC10 δεν επηρεάζεται από την αποσιώπηση των ισοπεπτιδασών SENP1 και SENP2. Έλεγχος της συνομιλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία διαμολύνθηκαν είτε με nt siRNA (nt), είτε με siRNA έναντι των SENP1 (A) και SENP2 (B) και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία (-) ή υποξία (1% O₂) (+) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, της SENP1 (έλεγχος αποσιώπησης), του HIF-1α (δείκτης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης συνομιλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η συνομιλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η συνομιλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων). Στην περίπτωση της SENP2 (πάνελ B),

ο έλεγχος της αποσιώπησης έγινε με απομόνωση RNA και PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα ως ποσοστιαία μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη κοντρόλ (sint) (26). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα, αλλά αυτή τη φορά έγινε αποσιώπηση της έκφρασης της ισοπεπτιδάσης SENP3, η οποία είναι γνωστό ότι βρίσκεται εμπλουτισμένη στους πυρηνίσκους. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το κατάλληλο siRNA έναντι της SENP3 για 24 ώρες και στην συνέχεια επώαστηκαν εκ νέου για επιπλέον 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Στην εικόνα 24, αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (inputs) και των εκλουσμάτων (eluate) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

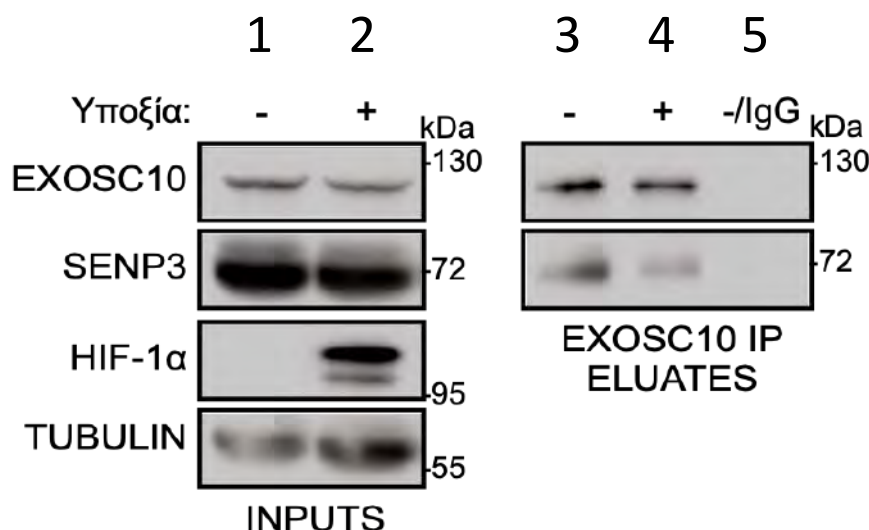
Στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, με ειδικό αντίσωμα έναντι της SENP3 επιβεβαιώθηκε η επιτυχής αποσιώπηση της στη συνθήκη με το siRNA που την στοχεύει τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία (Εικόνα 24A, διαδρομές 2 και 4), χωρίς να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της EXOSC10, ενώ με αντίσωμα έναντι του HIF-1α επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη υποξίας (Εικόνα 24A, διαδρομές 3 και 4). Στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της SUMO-1 παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση του συνόλου των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών στις συνθήκες με το siRNA έναντι της SENP3 τόσο σε νορμοξία (Εικόνα 24A, διαδρομή 2) όσο και σε υποξία (Εικόνα 24A, διαδρομή 4), η οποία οφείλεται στην απουσία της δράσης της SENP3 στην αποσουμοϋλίωση πρωτεϊνών, παρόλα αυτά τα επίπεδα της σουμοϋλιωμένης RanGAP (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων, συμβολίζονται με <) είναι παρόμοια σε όλες τις συνθήκες επιβεβαιώνοντας το ισοφόρτωμα των εκλουσμάτων. Μετά από ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, ανιχνεύτηκε η σουμοϋλιωμένη μορφή της στην νορμοξία (εικόνα 24, διαδρομή 1, συμβολίζεται με *), η οποία μειώθηκε στην υποξία όπως ήταν αναμενόμενο (εικόνα 24, διαδρομή 3). Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι σε αντίθεση με τις περιπτώσεις των SENP1 και SENP2, η απουσία της SENP3 τόσο στην νορμοξία (εικόνα 24, διαδρομή 2), όσο και στην υποξία (εικόνα 24, διαδρομή 4) ενίσχυσε τα επίπεδα σουμοϋλίωσης της EXOSC10, υποδεικνύοντας ότι η ισοπεπτιδάση αυτή ρυθμίζει την αποσουμοϋλίωση της και στις δύο συνθήκες.



Εικόνα 24: Η απουσία της ισοπεπτιδάσης SENP3 αυξάνει τη σουμοϋλίωση της EXOSC10 σε νορμοξία και υποξία. Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία διαμολύνθηκαν είτε με nt siRNA (nt), είτε με siRNA έναντι της SENP3 και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία (-) ή υποξία (1% O₂) (+) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, της SENP3 (έλεγχος αποσιώπησης), του HIF-1α (δείκτης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Για να μελετηθεί αν η SENP3 δρα απευθείας στην αποσυνμούλωση της EXOSC10, ελέγχθηκε η πιθανή άμεση αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και τα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν με τη χρήση ήπιου διαλύματος λύσης, ώστε να διατηρηθούν τα ενδογενή πρωτεϊνικά σύμπλοκα για την ανοσοκατακρήμνιση στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι της EXOSC10 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Γ.2.Μέθοδοι - 2.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών). Ως συνθήκη κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα νορμοξικών κυττάρων τα οποία προετοιμάστηκαν αντιστοίχως και επωάστηκαν με IgG ανοσοσφαιρίνες. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση των συμπλόκων της EXOSC10 σε σφαιρίδια αгарόζης, ακολούθησε έκλουση και ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων πριν την ανοσοκατακρήμνιση και των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, στα ολικά εκχυλίσματα με το κατάλληλο αντίσωμα ανιχνεύεται η σταθεροποίηση του HIF-1α στην συνθήκη της υποξίας (Εικόνα 25, διαδρομή 2), ενώ με αντισώματα έναντι των ενδογενών πρωτεϊνών EXOSC10, SENP3 και τουμπουλίνης, επιβεβαιώνεται πως ίση ποσότητα κυτταρικών εκχυλισμάτων επωάστηκαν με τα σφαιρίδια και στις δύο συνθήκες (Εικόνα 25, σύγκριση διαδρομών 1 και 2). Στα εκλούσματα (Εικόνα 25, διαδρομές 3 και 4), με αντίσωμα έναντι της EXOSC10 επιβεβαιώνεται η επιτυχής και ισόποση δέσμευση της EXOSC10 στα σφαιρίδια. Με αντίσωμα έναντι της SENP3, φαίνεται πως πράγματι, η πρωτεΐνη αυτή συγκατακρημνίζεται με την EXOSC10 στην νορμοξία (Εικόνα 25, διαδρομή 3) και σε μικρότερο βαθμό στην υποξία (Εικόνα 25, διαδρομή 4) με την απουσία σήματος και για τις δύο πρωτεΐνες στη συνθήκη κοντρόλ (-/IgG) (Εικόνα 25, διαδρομή 5) να αποδεικνύει την ειδική σύνδεση τους στα σφαιρίδια.

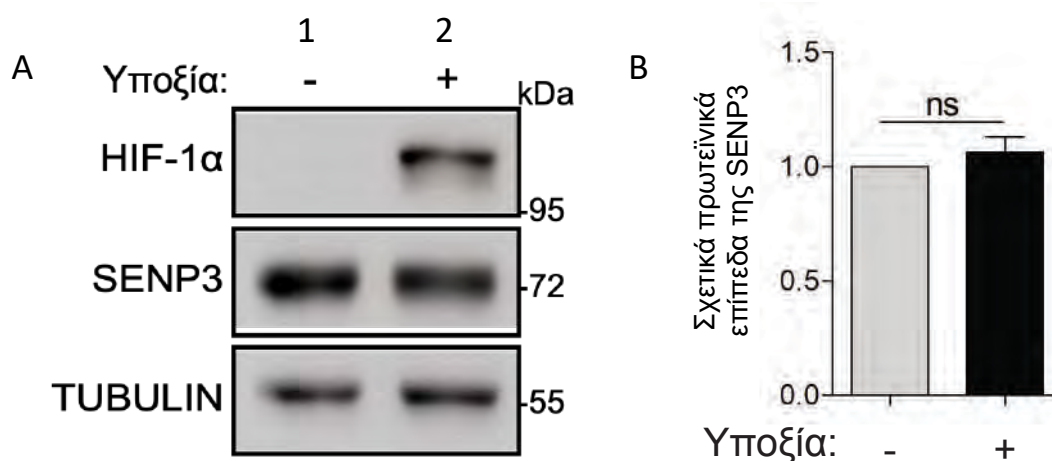


Εικόνα 25: Η EXOSC10 βρίσκεται σε σύμπλοκο με την ισοπεπτιδάση SENP3. Έλεγχος της συγκατακρήμνισης των ενδογενών EXOSC10 και SENP3 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), μετά από ανοσοκατακρήμνιση της EXOSC10 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (EXOSC10-IP). Ως κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με IgG. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των ενδογενών EXOSC10, SENP3, HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας) και τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Συνεπώς, η παρατηρούμενη αύξηση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 απουσία της SENP3 και η εμφάνιση των δύο αυτών πρωτεϊνών, σε κοινό σύμπλοκο υποστηρίζουν την άμεση δράση της SENP3 στην απομάκρυνση της SUMO από την EXOSC10. Όμως, η ασθενέστερη σύνδεση των δύο αυτών πρωτεϊνών στην υποξία δεν είναι ικανή να εξηγήσει την αυξημένη αποσουμοϋλίωση της EXOSC10. Δεδομένου ότι η SENP3 αναγνωρίστηκε ως η κύρια υποψήφια ισοπεπτιδάση που στοχεύει την EXOSC10, μελετήθηκε λεπτομερώς η επίδραση της υποξίας στην έκφραση και στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της ώστε να διερευνηθεί σε βάθος η εξαρτώμενη από την υποξία αποσουμοϋλίωση της EXOSC10.

1.2.2 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της *SENP3*

Αρχικά, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και στα κυτταρικά τους εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς *SENP3* με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 26). Μετά την ανοσοανίχνευση με το κατάλληλο αντίσωμα, φάνηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *SENP3* δεν αλλάζουν μεταξύ νορμοξίας (Εικόνα 26A, διαδρομή 1) και υποξίας (Εικόνα 26A, διαδρομή 2), όπως επιβεβαιώθηκε και με την ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων της *SENP3* (Εικόνα 26B) από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα (262), τα οποία έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της *SENP3* σε κύτταρα HeLa μετά από 24ωρη επώαση στην υποξία (1% O₂), δεν αλλάζουν συγκριτικά με την νορμοξία.



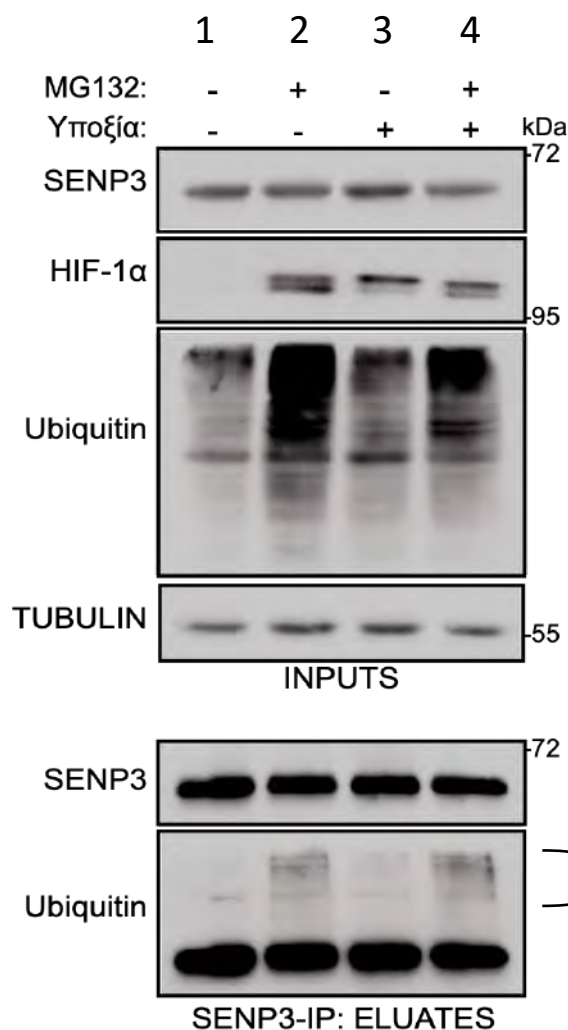
Εικόνα 26: Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενδογενούς *SENP3* δεν μεταβάλλονται στην υποξία.

A) Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενδογενούς *SENP3* σε εκχυλίσματα καρκινικών κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ενδογενούς *SENP3*, της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφορτώματος) και του HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας). B) Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της *SENP3* σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (+). Στον άξονα Y, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές των επιπέδων της *SENP3* κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα (ns, $P > 0.05$). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) και η στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.

Πέραν της μελέτης των επιπέδων έκφρασης, μελετήθηκε επιπρόσθετα και η σταθερότητα της SENP3 στην υποξία με την χρήση δύο ουσιών, ενός αναστολέα του πρωτεασώματος, το MG132 και ενός αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης το κυκλοεξιμίδιο.

Στην πρώτη περίπτωση, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και 5 ώρες πριν το πέρας της επώασης, προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο ο παράγοντας MG132 ή αντίστοιχος όγκος DMSO στις συνθήκες κοντρόλ. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς SENP3 με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα. Τα δείγματα πριν την ανοσοκατακρήμνιση και τα εκλούσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western και παρουσιάζονται στην εικόνα 27.

Στα ολικά εκχυλίσματα, με αντίσωμα έναντι της SENP3, τα πρωτεϊνικά της επίπεδα δεν φάνηκε να αλλάζουν παρουσία (Εικόνα 27, διαδρομές 2 και 4) ή απουσία (Εικόνα 27, διαδρομές 1 και 3) του αναστολέα. Με αντίσωμα έναντι του HIF-1α δείχθηκε η σταθεροποίηση του πέραν από την υποξία (Εικόνα 27, διαδρομές 3 και 4) και στη νορμοξία παρουσία του MG132 (Εικόνα 27, διαδρομή 2). Η σταθεροποίηση του HIF-1α στην νορμοξία και η συσσώρευση ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, όπως ανιχνεύεται με αντίσωμα έναντι της ουβικιτίνης (Εικόνα 27, διαδρομές 2 και 4), επιβεβαίωσαν την επιτυχή δράση του αναστολέα. Όσον αφορά τα εκλούσματα, μετά από ανοσοανίχνευση με αντίσωμα έναντι της SENP3, επιβεβαιώθηκε ότι η πρωτεΐνη απομονώθηκε επιτυχώς και σε ίση ποσότητα σε όλες τις συνθήκες. Ειδικότερα, παρατηρώντας με αντίσωμα έναντι της ουβικιτίνης τα επίπεδα ουβικιτινίωσης της SENP3 παρουσία MG132 (συμβολίζονται με J), δεν βρέθηκαν διαφορές στην υποξία (Εικόνα 27, διαδρομή 4) συγκριτικά με την νορμοξία (Εικόνα 27, διαδρομή 2) και άρα η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης κατά την υποξία δεν φαίνεται να επηρεάζεται.



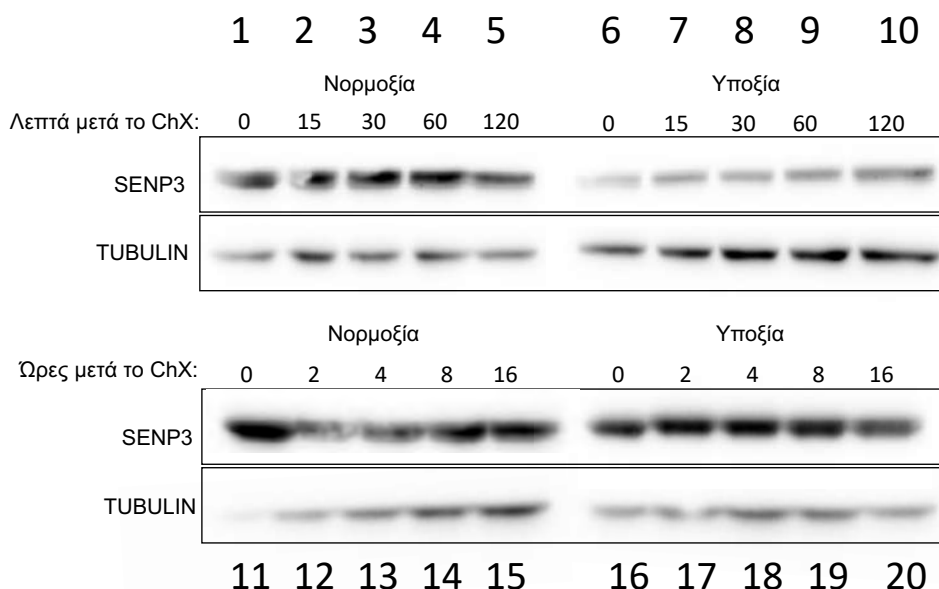
Εικόνα 27: Η σταθερότητα της SENP3 δεν επηρεάζεται από την υποξία. Α) Προσδιορισμός των επιπέδων ουβικιτίνωσης της ενδογενούς SENP3 σε εκχυλίσματα καρκινικών κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (-) ή υποξίας (1% O₂) (+), παρουσία (+) ή απουσία (-) του παράγοντα MG132. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επώαση με MG132 (10 μM) για 5 ώρες, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς SENP3 (SENP3 IP) και ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων (INPUTS) και των εκλουσμάτων (ELUATES) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στις συνθήκες κοντρόλ (246) προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των ενδογενών SENP3, HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας), ουβικιτίνης και τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών και με] οι ουβικιτινωμένες μορφές της SENP3.

Πέραν της αποικοδόμησης, για να μελετηθούν τυχόν αλλαγές στον χρόνο ημιζωής της SENP3 στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία, χρησιμοποιήθηκε και ο παράγοντας κυκλοεξιμίδιο. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για σύντομο χρονικό

διάστημα 15-120 λεπτών (Εικόνα 28, διαδρομές 1-10) και εκτεταμένο χρονικό διάστημα 2-16 ωρών (Εικόνα 28, διαδρομές 11-20) παρουσία κυκλοεξιμιδίου σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενδογενούς SENP3 με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 28).

Πρώτα, συγκρίθηκαν μετά από ανοσοανίχνευση με το κατάλληλο αντίσωμα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SENP3 σε νορμοξία και υποξία μετά από αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης σε μικρής διάρκειας διαστήματα των 15-120 λεπτών (Εικόνα 28, διαδρομές 1-5 σε σύγκριση με αντίστοιχες διαδρομές 6-10), όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια αισθητή αλλαγή στη σταθερότητα της πρωτεΐνης ανάμεσα στις δύο συνθήκες. Ομοίως, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της SENP3 μετά από αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης για μεγαλύτερους χρόνους 2-16 ωρών (Εικόνα 28, διαδρομές 11-15 σε σύγκριση με αντίστοιχες διαδρομές 16-20), όπου και πάλι η σταθερότητα της SENP3 στην υποξία δεν φάνηκε να διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με την νορμοξία.

Επομένως, η υποξία δεν επιδρά στα επίπεδα έκφρασης ή τον ρυθμό αποικοδόμησης της ισοπεπτιδάσης SENP3.

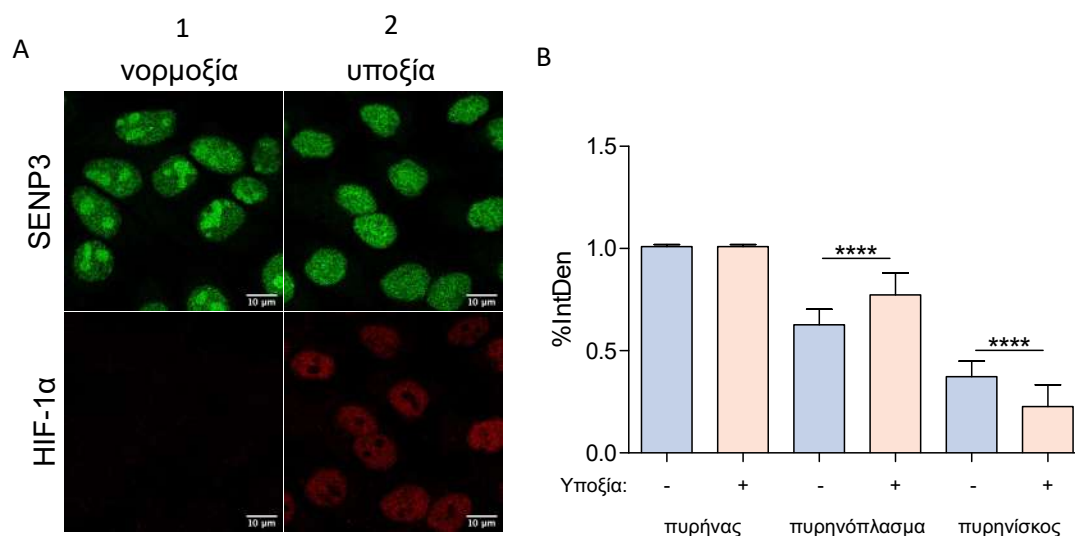


Εικόνα 28: Η σταθερότητα της SENP3 δεν επηρεάζεται από την υποξία. Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενδογενούς SENP3 σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O₂) απουσία ή παρουσία κυκλοεξιμιδίου (ChX), με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επώαση με κυκλοεξιμίδιο (ChX 10 µg/ml) για σύντομους χρόνους 15-120 λεπτών

(διαδρομές 1-10) ή για μεγαλύτερους χρόνους 2-16 ωρών (διαδρομές 11-20). Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ενδογενούς SENP3 και της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφορτώματος).

Προχωρώντας, για να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της υποξίας, αυτή τη φορά στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της SENP3, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και ελέγχθηκε με το κατάλληλο αντίσωμα ο εντοπισμός των ενδογενών SENP3 και HIF-1α σε πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 29A, στην νορμοξία, η SENP3 εντοπίστηκε εστιασμένα στους πυρηνίσκους με ένα ποσοστό της να βρίσκεται και στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 29A, διαδρομή 1, πράσινη χρώση). Μετά την επίδραση στα κύτταρα 24ωρης υποξίας όπως αποδεικνύεται και από τη σταθεροποίηση της HIF-1α υπομονάδας (Εικόνα 29A, διαδρομή 2, κόκκινη χρώση), η πρωτεΐνη έχασε τον εστιασμένο της εντοπισμό στους πυρηνίσκους και ανιχνεύθηκε πλέον διάχυτη σε όλο τον πυρήνα (Εικόνα 29A, διαδρομή 2, πράσινη χρώση). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε μετά και από ποσοτικοποίηση του φθορισμού της SENP3 σε πυρηνόπλασμα και πυρηνίσκους που αποτυπώνεται στο διάγραμμα της εικόνα 29B, το οποίο δείχνει την στατιστικά σημαντική αύξηση του σήματος της SENP3 στο πυρηνόπλασμα στην υποξία (p****) και την αντίστοιχη μείωση του σήματος της στον πυρηνίσκο (p****).



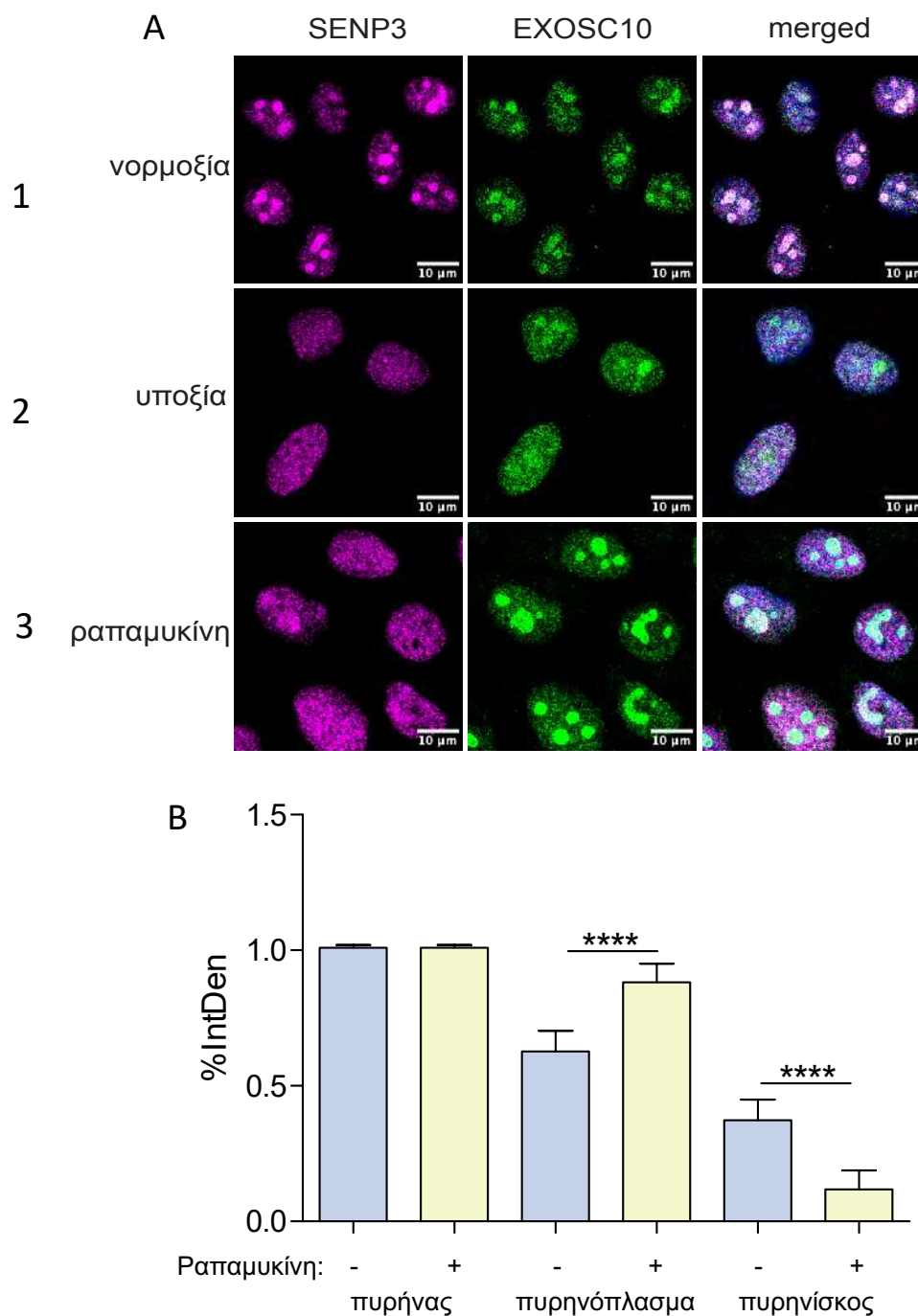
Εικόνα 29: Η υποξία επάγει την πυρηνική μετακίνηση της SENP3. Α) Έλεγχος του εντοπισμού της ενδογενούς SENP3 σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες με συνεστιακή μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμό. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των ενδογενών SENP3 (πράσινη χρώση) και HIF-1α (κόκκινη χρώση). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm. Β) Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης SENP3 σε πυρήνα, πυρηνίσκους και πυρηνόπλασμα σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (1% O₂) (+). Συμπεριλήφθηκαν 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα από τα οποία αναλύθηκαν συνολικά 100 κύτταρα για κάθε συνθήκη (n=100, ****P < 0.0001). Για κάθε κύτταρο υπολογίστηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) των πυρήνων, του πυρηνόπλάσματος και των πυρηνίσκων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εκφράστηκαν ως ποσοστά του πυρηνικού σήματος ανά κύτταρο. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Η παρατήρηση αυτή έθεσε το ερώτημα εάν η αλλαγή του εντοπισμού της SENP3 είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση και την αποσομοϋλίωση της EXOSC10 στην υποξία. Για να εξετάσουμε αν πράγματι συμβαίνει κάτι τέτοιο, προσπαθήσαμε να προκαλέσουμε την μετακίνηση της SENP3 με μέσα, πέραν της υποξίας, και να ελέγξουμε τη σουμοϋλίωση της EXOSC10. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (303), ο εντοπισμός της SENP3 στους πυρηνίσκους οφείλεται στην φωσφορυλίωση της μέσω του mTOR μονοπατιού και την επακόλουθη αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη των πυρηνίσκων NPM1.

Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), ή για 6 ώρες παρουσία του αναστολέα του mTORC1, ραπαμυκίνης, και πραγματοποιήθηκαν

πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού με τα κατάλληλα αντισώματα για την παρατήρηση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών SENP3 και EXOSC10.

Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 30Α, πράγματι η αναστολή του mTOR από την ραπαμυκίνη, οδήγησε σε παρόμοια πυρηνική μετακίνηση της SENP3 (Εικόνα 30Α, διαδρομή 3, μωβ χρώση) όπως και στην υποξία (Εικόνα 30Α, διαδρομή 2, μωβ χρώση), σε σύγκριση με την νορμοξία (Εικόνα 30Α, διαδρομή 1, μωβ χρώση). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε μετά και από ποσοτικοποίηση του φθορισμού της SENP3 σε πυρηνόπλασμα και πυρηνίσκους παρουσία (+) ή απουσία (-) ραπαμυκίνης, όπως αποτυπώνεται στο διάγραμμα της εικόνας 30Β. Όσον αφορά την EXOSC10, ο εντοπισμός της επηρεάστηκε όπως ήταν αναμενόμενο στην υποξία (Εικόνα 30Α, διαδρομή 2, πράσινη χρώση) συγκριτικά με την νορμοξία (Εικόνα 30Α, διαδρομή 1, πράσινη χρώση), όχι όμως και στη συνθήκη με τη ραπαμυκίνη (Εικόνα 30Α, διαδρομή 3).



Εικόνα 30: Η αναστολή του mTOR προκαλεί την πυρηνική μετακίνηση της SENP3 από τον πυρηνίσκο προς στο πυρηνόπλασμα. Α) Έλεγχος του εντοπισμού της ενδογενούς SENP3 (1^ο πάνελ, μωβ χρώση) και της EXOSC10 (2^ο πάνελ, πράσινη χρώση) σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες ή για 6 ώρες παρουσία ραπαμυκίνης (2μM) με συνεστιακή μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των ενδογενών SENP3 (μωβ χρώση) και EXOSC10 (πράσινη χρώση), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (merged, μπλε χρώση). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm. **Β)** Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης SENP3 σε πυρήνες, πυρηνίσκους και πυρηνόπλασμα απουσία (-) και παρουσία (+) ραπαμυκίνης. Συμπεριλήφθηκε 1

βιολογικά ανεξάρτητο πείραμα από το οποίο αναλύθηκαν συνολικά 100 κύτταρα για κάθε συνθήκη ($n=100$, **** $P < 0.0001$). Για κάθε κύτταρο υπολογίσθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (*integrated density*) των πυρήνων, του πυρηνοπλάσματος και των πυρηνίσκων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εκφράστηκαν ως ποσοστά του πυρηνικού σήματος ανά κύτταρο. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Για να ελεγχθεί εάν η πυρηνική μετακίνηση της SENP3 οφείλεται στην αναστολή του μονοπατιού του mTOR και στην περίπτωση της υποξίας, ελέγχθηκε η φωσφορυλίωση ενός άμεσου στόχου του mTOR, της κινάσης p70-S6K (304) αλλά και της SENP3 στην υποξία.

Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), ή για 6 ώρες παρουσία ραπαμυκίνης και στα κυτταρικά τους εκχυλίσματα, αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p70-S6K με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 31A). Πράγματι, ενώ η φωσφορυλιωμένη p70-S6K ανιχνεύτηκε επιτυχώς στην νορμοξία (Εικόνα 31A, διαδρομή 1), εξαφανίστηκε σχεδόν ολοκληρωτικά τόσο λόγω μετά από την επίδραση της ραπαμυκίνης όπως ήταν αναμενόμενο (Εικόνα 31A, διαδρομή 2), αλλά και της υποξίας (Εικόνα 31A, διαδρομή 3), υποδεικνύοντας ότι το μονοπάτι του mTOR απενεργοποιείται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου.

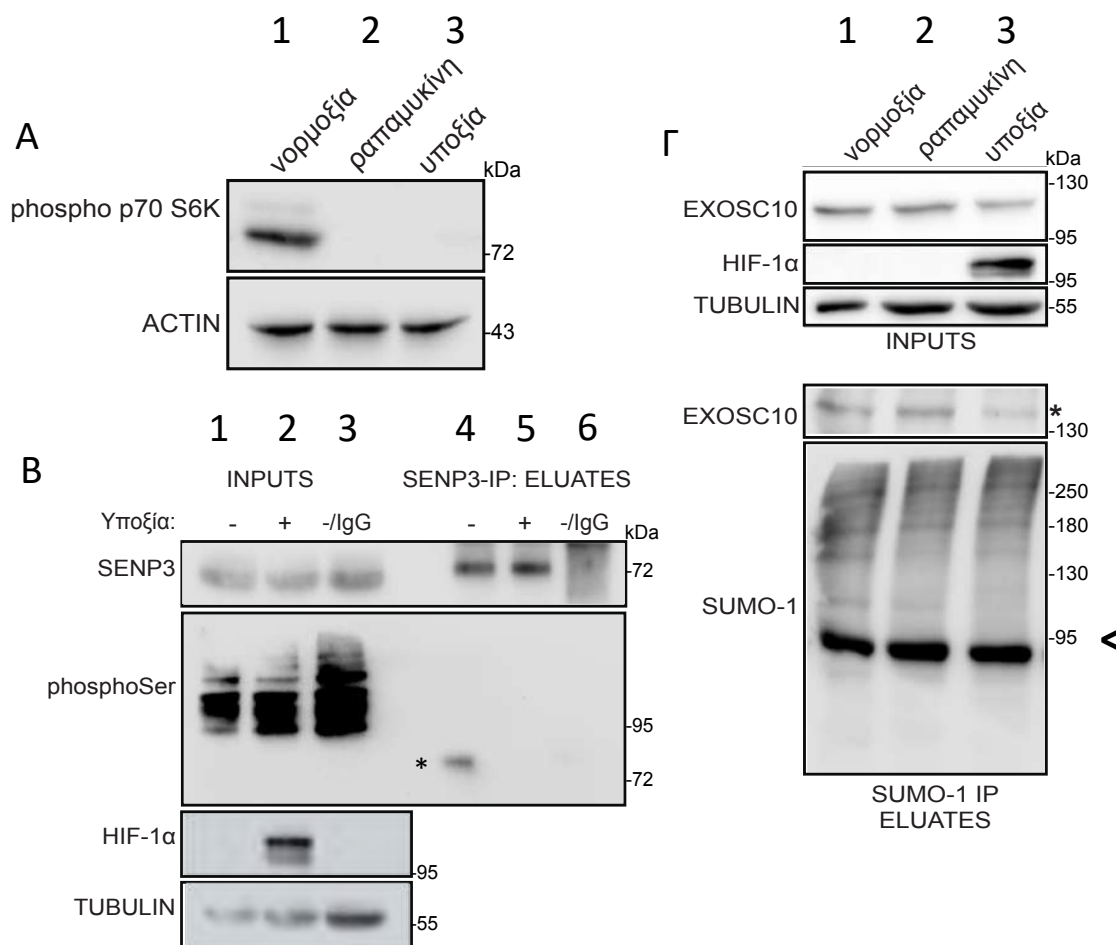
Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πειράματος στο οποίο ελέγχθηκε η φωσφορυλίωση της SENP3 σε υποξικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και από τα κυτταρικά εκχυλίσματα τους, απομονώθηκε η SENP3 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με ειδικό αντίσωμα έναντι αυτής. Ως συνθήκη κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα νορμοξικών κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με IgG ανοσοσφαιρίνες. Η ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων πριν την ανοσοκατακρήμνιση και των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western παρουσιάζεται στην Εικόνα 31B. Στα εκλούσματα, βλέπουμε με αντίσωμα έναντι της SENP3 την επιτυχή και ειδική δέσμευση της στα σφαιρίδια, ενώ χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντίσωμα που αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης (phosphoSer), φαίνεται η ύπαρξη της φωσφορυλιωμένης SENP3 στην νορμοξία (Εικόνα 31B, διαδρομή 4, συμβολίζεται με *), η οποία εξαφανίζεται στην υποξία (Εικόνα 31B, διαδρομή 5).

Συνεπώς, η παρατηρούμενη εξαρτώμενη από την υποξία μετακίνηση της SENP3 οφείλεται στην αναστολή του mTOR από τη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου.

Το ερώτημα που γεννάται είναι αν η αναστολή αυτή του mTOR και η πυρηνική μετακίνηση της SENP3 στην υποξία είναι οι αιτίες για την επακόλουθη αποσυνμοϋλίωση της EXOSC10. Για να εξετασθεί το ενδεχόμενο αυτό, τα επίπεδα της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 ελέγχθηκαν με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης SUMO-1 IP σε κύτταρα HeLa στα οποία έγινε, ομοίως με πριν, επίδραση είτε με ραπαμυκίνη ή με 24ωρη υποξία. Στην εικόνα 31Γ αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Στα ολικά εκχυλίσματα, μετά από ανοσοανίχνευση με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς EXOSC10, δείχθηκε ότι η επίδραση της ραπαμυκίνης στην αναστολή του mTOR δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της (Εικόνα 31Γ, σύγκριση διαδρομής 2 με διαδρομή 1), ενώ στα εκλούσματα, ανιχνεύθηκε η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 στην νορμοξία (Εικόνα 31Γ, διαδρομή 1), η οποία μειώθηκε στην υποξία (Εικόνα 31Γ, διαδρομή 3) όπως ήταν αναμενόμενο. Όμως, παρουσία ραπαμυκίνης, η σουμοϋλίωση της EXOSC10 δεν επηρεάστηκε συγκριτικά με την νορμοξία (Εικόνα 31Γ, διαδρομή 2).

Βρέθηκε λοιπόν πως η επώαση των κυττάρων HeLa παρουσία ραπαμυκίνης και μόνο δεν άλλαξε τα επίπεδα σουμοϋλίωσης της EXOSC10 (Εικόνα 31Γ), ούτε προκάλεσε αλλαγή στον εντοπισμό της (Εικόνα 30). Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα πως η αναστολή του mTOR από μόνη της και η παρακείμενη μετακίνηση της SENP3 δεν είναι ικανή να εξηγήσει τις αλλαγές στον εντοπισμό και την αποσυνμοϋλίωση της EXOSC10.



Εικόνα 31: Η αναστολή του mTOR και η αποφωσφορυλίωση της SENP3 δεν προκαλούν την αποσυνυμείωση της EXOSC10. Α) Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής της ενδογενούς p70-S6K σε εκχυλίσματα καρκινικών κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), ή για 6 ώρες παρουσία ραπαμυκίνης (2μM), με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της φωσφορυλιωμένης p70-S6K και της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφορτώματος). Β) Έλεγχος της φωσφορυλίωσης της ενδογενούς SENP3 σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), με ανοσοκατακρήμνιση της SENP3 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (SENP3-IP). Ως κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με IgG. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των SENP3, των φωσφορυλιωμένων σε κατάλοιπα σερίνης πρωτεϊνών, της υπομονάδας HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Με * συμβολίζεται η φωσφορυλιωμένη μορφή της SENP3. Γ) Έλεγχος της συμυμείωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), ή για 6 ώρες παρουσία ραπαμυκίνης (2μM) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα

(INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της ενδογενούς EXOSC10, του HIF-1α (δείκτης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων). Σε κάθε περίπτωση, αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

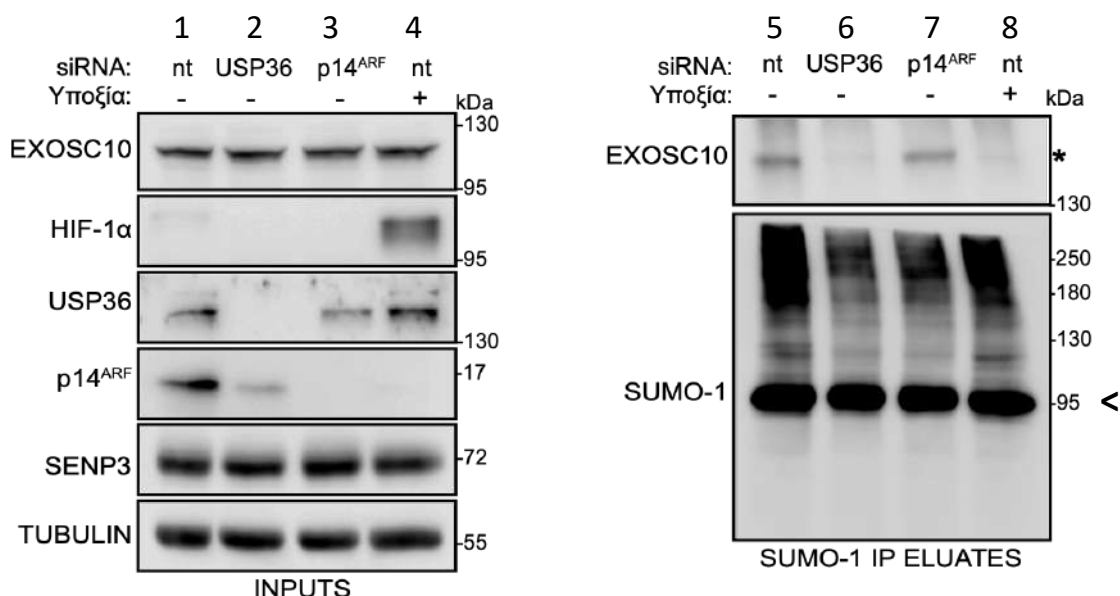
1.2.3 Ταυτοποίηση ενζύμων που ενισχύουν την σουμοϋλίωση της EXOSC10

Εφόσον η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 δεν μπόρεσε να εξηγηθεί από τις αλλαγές που υφίσταται η υπεύθυνη SUMO ισοπεπτιδάση της στην υποξία, ένα δεύτερο σενάριο το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει το φαινόμενο αυτό είναι η εξαρτωμένη από την υποξία μείωση της σύζευξης της EXOSC10 με τη SUMO-1. Προηγούμενα αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου, έδειξαν ότι σε χαμηλές συνθήκες οξυγόνου τα E1 και E2 ένζυμα που εξειδικεύονται στη σουμοϋλίωση δεν επηρεάζονται από τις χαμηλές συνθήκες οξυγόνου σε επίπεδο έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης. Επομένως, στοχεύσαμε στην ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης που ενισχύει την σουμοϋλίωση της EXOSC10, ενδεχομένως μιας SUMO E3 λιγάσης. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. Α.Εισαγωγή-1.1.4 Σύζευξη των SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους: ένζυμα E2 και E3), οι πλήρως χαρακτηρισμένες E3 λιγάσες είναι λίγες. Στη παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η επίδραση της αποσιώπησης δύο πρωτεϊνών στην σουμοϋλίωση της EXOSC10, συγκεκριμένα της p14^{ARF} και της USP36. Οι πρωτεΐνες αυτές επιλέχθηκαν κυρίως λόγω του ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό στους πυρηνίσκους και την λειτουργία τους ως ενισχυτές της σουμοϋλίωσης υποστρωμάτων μέσω πιθανής δράσης E3 λιγάσης.

Αναλυτικότερα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα siRNA έναντι των p14^{ARF} και USP36 για 48 ώρες και στα κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα επίπεδα της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Ως κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν με non-targeting siRNA και επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες. Στην εικόνα 32, αποτυπώνονται τα αποτελέσματα του πειράματος μετά από ανάλυση των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Όσον αφορά την ανάλυση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιώντας ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της USP36 (Εικόνα 32, διαδρομή 2) και της p14^{ARF} (Εικόνα 32, διαδρομή 3) αποδείχθηκε η επιτυχής αποσιώπηση τους στις συνθήκες με τα ειδικά για αυτές siRNA, ενώ σε καμία από τις συνθήκες δεν φάνηκε να επηρεάζονται τα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα της EXOSC10. Ενδιαφέρον, όμως, παρουσίασε το γεγονός πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p14^{ARF} μειώθηκαν δραματικά εκτός από τη συνθήκη αποσιώπησης της και κατά την υποξία (Εικόνα 32, διαδρομή 4).

Προχωρώντας στα εκλούσματα, μετά από ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της EXOSC10, ανιχνεύθηκε η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 στην νορμοξία (Εικόνα 32, διαδρομή 5) και στην συνθήκη αποσιώπησης της p14^{ARF} (Εικόνα 32, διαδρομή 7) σε παρόμοια επίπεδα. Αντίθετα, η μορφή αυτή εξαφανίστηκε τόσο την υποξία (Εικόνα 32, διαδρομή 8), όπως ήταν αναμενόμενο αλλά και στη συνθήκη αποσιώπησης της USP36 (Εικόνα 32, διαδρομή 2). Επομένως, η αποσιώπηση της USP36 και όχι της p14^{ARF} οδηγεί σε κατάργηση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10.



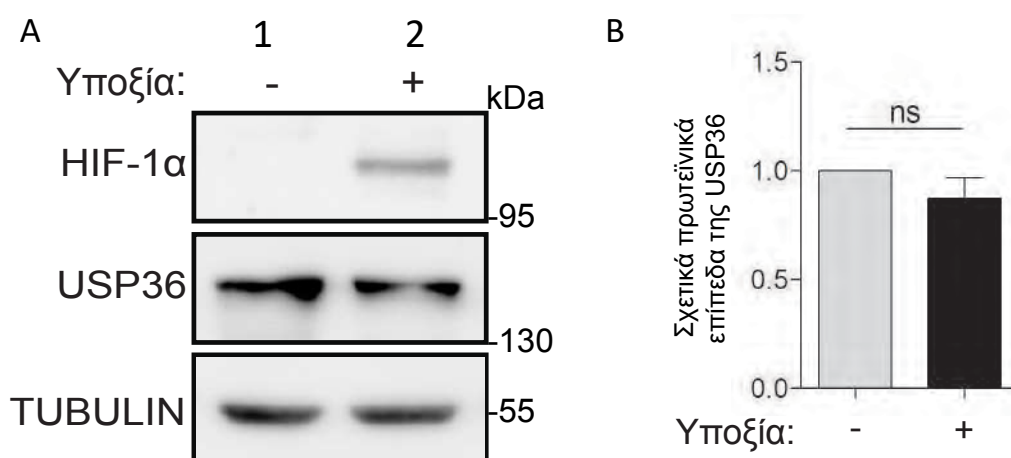
Εικόνα 32: Η αποσιώπηση της USP36 καταργεί τη σουμοϋλίωση της EXOSC10. Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της ενδογενούς EXOSC10 στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία διαμολύνθηκαν είτε με nt siRNA (nt), είτε με siRNA έναντι των USP36 και p14^{ARF} και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία (-) ή υποξία (1% O₂) (+) με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

έναντι της ενδογενούς EXOSC10, των USP36 και p14^{ARF} (έλεγχος αποσιώπησης), του HIF-1α (δείκτης υποξίας), της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η σουμοϋλιωμένη μορφή της EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

1.2.4 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της USP36

Δεδομένου ότι η USP36 ταυτοποιήθηκε ως μία πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την σουμοϋλίωση της EXOSC10, μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας ως προς την έκφραση και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της.

Αρχικά, κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και στα κυτταρικά τους εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς USP36 με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 33), όπου φάνηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δεν αλλάζουν μεταξύ νορμοξίας (Εικόνα 33A, διαδρομή 1) και υποξίας (Εικόνα 33A, διαδρομή 2). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με την ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων της USP36 (Εικόνα 33B) από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα. Επομένως, η υποξία δεν βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση της USP36, το οποίο πιθανόν θα επηρέαζε με τη σειρά του την σουμοϋλίωση της EXOSC10.

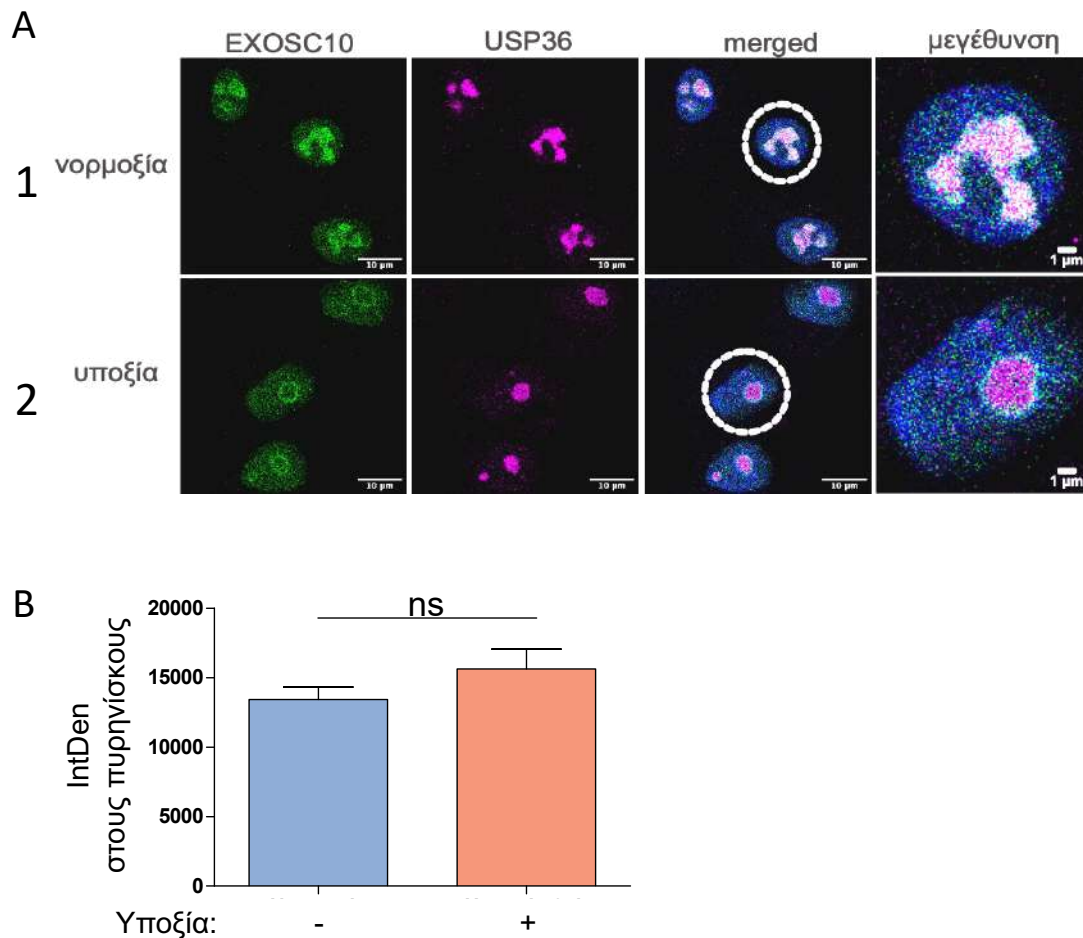


Εικόνα 33: Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενδογενούς USP36 δεν αλλάζουν στην υποξία.
Α) Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενδογενούς USP36 σε εκχυλίσματα

καρκινικών κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ενδογενούς USP36, της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφορτώματος) και του HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας). Β) Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της USP36 σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (+). Στον άξονα Y, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές των επιπέδων της USP36 κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα (ns, $P > 0.05$). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) και η στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.

Προχωρώντας, όσον αφορά τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της USP36 στην υποξία, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) και ελέγχθηκε με κατάλληλο αντίσωμα τόσο ο εντοπισμός της USP36 όσο και της EXOSC10 σε πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού.

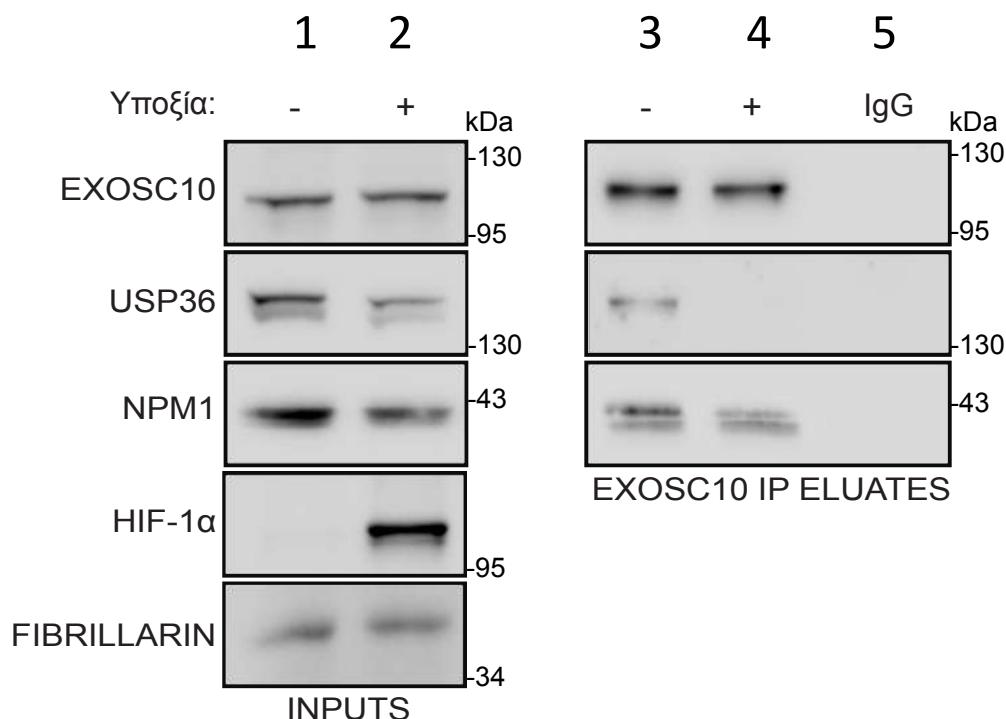
Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 34A, στην νορμοξία, η USP36 βρέθηκε σχεδόν αποκλειστικά στους πυρηνίσκους όπου συνεντοπίστηκε με την EXOSC10 (Εικόνα 34A, διαδρομή 1). Αντίθετα, στην υποξία, οι δύο πρωτεΐνες έχασαν τον συνεντοπισμό τους, καθώς η USP36 παρέμεινε εστιασμένα στους πυρηνίσκους (Εικόνα 34A, διαδρομή 2, μωβ χρώση), ενώ η EXOSC10 διαχύθηκε στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 34A, διαδρομή 2, πράσινη χρώση). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και μετά από σύγκριση του σήματος φθορισμού της USP36 στους πυρηνίσκους ανάμεσα στις δύο συνθήκες, όπως αποτυπώνεται στο διάγραμμα της εικόνα 34B (ns).



Εικόνα 34: Ο συνεντοπισμός μεταξύ της USP36 με την EXOSC10 χάνεται στην υποξία. A) Έλεγχος του εντοπισμού των ενδογενών EXOSC10 και USP36 σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες με συνεστιακή μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών EXOSC10 (πράσινη χρώση) και USP36 (μωβ χρώση), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε χρώση, merged). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm ή 1 μm. Με άσπρο διακεκομμένο πλαίσιο σημαίνεται το κύτταρο που παρουσιάζεται σε μεγέθυνση της κλίμακας 1μm (μεγέθυνση). B) Ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης USP36 στους πυρηνίσκους σε νορμοξία (-) και 24ωρη υποξία (1% O₂) (+). Συμπεριλήφθηκαν 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα από τα οποία αναλύθηκαν συνολικά 50 κύτταρα για κάθε συνθήκη (n=50, ns >0.05). Για κάθε κύτταρο υπολογίσθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) των πυρηνίσκων, οι τιμές που προέκυψαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Έχοντας υπόψιν την παρατηρούμενη αλλαγή του συνεντοπισμού της EXOSC10 και της USP36 στην υποξία, προσπαθήσαμε, έπειτα, να αξιολογήσουμε το αποτέλεσμα και με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της EXOSC10 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (EXOSC10-IP) σε νορμοξικά και υποξικά κύτταρα (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών) (Εικόνα 35). Ειδικότερα, για τον εμπλουτισμό των δύο πρωτεϊνών, η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε σε πυρηνικά κλάσματα κυττάρων HeLa που είχαν επωαστεί για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂). Ως συνθήκη κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά κλάσματα νορμοξικών κυττάρων, τα οποία επώαστηκαν με IgG ανοσοσφαιρίνες. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση των συμπλόκων της EXOSC10 σε σφαιρίδια αγαρόζης, ακολούθησε έκλουση και ανάλυση των πυρηνικών κλασμάτων πριν την ανοσοκατακρήμνιση και των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 35.

Όπως φαίνεται με αντίσωμα έναντι μίας χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των πυρηνίσκων της fibrillarin (305), ίση ποσότητα πυρηνικών κλασμάτων επώαστηκε με τα σφαιρίδια και στις δύο συνθήκες (Εικόνα 35, σύγκριση διαδρομών 1 και 2), ενώ αντίστοιχα στα εκλούσματα, με αντίσωμα έναντι της EXOSC10 επιβεβαιώθηκε η επιτυχής και ισόποση δέσμευση της στα σφαιρίδια. Στην νορμοξία, η EXOSC10 συγκατακρημνίστηκε τόσο με την USP36 όσο και με μία άλλη πρωτεΐνη των πυρηνίσκων την NPM1 (Εικόνα 35, διαδρομή 3). Ενδιαφέρον παρουσίασε ότι στην υποξία, ενώ η αλληλεπίδραση της EXOSC10 με την NPM1 παρέμεινε, αντίθετα, η αλληλεπίδραση της με την USP36 καταργήθηκε (Εικόνα 35, διαδρομή 4) γεγονός που επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα του παραπάνω ανοσοφθορισμού (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Η EXOSC10 χάνει την αλληλεπίδρασή της με την USP36 στην υποξία. Έλεγχος της συγκατακρήμνισης των ενδογενών EXOSC10 και USP36 σε πυρηνικά κλάσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂), μετά από ανοσοκατακρήμνιση της EXOSC10 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (EXOSC10-IP). Ως κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με IgG. Δείγματα από τα πυρηνικά κλάσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των ενδογενών EXOSC10, USP36, NPM1, HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας) και FIBRILLARIN (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η υποξία διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ της EXOSC10 και της USP36, η οποία πιθανά προκαλείται από την αλλαγή της οργάνωσης των συμπλόκων του πυρηνίσκου, οδηγώντας τελικά στην παρατηρούμενη αποσυνμούλιωση της EXOSC10.

2. Μελέτη του βιολογικού ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία

Πέραν της μελέτης της επίδρασης της υποξίας στην EXOSC10 και στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης της, ένας επιμέρους εξίσου σημαντικός άξονας στη παρούσα

διδασκαλική διατριβή ήταν η διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της τροποποίησης αυτής, στην κυτταρική λειτουργία της πρωτεΐνης αλλά και στο πλαίσιο της απόκρισης των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου.

2.1 Εύρεση της κύριας θέσης σουμοϋλίωσης της EXOSC10

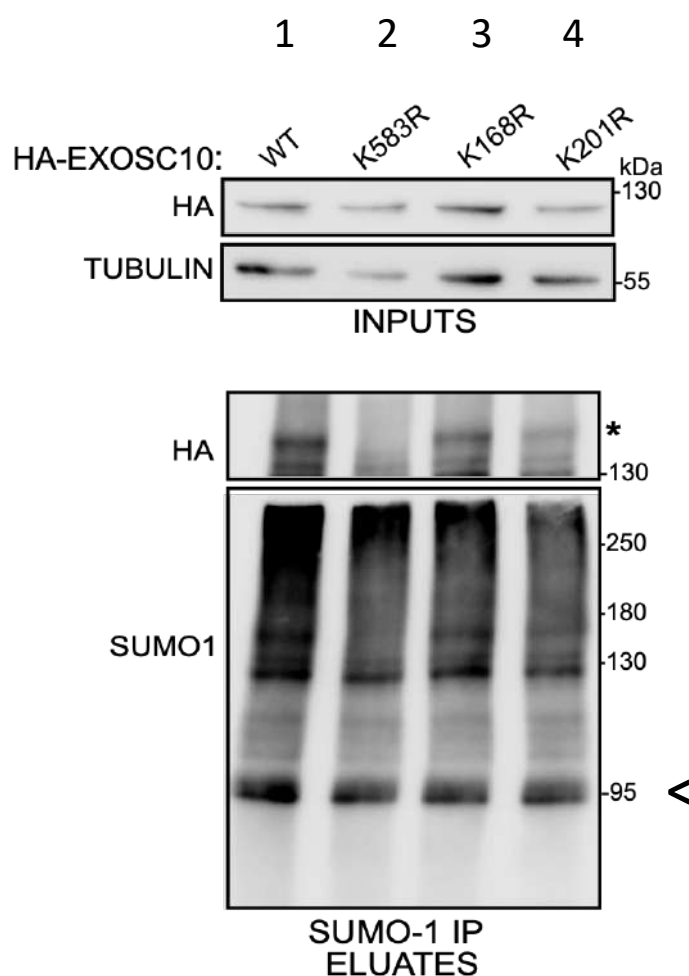
Πρώτο στάδιο για την διεκπεραίωση του παραπάνω στόχου, ήταν η εύρεση της κύριας θέσης σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και η κατασκευή μεταλλάγματος το οποίο θα στερείται την ικανότητα σύζευξης με τη SUMO.

Σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη του εργαστηρίου (Φιλιπποπούλου Χ., μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, 2019), με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής έγινε πρόγνωση τριών πιθανών θέσεων σουμοϋλίωσης. Μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με τη μέθοδο της PCR, προκλήθηκαν μεταλλάξεις αλλαγής των πιθανών λυσινών-στόχων σε αργινίνες $K \rightarrow R$ ($AAA \rightarrow AGA$) στα κατάλληλα πλασμίδια, από τα οποία μπορούν να εκφραστούν σε ευκαρυωτικά κύτταρα πλήρους μεγέθους μορφές της EXOSC10 σε σύντηξη με τον επίτοπο HA. Οι κατασκευές που παραλήφθηκαν ήταν οι εξής: pcDNA3.1 HA-EXOSC10 K168R (*K168R*), pcDNA3.1 HA- EXOSC10 K201R (*K201R*), pcDNA3.1 HA-EXOSC10 K168R (306).

Για την ακριβέστερη ταυτοποίηση της θέσης σουμοϋλίωσης της EXOSC10, βελτιστοποιήθηκαν προηγούμενες προσπάθειες πειραμάτων υπερέκφρασης των παραπάνω μεταλλαγμάτων σε ευκαρυωτικά κύτταρα και ελέγχου της ικανότητας σουμοϋλίωσης τους. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις K168R, K201R, K583R καθώς και την αλληλουχία για την έκφραση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου HA-EXOSC10 (259) με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου PEI. Τα κύτταρα επώαστηκαν στην νορμοξία για 24 ώρες και στα κυτταρικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών SUMO-1 IP. Τα δείγματα πριν τη διεξαγωγή της ανοσοκατακρήμνισης και τα εκλούσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 36).

Όσον αφορά τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA επιβεβαιώθηκε η επιτυχής έκφραση όλων των διαφορετικών HA-EXOSC10 μορφών σε παρόμοια επίπεδα (Εικόνα 36, διαδρομές 1-4), ενώ στα

εκλούσματα, μετά από ανοσοαποτύπωση με το ίδιο αντίσωμα, η διακριτή ζώνη που αντιστοιχεί στην σουμοϋλιωμένη μορφή της χιμαιρικής EXOSC10 (συμβολίζεται με *) εμφανίστηκε πέραν της αγρίου τύπου (Εικόνα 36, διαδρομή 1) και στην μορφή που φέρνει την μετάλλαξη K168R (Εικόνα 36, διαδρομή 3) και σε χαμηλότερα επίπεδα στη μορφή με τη μετάλλαξη K201R (Εικόνα 36, διαδρομή 4), ενώ απουσιάζει παντελώς στην μορφή που φέρει την μετάλλαξη K583R (Εικόνα 36, διαδρομή 2). Η υπερεκφρασμένη HA-EXOSC10 K583R, συνεπώς, στερείται πλήρως της ικανότητας σουμοϋλίωσης.



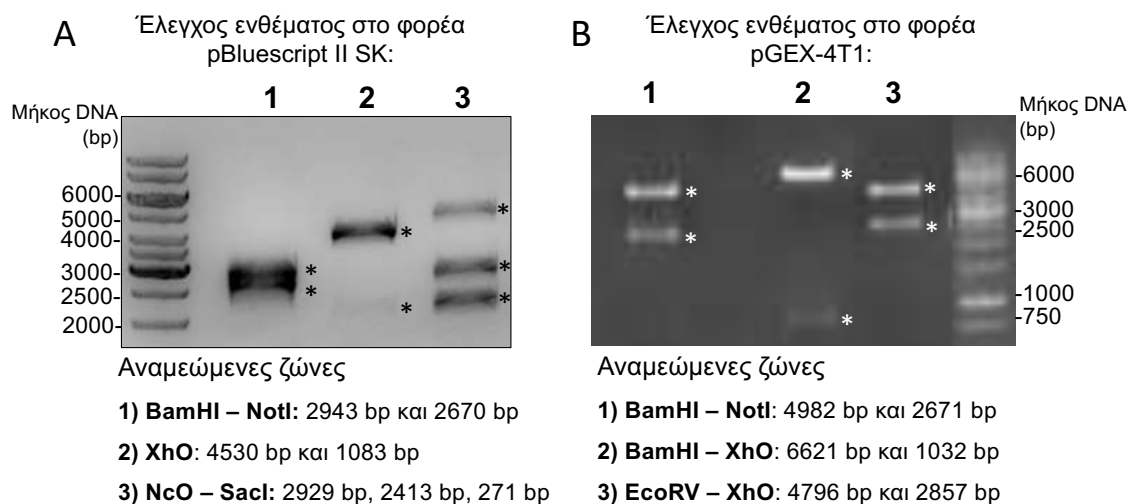
Εικόνα 36: Η μετάλλαξη της λυσίνης K583 σε αργινίνη προκαλεί την απώλεια της ικανότητας σουμοϋλίωσης της υπερεκφρασμένης HA-EXOSC10. Έλεγχος της σουμοϋλίωσης των υπερεκφρασμένων HA-EXOSC10 αγρίου τύπου και μορφών που φέρουν μεταλλάξεις K → R σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa με ανοσοκατακρήμνιση SUMO-1 IP. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA3.1 HA-EXOSC10 WT, pcDNA3.1 HA-EXOSC10 K168R, pcDNA3.1 HA-EXOSC10 K201R, pcDNA3.1 HA-EXOSC10 K583R για την υπερέκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών και επωάστηκαν για 24 ώρες στην νορμοζία. Δείγματα από τα ολικά εκχυλίσματα (INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση

κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του επιτόπου HA, της SUMO-1 (δείκτης ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών) και της τουμπουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Αριστερά σημειώνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και δεξιά ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η σουμοϋλιωμένη μορφή της HA-EXOSC10 συμβολίζεται με *. Με < συμβολίζεται η σουμοϋλιωμένη RanGAP1 (δείκτης ισοφορτώματος των εκλουσμάτων).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η κύρια λυσίνη της EXOSC10 που αποτελεί στόχος σουμοϋλίωσης και *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της *in vitro* σουμοϋλίωσης (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.4.8 *In vitro* σουμοϋλίωση). Για την επίτευξη της μεθόδου αυτής, ήταν απαραίτητη η κατασκευή των κατάλληλων πλασμιδίων για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων GST-EXOSC10 WT και GST-EXOSC10 K583R μορφών από βακτήρια.

Κατά την εισαγωγή του cDNA της EXOSC10 στο φορέα *pCDNA 3.1*, μεταξύ του κωδικονίου λήξης και του άκρου XbaI δημιουργήθηκε η αλληλουχία 5'-GATC-3', η οποία αναγνωρίζεται από τις μεθυλάσες DAM των βακτηρίων και μεθυλιώνεται. Λόγω της τροποποίησης αυτής, είναι μη δυνατή η δράση του ενζύμου XbaI και ως εκ τούτου η εκ νέου απομόνωση του cDNA για την εισαγωγή του σε άλλους πλασμιδιακούς φορείς. Για αυτό το λόγο, το πλήρες cDNA της EXOSC10 αγρίου τύπου και αυτό που φέρει τη μετάλλαξη K583R απομονώθηκαν από τα πλασμίδια *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 WT* και *pCDNA 3.1-HA-EXOSC10 K583R* αντίστοιχα, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια, στα PCR προϊόντα δημιουργήθηκαν με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών άκρα BamHI-XbaI και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα *pBluescript II SK (+/-)*, ώστε να είναι δυνατή στη συνέχεια η απομόνωση τους από μεγαλύτερο εύρος περιοριστικών ενδονουκλεασών. Έπειτα, από τα πλασμίδια *pBluescript II SK EXOSC10 WT* και *pBluescript II SK EXOSC10 K583R*, τα αντίστοιχα τμήματα της αλληλουχίας για την EXOSC10 παραλήφθηκαν μέσω της δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BamHI-NotI και κλωνοποιήθηκαν εκ νέου στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX-4T1*. Ο φορέας αυτός ενδείκνυται για την υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που προκύπτουν είναι σε σύντηξη με τον επίτοπο GST. Τα παραπάνω πλασμίδια που κατασκευάστηκαν ελέγχθηκαν για την ακεραιότητα και την ορθότητα τους μέσω πέψων με επιλεγμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα τμήματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα μεγέθη των τμημάτων που προέκυψαν για τις πλασμιδιακές κατασκευές *pBluescript II*

SK EXOSC10 και *pGEX-4T1 EXOSC10* μετά από διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι στα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων και παρουσιάζονται ενδεικτικά στην εικόνα 37Α και Β αντίστοιχα.

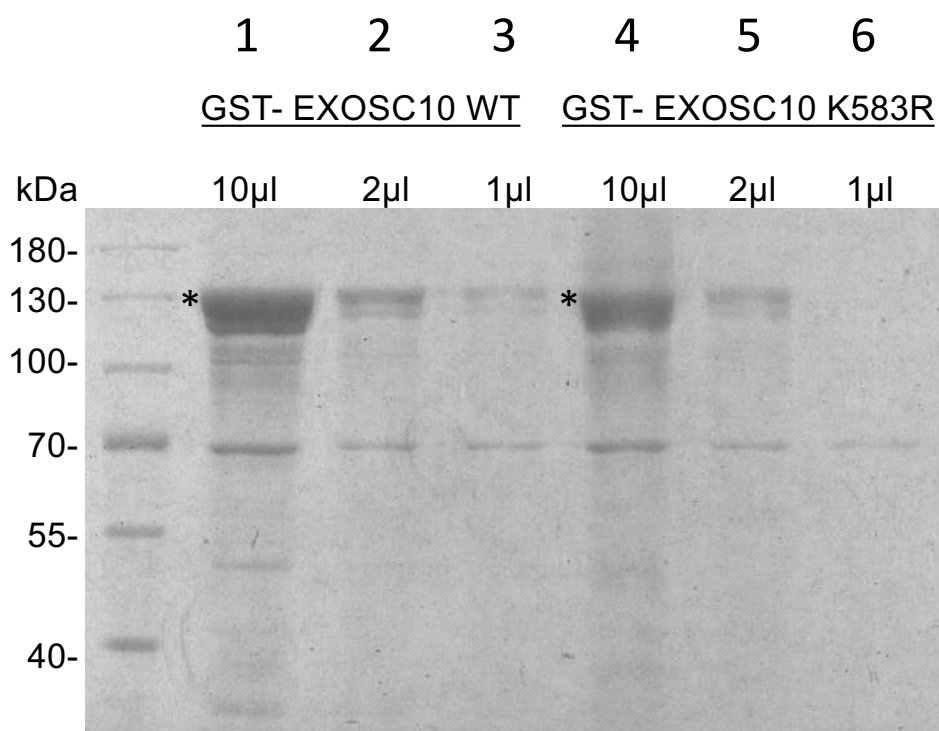


Εικόνα 37: Κλωνοποίηση της αγρίου τύπου HA-EXOSC10 ή της μορφής που φέρει την μετάλλαξη K583R στους βακτηριακούς φορείς έκφρασης pBluescript II SK και pGEX-4T1.

Έλεγχος της ορθότητας των πλασμιδίων pBluescript II SK EXOSC10 (A) και pGEX-4T1 EXOSC10 (B) που κατασκευάστηκαν με διαγνωστικές πέψεις, BamHI-NotI (1), XhoI (2) και NcoI-SacI (3) ή BamHI-NotI (1), BamHI-XhoI (2), EcoRV-XhoI (3) αντίστοιχα. Τα τμήματα DNA που προέκυψαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης. Παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα δύο πλασμίδια που κατασκευάστηκαν, όπου σημειώνονται με * τα τμήματα που προέκυψαν μετά τις πέψεις, καθώς και τα θεωρητικά αναμενόμενα μεγέθη για κάθε συνδυασμό πέψεων. Αριστερά (A) ή δεξιά (B) σημειώνεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA.

Εφόσον ενσωματώθηκε επιτυχώς η αλληλουχία για την έκφραση της EXOSC10 και μορφών της στους απαραίτητους πλασμιδιακούς, βακτηριακά στελέχη E.coli BL21RIL μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια που προέκυψαν, *pGEX-4T1 EXOSC10 WT* και *pGEX-4T1 EXOSC10 K583R* και έγινε επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων GST-EXOSC10, οι οποίες στη συνέχεια απομονώθηκαν με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας αгарόζης – GSH (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.2 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση χιμαϊρικών GST πρωτεϊνών). Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν όπως αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (εικόνα 38) είχαν το αναμενόμενο μοριακό βάρος (συμβολίζεται με *),

απομονώθηκαν σε σχεδόν καθαρή μορφή με απόδοση 300 μg / 1200ml αρχικής καλλιέργειας ή συγκέντρωση 2.5 μM .

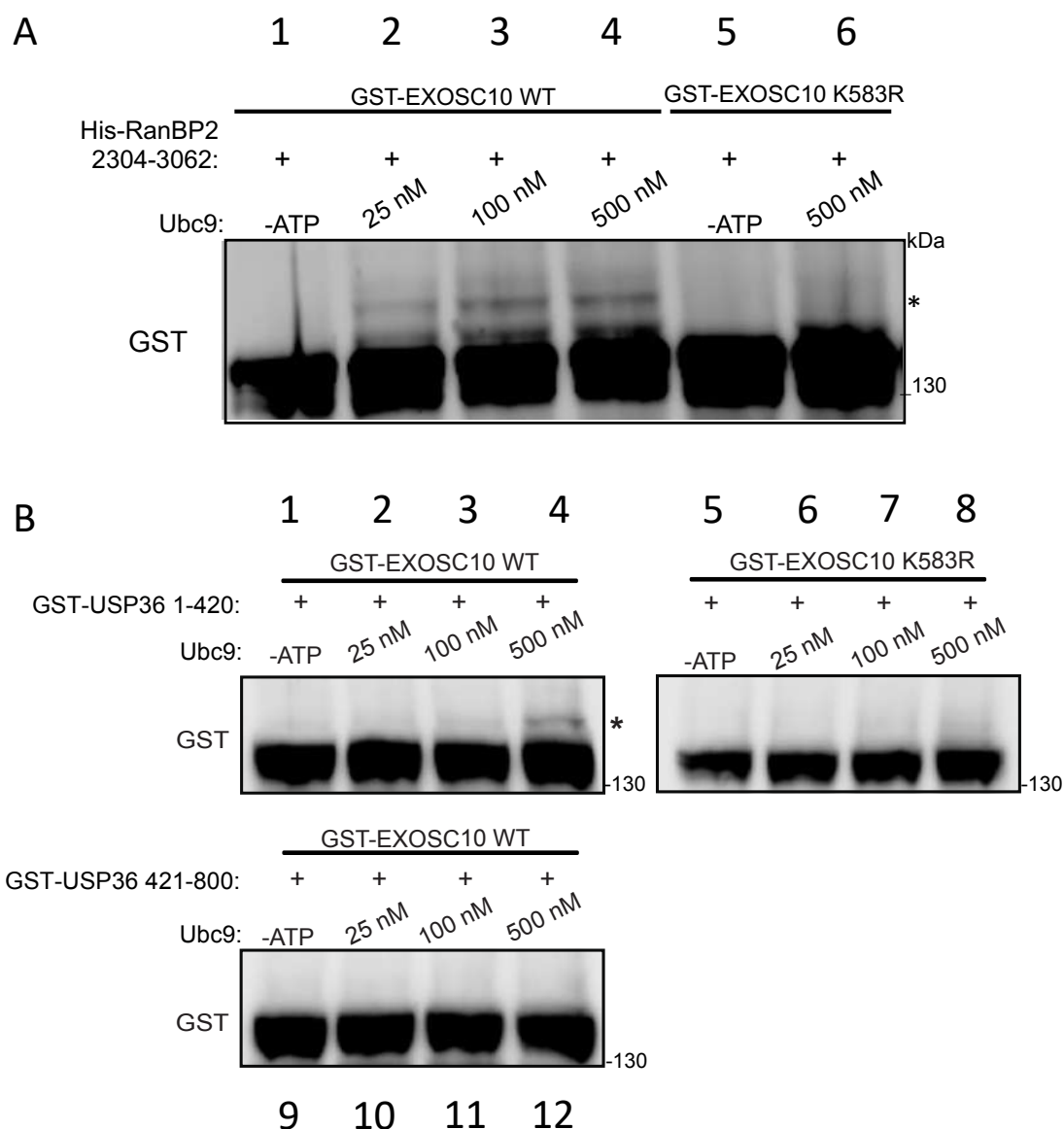


Εικόνα 38: Οι GST-EXOSC10 WT και K583R απομονώθηκαν επιτυχώς από βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Ανάλυση τριών εκλουσμάτων που περιέχουν τις GST-EXOSC10 WT (διαδρομές 1-3) και GST-EXOSC10 K583R (διαδρομές 4-6), τα οποία προέκυψαν μετά από βακτηριακή υπερέκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών GST-EXOSC10 WT και GST-EXOSC10 K583R με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας αφαρόξης – GSH. Τα εκλούσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue. Οι πλήρους μεγέθους GST-EXOSC10 πρωτεΐνες που εμπλουτίστηκαν σημειώνονται με αστερίσκο (*). Αριστερά σημειώνεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Αφού απομονώθηκαν επιτυχώς, οι χιμαιρικές GST-EXOSC10, εισήχθησαν σε αντιδράσεις *in vitro* σουμοϋλίωσης (βλ.Γ.2.Μέθοδοι-2.4.8 *In vitro* σουμοϋλίωση). Οι αντιδράσεις αυτές περιείχαν όλα τα απαραίτητα στοιχεία του μηχανισμού σουμοϋλίωσης, δηλαδή την SUMO-1, τα E1 και E2 (Ubc9) ένζυμα και είτε το καταλυτικό τμήμα της E3 λιγάσης RanBP2 (His-RanBP2 2304-3062) (19107418) (βλ. Α.Εισαγωγή-1.1.4 Σύζευξη των SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους: ένζυμα E2 και E3), είτε λειτουργικό τμήμα της USP36 που φέρει την ικανότητα SUMO E3 λιγάσης (GST-USP36 1-420) (68), ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν η αγρίου τύπου χιμαιρική GST-EXOSC10 και η αντίστοιχη μορφή της που φέρει την μετάλλαξη K583R. Ως

συνθήκες αρνητικού κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις παρουσία τμήματος της USP36 που δεν έχει την ικανότητα λιγάσης (GST-USP36 421-800) (68) και αντιδράσεις στις οποίες δεν είχε προστεθεί ATP. Δείγματα των αντιδράσεων που προέκυψαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST (Εικόνα 39).

Πράγματι, η αγρίου τύπου GST-EXOSC10 (259) σουμοϋλιώθηκε *in vitro* είτε παρουσία της χαρακτηρισμένης λιγάσης RanBP2 (Εικόνα 39A, διαδρομές 2-4), είτε παρουσία του λειτουργικού τμήματος της 1-420 της USP36 (Εικόνα 39B, διαδρομή 4), όπως σημειώνεται με αστερίσκο (*) ανοδικά της μη τροποποιημένης μορφής. Ενδιαφέρον είναι πως η USP36 από μόνη της ήταν ικανή να προωθήσει τη σουμοϋλίωση της EXOSC10 *in vitro*, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η USP36 είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη που ρυθμίζει άμεσα την σύζευξη της SUMO στην EXOSC10. Επιπλέον, τόσο απουσία ATP (Εικόνα 39A, διαδρομή 1 και Εικόνα 39B διαδρομή 1), όσο και παρουσία του τμήματος της USP36 που δεν έχει την ικανότητα λιγάσης (GST-USP36 421-800) (Εικόνα 39B διαδρομές 9-12), δεν παρατηρήθηκε κανένα ποσοστό σουμοϋλίωσης της GST-EXOSC10 WT. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη μορφή της EXOSC10, GST-EXOSC10 K583R δεν μπόρεσε να σουμοϋλιωθεί *in vitro* ούτε παρουσία της RanBP2 (Εικόνα 39A, διαδρομή 6) αλλά ούτε και παρουσία της λειτουργικής USP36 (Εικόνα 39A, διαδρομή 8), υποδεικνύοντας ότι η χημική αυτή πρωτεΐνη στερείται πλήρως της ικανότητας σουμοϋλίωσης.



Εικόνα 39: Η μετάλλαξη της λυσίνης K583 σε αργινίνη προκαλεί την απώλεια της ικανότητας σουμοϋλίωσης της *GST-EXOSC10 in vitro*. Έλεγχος της ικανότητας σουμοϋλίωσης των *GST-EXOSC10 WT* και *GST-EXOSC10 K583R* με τη μέθοδο της *in vitro* σουμοϋλίωσης. Οι *GST-EXOSC10 WT* και *K583R* εισήχθησαν σε αντιδράσεις που περιείχαν καθαρές μορφές των συντελεστών του μηχανισμού σουμοϋλίωσης: *SUMO-1*, *E1* ένζυμο, αυξανόμενες συγκεντρώσεις *Ubc9* (25 nM – 500 nM), καταλυτικό τμήμα *His-RanBP2 2304-3062* και λειτουργική ή μη λειτουργική μορφή της *USP36* (*GST-USP36 1-420* και *GST-USP36 421-800* αντίστοιχα). Σε όλες τις αντιδράσεις έγινε προσθήκη *ATP*, εκτός της συνθήκης κοντρόλ (-*ATP*). Τα δείγματα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με *SDS-PAGE* και ανοσοαποτύπωση κατά *Western* με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του επιτόπου *GST*. Η σουμοϋλιωμένη μορφή συμβολίζεται με αστερίσκο (*), ανοδικά της μη τροποποιημένης *GST-EXOSC10*.

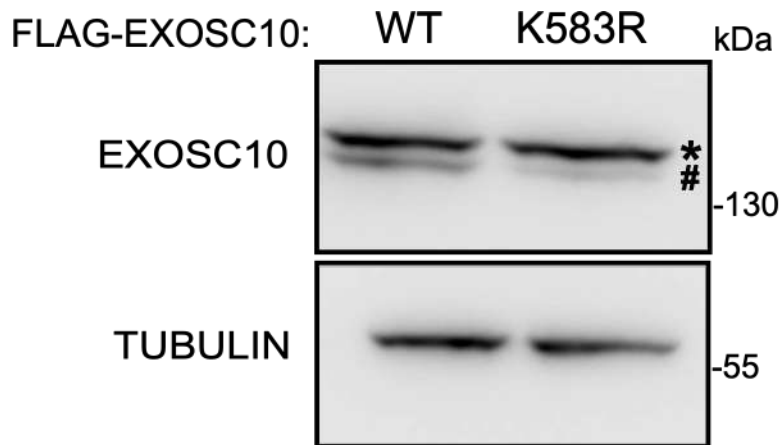
Επομένως, λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης και ελέγχου της σουμοϋλίωσης μεταλλαγμάτων της HA-EXOSC10 σε ευκαρυωτικά κύτταρα, όσο και τα αποτελέσματα της δοκιμής *in vitro* σουμοϋλίωσης των εκφρασμένων από βακτήρια GST-EXOSC10, καταλήγουμε στο ότι η λυσίνη 583 είναι η κύρια λυσίνη που τροποποιείται από τη SUMO-1.

2.2 Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών HeLa Flp-In

Στη συνέχεια, προκειμένου να συγκριθεί η κυτταρική λειτουργία της αγρίου τύπου της EXOSC10 που έχει τη δυνατότητα σουμοϋλίωσης με τον μεταλλαγμένη μορφή της (306) που έχει χάσει την ικανότητα αυτή, κατασκευάστηκαν κυτταρικές σειρές HeLa με τη χρήση του συστήματος Flp-In T-Rex (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), οι οποίες μπορούν με την προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης τετρακυκλίνης/δοξυκυκλίνης να εκφράζουν ανθεκτικές σε siRNA μορφές της αγρίου τύπου ή της μεταλλαγμένης στη θέση K583 EXOSC10 σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, ενώ γίνεται παράλληλα παροδική αποσιώπηση της έκφρασης της ενδογενούς EXOSC10. Οι κυτταρικές αυτές σειρές κατασκευάστηκαν στο Εργαστήριο της Dr. Katherine Bohnsack από την υποψήφια διδάκτορα Chairini Thome στο Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν (Γερμανία) στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο μας (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.3.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια).

Αναλυτικότερα, δημιουργήθηκαν οι εξής σειρές: HeLa Flp-In FLAG, η οποία φέρει την αλληλουχία για την επαγόμενη έκφραση μόνο του επιτόπου FLAG, (χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό κοντρόλ), HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT, η οποία φέρει την αλληλουχία για την έκφραση της FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R, η οποία φέρει την αλληλουχία για την έκφραση της FLAG-EXOSC10 K583R.

Στις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In έγινε επιβεβαίωση της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των FLAG-EXOSC10 μορφών. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα siRNA για την αποσιώπηση της ενδογενούς EXOSC10 για 24 ώρες και επάχθηκαν παρουσία δοξυκυκλίνης για άλλες 24 ώρες στην νορμοξία. Στα ολικά εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών, πρώτα, ελέγχθηκε η έκφραση των FLAG-EXOSC10 WT και K583R με ανοσοαποτύπωση κατά Western.



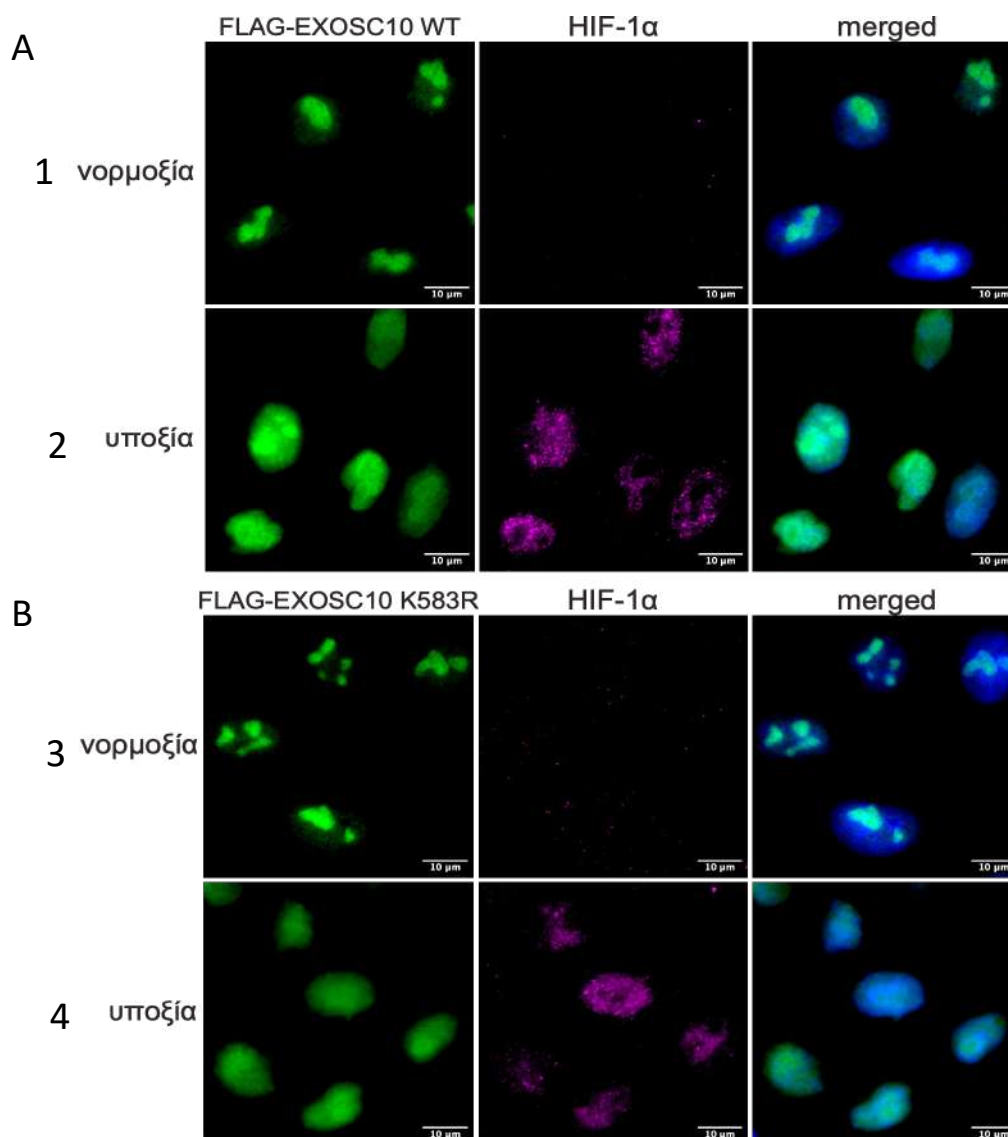
Εικόνα 40: Οι *FLAG-EXOSC10 WT* και *K583R* εκφράζονται επιτυχώς στις κυτταρικές σειρές *Flp-In*. Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενδογενούς *EXOSC10* και των ανθεκτικών σε *siRNA FLAG-EXOSC10 WT* και *K583R* στα εκχυλίσματα των κυττάρων *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT* και *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R*, στα οποία είχε προηγηθεί διαμόλυνση με τα κατάλληλα *siRNA* έναντι της ενδογενούς *EXOSC10* για 24 ώρες και προσθήκη δοξκυκλίνης (1μg/ml) για άλλες 24 ώρες, με *SDS-PAGE* και ανοσοαποτύπωση κατά *Western*. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της *EXOSC10* και της τουμπουλίνης (έλεγχος ισοφορτώματος). Με * συμβολίζονται οι *FLAG* μορφές της *EXOSC10*, ενώ με # η ενδογενής πρωτεΐνη.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της *EXOSC10*, ανιχνεύονται δύο ζώνες. Η πάνω ζώνη αντιστοιχεί στις *FLAG-EXOSC10 WT* και *K583R*, οι οποίες εκφράζονται επιτυχώς σε όμοια επίπεδα (Εικόνα 40, συμβολίζονται με *) και παραμένουν σταθερές παρουσία των *siRNA* έναντι της *EXOSC10*, σε αντίθεση με την ενδογενή πρωτεΐνη (Εικόνα 40, συμβολίζεται με #), τα επίπεδα της οποίας είναι χαμηλά.

Οι ίδιες κυτταρικές σειρές, επάχθηκαν ομοίως με πριν παρουσία δοξκυκλίνης και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1% O_2), όπου ελέγχθηκε ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των *FLAG-EXOSC10 WT* και *K583R* με πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του επιτόπου *FLAG* αλλά και του *HIF-1α*.

Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 41, στην νορμοξία τόσο η αγρίου τύπου (Εικόνα 41A, διαδρομή 1, πράσινη χρώση), όσο και η *K583R* μορφή που δεν σουμοϋλιώνεται (Εικόνα 41B, διαδρομή 1, πράσινη χρώση) εκφράστηκαν σε παρόμοια επίπεδα και μάλιστα εντοπίστηκαν πυρηνικές, κυρίως εστιασμένες στους πυρηνίσκους, όμοια με την περίπτωση της ενδογενούς *EXOSC10*. Ενδιαφέρον είναι ότι στην υποξία,

επίσης, αντίστοιχα με την ενδογενή πρωτεΐνη και οι δύο FLAG-EXOSC10 μορφές ανιχνεύθηκαν περισσότερο διάχυτες στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 41Α, διαδρομή 2 και Β διαδρομή 3, πράσινη χρώση).



Εικόνα 41: Οι FLAG-EXOSC10 WT και K583R εντοπίζονται στους πυρηνίσκους στην νορμοξία και μετακινούνται προς το πυρηνόπλασμα στην υποξία, όμοια με την ενδογενή EXOSC10. Α) Έλεγχος του εντοπισμού των FLAG-EXOSC10 (1^ο πάνελ, πράσινη χρώση) και του HIF-1α (2^ο πάνελ, μωβ χρώση) στις κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και FLAG-EXOSC10 K583R που επάχθηκαν με δοξυκυκλίνη (1μg/ml) για 5 ώρες και επωάστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες με συνεστιακή μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επιτόπου FLAG (πράσινη χρώση) και του HIF-1α (έλεγχος δράσης υποξίας, μωβ χρώση), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (merged, μπλε χρώση). Οι μπάρες ορίζουν την κλίμακα των 10 μm.

Επομένως, καταλήγουμε ότι οι FLAG-EXOSC10 WT και K583R που εκφράζονται επαγόμενα σε κύτταρα HeLa συμπεριφέρονται αντίστοιχα όπως η ενδογενής EXOSC10. Οι κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In όπως αναλύεται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλείο για την μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική λειτουργία της EXOSC10 και στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου.

2.3 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In

Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή (βλ. Α.Εισαγωγή-3.2 Οι κυτταρικές λειτουργίες της EXOSC10), η λειτουργία της EXOSC10 στην αποικοδόμηση των RNA μπορεί να επηρεάσει βασικές βιολογικές διεργασίες των κυττάρων, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μεταναστευτική ικανότητα και η επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Για αυτό το λόγο, ξεκινήσαμε αρχικά μελετώντας την επίδραση της απουσίας της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στο γενικότερο πλαίσιο της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων HeLa, συγκεκριμένα στον ρυθμό πολλαπλασιασμού, στην απόπτωση και στην κινητικότητα τους.

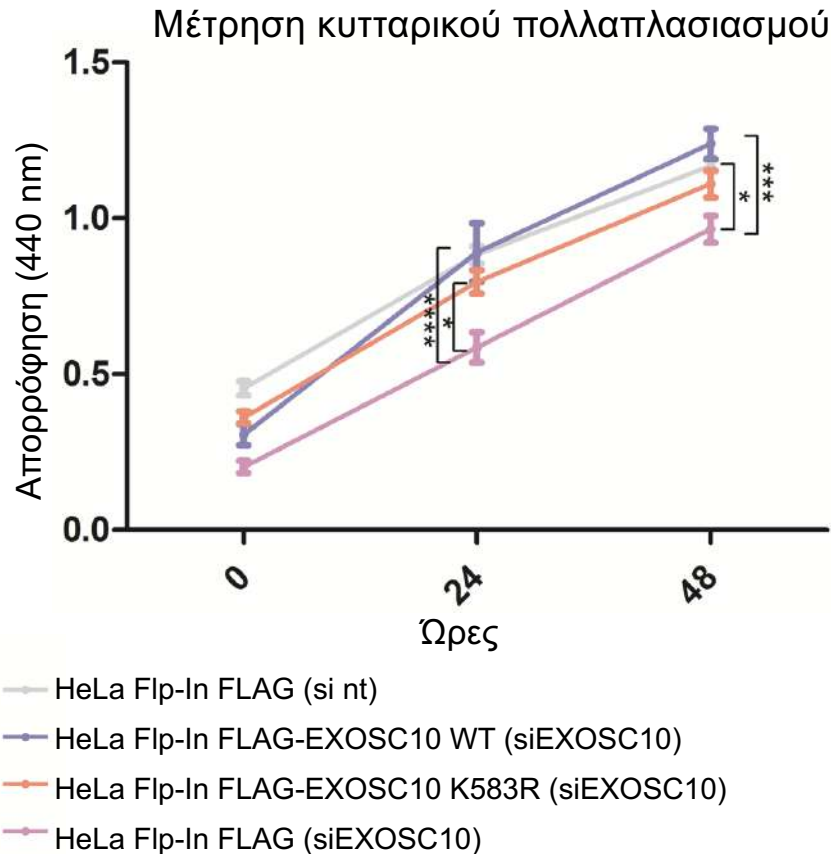
2.3.1 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της απώλειας της ικανότητας σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa.

Ειδικότερα, οι κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R διαμολύνθηκαν με το κατάλληλο siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10 για 24 ώρες, στη συνέχεια επάχθηκαν με τη προσθήκη δοξυκυκλίνης για 5 ώρες, ώστε να ξεκινήσει η έκφραση των πρωτεϊνών FLAG-EXOSC10 και αφέθηκαν για άλλες 48 ώρες στην νορμοξία, ώστε να πολλαπλασιαστούν. Ως συνθήκη αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HeLa Flp-In FLAG, η οποία εκφράζει μόνο τον επίτοπο FLAG και διαμολύνθηκε είτε με non-targeted siRNA (sint, ως αρνητικό κοντρόλ), είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων HeLa Flp-In προσδιορίστηκε με

χρωματομετρική μέθοδο (αντιδραστήριο WST-1, TaKaRa) στηριζόμενη στην αναγωγή του προστιθέμενου τετραζολίου σε προϊόν φορμαζάνης από τα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.6.1 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού), τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 42.

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά HeLa Flp-In FLAG (εκφράζει μόνο τον επίτοπο FLAG), η αποσιώπηση της EXOSC10 σε κύτταρα που επώαστηκαν με το siRNA έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης, μείωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 42, γκρι γραμμή) συγκριτικά με την αντίστοιχη συνθήκη κοντρόλ (sint) (Εικόνα 42, ροζ γραμμή), τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες επώασης. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT που εκφράζει την αγρίου τύπου EXOSC10 (Εικόνα 42, μωβ γραμμή), παρουσίασε παρόμοιο ρυθμό πολλαπλασιασμού όπως και τα κύτταρα της συνθήκης αναφοράς HeLa Flp-In FLAG (sint) (Εικόνα 42, γκρι γραμμή), υποδεικνύοντας πως η δράση της επαγόμενα εκφρασμένης αγρίου τύπου FLAG-EXOSC10 στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεν διαφέρει από αυτήν της ενδογενούς EXOSC10. Όμως, συγκρίνοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT (Εικόνα 42, μωβ γραμμή) με τα κύτταρα HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R (Εικόνα 42, κόκκινη γραμμή) που εκφράζουν την αγρίου τύπου FLAG EXOSC10 και την μη σουμοϋλιωμένη FLAG EXOSC10 αντίστοιχα, είδαμε ότι δεν διαφέρει. Επομένως, ενώ η παρουσία της EXOSC10 είναι απαραίτητη για τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa, η σουμοϋλίωση της δεν φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της βιολογικής διαδικασίας αυτής.



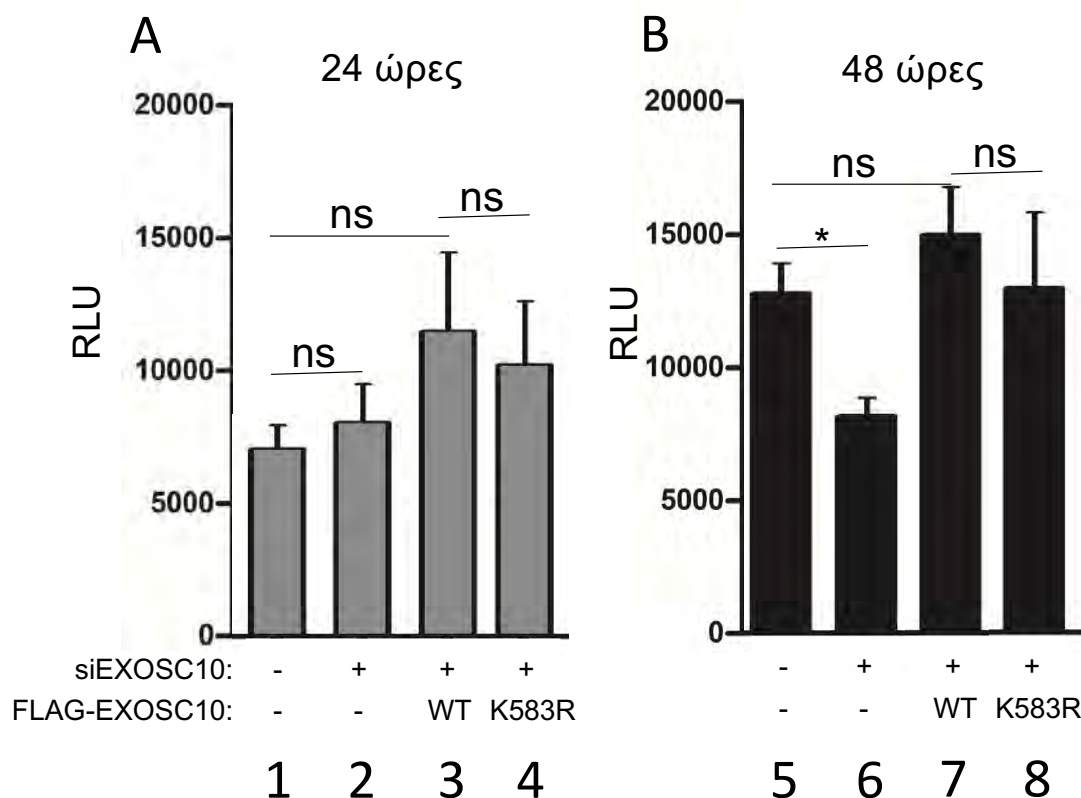
Εικόνα 42: Η απουσία σουμοϋλίωσης της *EXOSC10* δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *HeLa*. Μέτρηση του αριθμού ζωντανών-μεταβολικά ενεργών κυττάρων *HeLa Flp-In FLAG*, *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT* και *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R*, στα οποία έγινε διαμόλυνση είτε με *nt siRNA* (*nt*), είτε με *siRNA* έναντι της ενδογενούς *EXOSC10* (296) για 24 ώρες και επαγωγή της έκφρασης των *FLAG* και *FLAG-EXOSC10* με δοξκυκλίνη (1 µg/ml), με τη χρήση χρωματομετρικής μεθόδου (*WST-1*). Οι μετρήσεις λήφθηκαν στις 0, 24 και 48 ώρες επώασης μετά την επαγωγή και παρουσιάζονται ως τιμές οπτικής απορρόφησης (στα 440 nm), που προέκυψαν από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα των 3 τεχνικών επαναλήψεων ανά συνθήκη (*n*: 9, *****P*<0.0001, ****P*<0.001, **P*<0.05). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος *GraphPad-Prism6*.

2.3.2 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της *EXOSC10* στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων *HeLa Flp-In*

Πέραν του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μελετήθηκε η απώλεια της σουμοϋλίωσης της *EXOSC10* και στην απόπτωση. Ομοίως με πριν, οι κυτταρικές σειρές *HeLa Flp-In FLAG*, *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT* και *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R*

διαμολύνθηκαν είτε με non-targeted siRNA (sint, ως αρνητικό κοντρόλ), είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10, η έκφραση των FLAG ή FLAG-EXOSC10 επάχθηκε με τη προσθήκη δοξυκυκλίνης για 5 ώρες και τα κύτταρα επώστηκαν για άλλες 48 ώρες στην νορμοξία. Η απόπτωση στα κύτταρα αυτά προσδιορίστηκε μέσω της μέτρησης της ενεργότητας των κασπασών 3/7 με τη μέθοδο της λουσιφεράσης (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.6.2 Μέτρηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7), τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 43.

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά HeLa Flp-In FLAG, η αποσιώπηση της EXOSC10 στη συνθήκη με το siRNA έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης, δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα δραστικότητας των κασπασών 3/7 σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη κοντρόλ (sint) στις 24 ώρες (Εικόνα 43A, σύγκριση διαδρομών 1 και 2), ενώ τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν σημαντικά στις 48 ώρες επώασης (Εικόνα 43B, σύγκριση διαδρομών 5 και 6). Άρα, ο μειωμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που παρατηρήθηκε μετά την αποσιώπηση της EXOSC10 παραπάνω, δεν διατελείται μέσω της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού. Όσον αφορά στην σουμοϋλίωση της EXOSC10, η επανέκφραση είτε της FLAG-EXOSC10 WT (Εικόνα 43A, διαδρομή 3 και B διαδρομή 7), είτε της FLAG-EXOSC10 K583R (Εικόνα 43A, διαδρομή 4 και B διαδρομή 8) δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στην δραστικότητα των κασπασών 3/7 και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση της απόπτωσης.



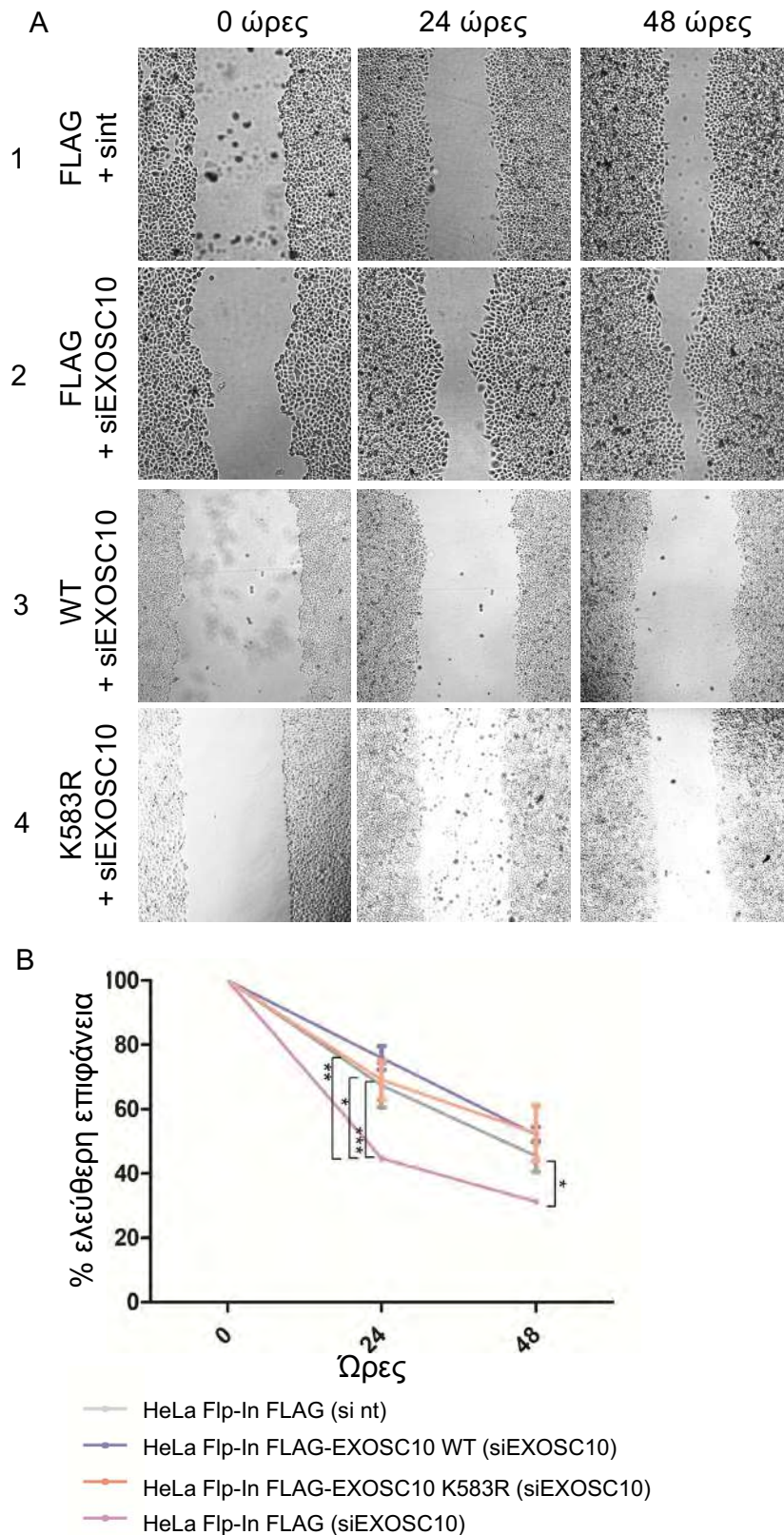
Εικόνα 43: Η απουσία σουμοϋλίωσης της EXOSC10 δεν εμπλέκεται στο μονοπάτι της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 3/7. Μέτρηση της δραστηριότητας των κασπασών 3/7 στα κύτταρα HeLa Flp-In FLAG, HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R, στα οποία έγινε διαμόλυνση είτε με nt siRNA (nt), είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10 (296) για 24 ώρες και επαγωγή της έκφρασης των FLAG και FLAG-EXOSC10 με δοξκυκλίνη (1 µg/ml), με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Οι μετρήσεις λήφθηκαν στις 24 και 48 ώρες επώασης και παρουσιάζονται ως τιμές έντασης χημειοφωταύγειας (Relative Light Units), που προέκυψαν από 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα των 3 τεχνικών επαναλήψεων ανά συνθήκη (n:9, ns $p > 0.05$, * $P < 0.05$). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

2.3.3 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων HeLa Flp-In

Μία ακόμα ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων στην οποία η EXOSC10 έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι συμμετέχει, είναι η ικανότητά τους να μεταναστεύουν (296). Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκε η απώλεια της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων HeLa.

Ομοίως με πριν, οι κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In FLAG, HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R διαμολύνθηκαν είτε με non-targeted siRNA (sint, ως αρνητικό κοντρόλ), είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10, η έκφραση των FLAG ή FLAG-EXOSC10 επάχθηκε με τη προσθήκη δοξυκυκλίνης για 5 ώρες και τα κύτταρα επωάστηκαν για άλλες 48 ώρες στην νορμοξία. Η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών προσδιορίστηκε με την μέθοδο της δοκιμασία επούλωσης, η οποία στηρίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να μετακινούνται από περιοχές μεγάλης κυτταρικής πυκνότητας σε ελεύθερες περιοχές στο τρυβλίο καλλιέργειας (βλ. Γ.2.Μέθοδοι-2.6.3 Δοκιμασία επούλωσης τραύματος) (Εικόνα 44).

Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι απουσία της EXOSC10, το ποσοστό της ελεύθερης περιοχής στη συνθήκη των κυττάρων HeLa Flp-In FLAG παρουσία του siRNA που την στοχεύει (Εικόνα 44A, διαδρομή 2 και B, ροζ γραμμή), ήταν σημαντικά μικρότερο τόσο στις 24 (p^{***}) όσο και στις 48 ώρες (p^*), σε σχέση με την ελεύθερη περιοχή στη συνθήκη κοντρόλ (Εικόνα 44A, διαδρομή 1 και B, γκρι γραμμή), υποδεικνύοντας ότι στα καρκινικά κύτταρα HeLa, η απουσία της EXOSC10 πιθανόν προωθεί την κινητικότητα των κυττάρων. Όσον αφορά την σουμοϋλίωση της EXOSC10, η επανέκφραση είτε της FLAG-EXOSC10 WT (Εικόνα 44A, διαδρομή 3 και B μωβ γραμμή), είτε της FLAG-EXOSC10 K583R (Εικόνα 44A, διαδρομή 4 και B κόκκινη γραμμή) οδήγησε στην μετακίνηση των κυττάρων προς την ελεύθερη επιφάνεια με παρόμοιο ρυθμό, τόσο συγκρίνοντας τις δύο αυτές συνθήκες μεταξύ τους, όσο συγκρίνοντας τις και με τη δράση της ενδογενούς EXOSC10 στα κύτταρα κοντρόλ HeLa Flp-In FLAG (sint) (Εικόνα 44A, διαδρομή 1 και B, γκρι γραμμή). Επομένως, η απουσία της EXOSC10 βρέθηκε να προωθεί την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων HeLa, η σουμοϋλίωση της όμως δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση αυτή.



Εικόνα 44: Η απουσία σονμοϋλίωσης της *EXOSC10* δεν φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων *HeLa*. Προσδιορισμός τη μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων *HeLa Flp-In FLAG*, *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT* και *HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R*, στα οποία έγινε διαμόλυνση είτε με *nt siRNA* (*nt*),

είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10 (296) για 24 ώρες και επαγωγή της έκφρασης των FLAG και FLAG-EXOSC10 με δοξκυκλίνη (1 $\mu\text{g/ml}$), με τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος. Στις εικόνες εμφανίζεται η ελεύθερη περιοχή προς την οποία μετακινήθηκαν τα κύτταρα στους χρόνους των 0, 24 και 48 ωρών επώασης. Στο διάγραμμα, παρουσιάζεται το εμβαδόν της ελεύθερης περιοχής στις 24 και 48 ώρες ως ποσοστό επί της αρχικής ελεύθερης περιοχής κατά την έναρξη της επώασης (0 ώρες). Οι τιμές αυτές προέκυψαν από 5 διαφορετικά σημεία μέτρησης ανά συνθήκη σε 2 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα ($n:10$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

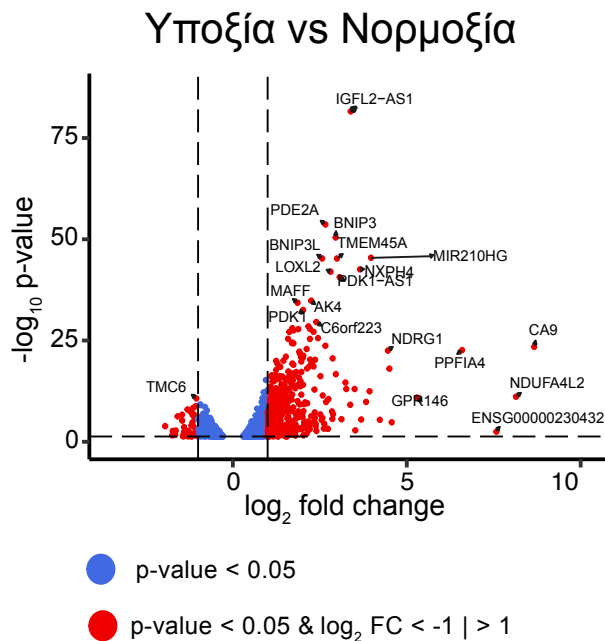
2.4 Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην έκφραση των RNA

Εφόσον δεν βρέθηκε κάποια άμεση φαινοτυπική συσχέτιση μεταξύ της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, προχωρήσαμε ελέγχοντας πιο εξειδικευμένες δράσεις της EXOSC10, όπως η ρύθμιση της έκφρασης των RNA. Δεδομένης της δράσης της EXOSC10 σε συνεργασία με το RNA εξώσωμα, στην αποικοδόμηση σχεδόν όλων των τύπων RNA, σχεδιάστηκαν πειράματα αλληλούχησης ολικού RNA με σκοπό την μελέτη τόσο του ρόλου της EXOSC10 όσο και της σουμοϋλίωσης της στην έκφραση γονιδίων, με ιδιαίτερη εστίαση σε γονίδια στόχους της υποξίας.

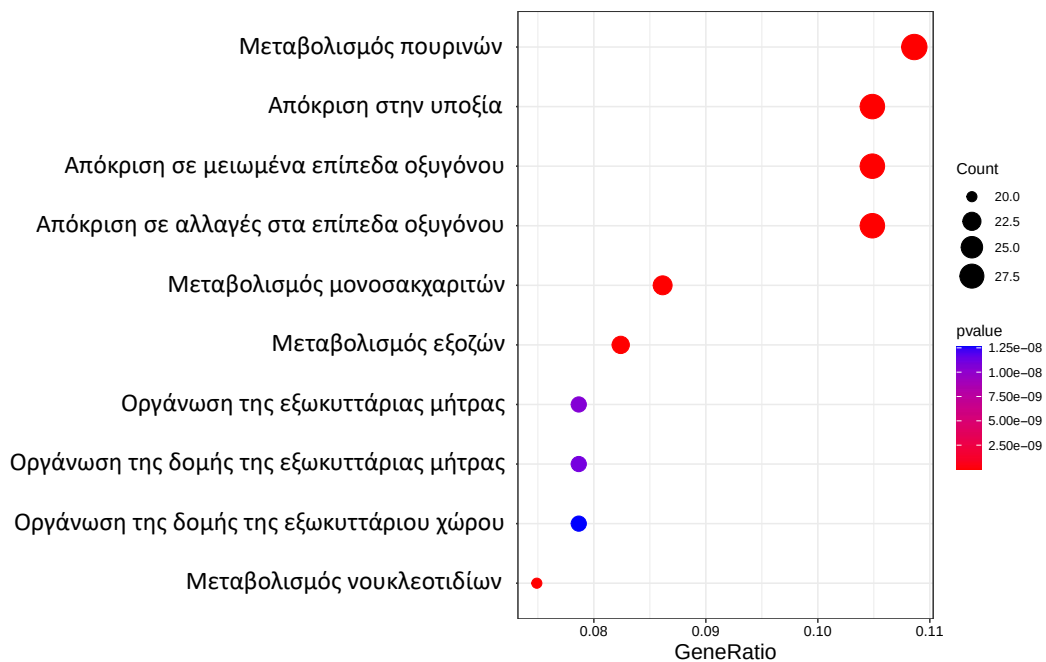
Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa Flp-In FLAG παρουσία (sint) και απουσία της ενδογενούς EXOSC10 (296), καθώς και HeLa Flp-In στα οποία έγινε επαγωγή της έκφρασης της αγρίου τύπου ή της μη σουμοϋλιωμένης FLAG-EXOSC10, καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας. Για την ταυτοποίηση των σχετικών με την απόκριση σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου mRNA, κύτταρα HeLa Flp-In FLAG επώαστηκαν σε υποξία (1 % O_2) για 24 ώρες. Από τα παραπάνω κύτταρα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού RNA, κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης και αλληλούχηση. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της Dr. Katherine Bohnsack (συνεργασία με την group leader Dr. Katherine Bohnsack και την υποψήφια διδάκτορα Chairini Thome, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν, Γερμανία), ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της Dr. Katherine Bohnsack και της ερευνητικής ομάδας της Dr. Ευγενίας Ντίνη (συνεργασία με την group leader Dr. Ευγενία Ντίνη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σοφία Περδικάρη) στο Ερευνητικό Κέντρο «Ιδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας» στην Κρήτη.

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε αρχικά ότι κατά την επώαση των κυττάρων HeLa Flp-In FLAG σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, μεταβλήθηκε η έκφραση μεγάλου αριθμού RNA κυρίως mRNA (Εικόνα 45A), όπως ήταν αναμενόμενο, αφού είναι γνωστό ότι τα κύτταρα ως απόκριση στην υποξία υφίστανται εκτεταμένες αλλαγές στο μεταγραφικό τους προφίλ (βλ. Α.Εισαγωγή-2.1.2 Γονίδια στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων HIF και η σημασία τους στην υγεία και στον καρκίνο). Συγκεκριμένα, η έκφραση 49 μεταγράφων μειώθηκε, ενώ η έκφραση 427 μεταγράφων αυξήθηκε πάνω από 2 φορές στην υποξία, συμπεριλαμβανομένων χαρακτηρισμένων γονιδίων στόχων της υποξίας που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως είναι ο μεταβολισμός των πουρινών, η απόκριση (όπως ήταν αναμενόμενο) σε αλλαγές στα επίπεδα οξυγόνου, ο μεταβολισμός υδατανθράκων και η δομή και οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας.

A



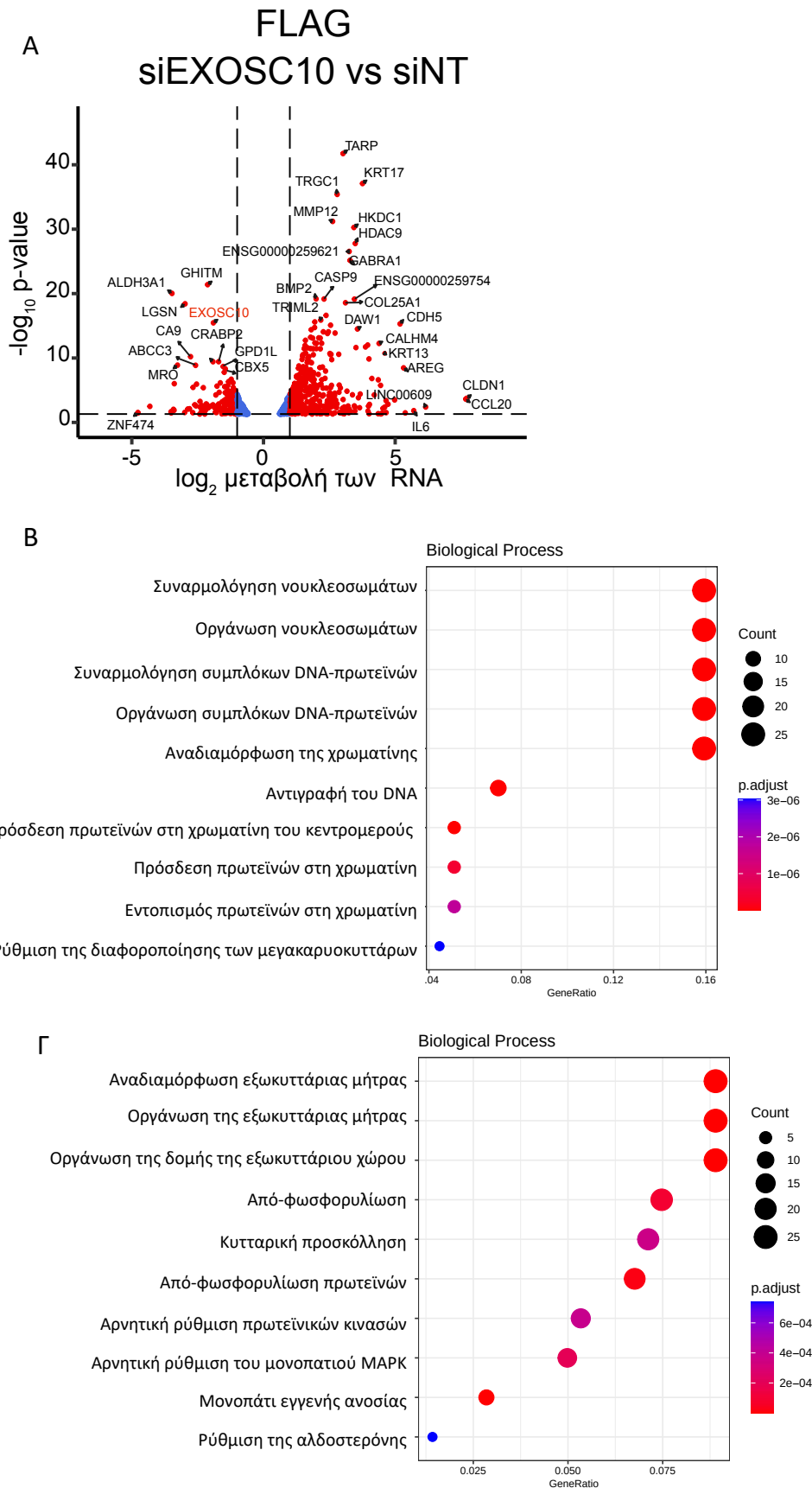
B



Εικόνα 45: Η υποξία προκαλεί μεταβολές στο μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων HeLa. A) Βιοπληροφορική ανάλυση για την ταυτοποίηση της διαφορικής έκφρασης των RNA σε κύτταρα HeLa τα οποία επωάστηκαν στην νορμοξία ή για 24 ώρες στην υποξία (1% O₂). Από τα κύτταρα αυτά, απομονώθηκε το ολικό RNA και αναλύθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης RNA. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται τα RNA των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία με τη μορφή κουκίδας. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή ορίζει τα όρια στατιστικής σημαντικότητας ($P < 0.05$), ενώ οι κάθετες ορίζουν το πεδίο της $\log_2$ μεταβολής των RNA (αριστερά: $\log_2 \text{Υποξίας/Νορμοξίας} < -1$, δεξιά: $\log_2 \text{Υποξίας/Νορμοξίας}$

>1). Συγκεκριμένα, οι κόκκινες κουκίδες αντιπροσωπεύουν RNA των οποίων η $\log_2$ μεταβολή είναι στατιστικά σημαντική και >1 ή <-1 , ενώ οι μπλε κουκίδες τους υπόλοιπους στόχους που δεν τηρούν τα κριτήρια αυτά. B) Βιοπληροφορική ανάλυση με το εργαλείο ClusterProfiler για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών που εμπλέκονται τα μετάγραφα που προέκυψαν να επηρεάζονται παρουσία της μη σουμοϋλιωμένης FLAG-EXOSC10. Το μέγεθος της κάθε κουκίδας αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που σχετίζονται με την εκάστοτε διεργασία, ενώ το χρώμα είναι ανάλογο της στατιστικής σημαντικότητας (δεξιά παρουσιάζονται οι δύο κλίμακες μεγέθους: αριθμός γονιδίων και χρώματος: pvalue). Στο χ άξονα αναπαρίσταται η αναλογία Generatio, η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό του αριθμού των γονιδίων που σχετίζονται με κάθε διεργασία ως προς τον συνολικό αριθμό των προς μελέτη γονιδίων.

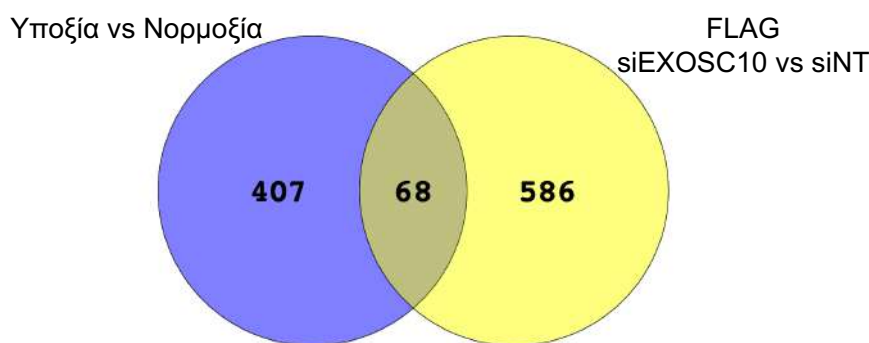
Αντίστοιχα, μεγάλη μεταβολή μεταγράφων παρατηρήθηκε μετά την αποσιώπηση της EXOSC10 στα κύτταρα HeLa Flp-In FLAG (εικόνα 46A). Συνολικά, η έκφραση 654 μεταγράφων μεταβλήθηκε απουσία της EXOSC10, με 210 από αυτά να μειώθηκαν και 444 να αυξήθηκαν πάνω από 2 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα κοντρόλ HeLa Flp-In FLAG (sint). Τα μετάγραφα τα οποία μειωρυθμίστηκαν απουσία της EXOSC10 βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε διαδικασίες που αφορούν κυρίως την χρωματίνη όπως στην αναδιαμόρφωση της, στην δημιουργία των νουκλεοσωμάτων και στη δημιουργία και οργάνωση συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών και του DNA (εικόνα 46 B). Πιθανά τα μετάγραφα αυτά να αποτελούν έμμεσους στόχους της EXOSC10 μέσω αποικοδόμησης κάποιων ενδιάμεσων μορίων. Αντίστοιχα, τα μετάγραφα τα οποία αυξορυθμίστηκαν απουσία της EXOSC10 βρέθηκε ότι σχετίζονται με μονοπάτια που προωθούν την αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών, με την διαμόρφωση και οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας και την προσκόλληση των κυττάρων (εικόνα 46Γ). Πιθανά κάποια από αυτά τα μετάγραφα να είναι άμεσοι στόχοι για αποικοδόμηση από την EXOSC10.



Εικόνα 46: Η απουσία της EXOSC10 οδήγησε στην απορρύθμιση της έκφρασης πληθώρας RNA. Α) Βιοπληροφορική ανάλυση για την ταυτοποίηση της διαφορικής έκφρασης των RNA

απουσία της *EXOSC10* σε κύτταρα *HeLa Flp-In FLAG* τα οποία διαμολύνθηκαν με το κατάλληλο *siRNA* έναντι αυτής, σε σχέση με την παρουσία της σε κύτταρα *HeLa Flp-In FLAG* τα οποία διαμολύνθηκαν με *non-targeting siRNA* για 48 ώρες. Από τα κύτταρα αυτά, απομονώθηκε το ολικό RNA και αναλύθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης RNA. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται τα RNA των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται απουσία της *EXOSC10* σε σύγκριση με την συνθήκη κοντρόλ με τη μορφή κουκίδας. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή ορίζει τα όρια στατιστικής σημαντικότητας ($P < 0.05$), ενώ οι κάθετες ορίζουν το πεδίο της $\log_2$ μεταβολής των RNA (αριστερά: $\log_2 \text{siEXOSC10/sint} < -1$, δεξιά: $\log_2 \text{siEXOSC10/sint} > 1$). Συγκεκριμένα, οι κόκκινες κουκίδες αντιπροσωπεύουν RNA των οποίων η $\log_2$ μεταβολή είναι στατιστικά σημαντική και >1 ή <-1 , ενώ οι μπλε κουκίδες τους υπόλοιπους στόχους που δεν τηρούν τα κριτήρια αυτά. Β και Γ) Βιοπληροφορική ανάλυση με το εργαλείο *ClusterProfiler* για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών που εμπλέκονται τα μετάγραφα που προέκυψαν να μειώνονται (Β) ή να αυξάνονται (Γ) απουσία της *EXOSC10*. Το μέγεθος της κάθε κουκίδας αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που σχετίζονται με την εκάστοτε διεργασία, ενώ το χρώμα είναι ανάλογο της στατιστικής σημαντικότητας (δεξιά παρουσιάζονται οι δύο κλίμακες μεγέθους: αριθμός γονιδίων και χρώματος: *pvalue*). Στο χ άξονα αναπαρίσταται η αναλογία *Generatio*, η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό του αριθμού των γονιδίων που σχετίζονται με κάθε διεργασία ως προς τον συνολικό αριθμό των προς μελέτη γονιδίων.

Ενδιαφέρον ήταν πως μετά από την σύγκριση των μεταγράφων που επηρεάζονται στην υποξία συγκριτικά με την νορμοξία με τα μετάγραφα που απορρυθμίζονται απουσία της *EXOSC10*, βρέθηκε ότι περίπου το 15% των στόχων που μεταβάλλονται στην υποξία είναι έμμεσοι ή άμεσοι στόχοι της *EXOSC10* (εικόνα 47). Συνεπώς, η *EXOSC10*, φαίνεται να ρυθμίζει την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ελέγχοντας την σταθερότητα γονιδίων στόχων της υποξίας.



Εικόνα 47: Η απουσία της *EXOSC10* επηρεάζει την έκφραση γονιδίων στόχων της υποξίας. Διάγραμμα που αποτυπώνει την ποιοτική σύγκριση των RNA που μεταβάλλονται στην υποξία σε

σχέση με τη νορμοζία (μωβ) με αυτά που μεταβάλλονται απουσία της EXOSC10 (κίτρινη) σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Η τομή των δύο κύκλων αντιπροσωπεύει τους κοινούς και στις δύο κατηγορίες στόχους.

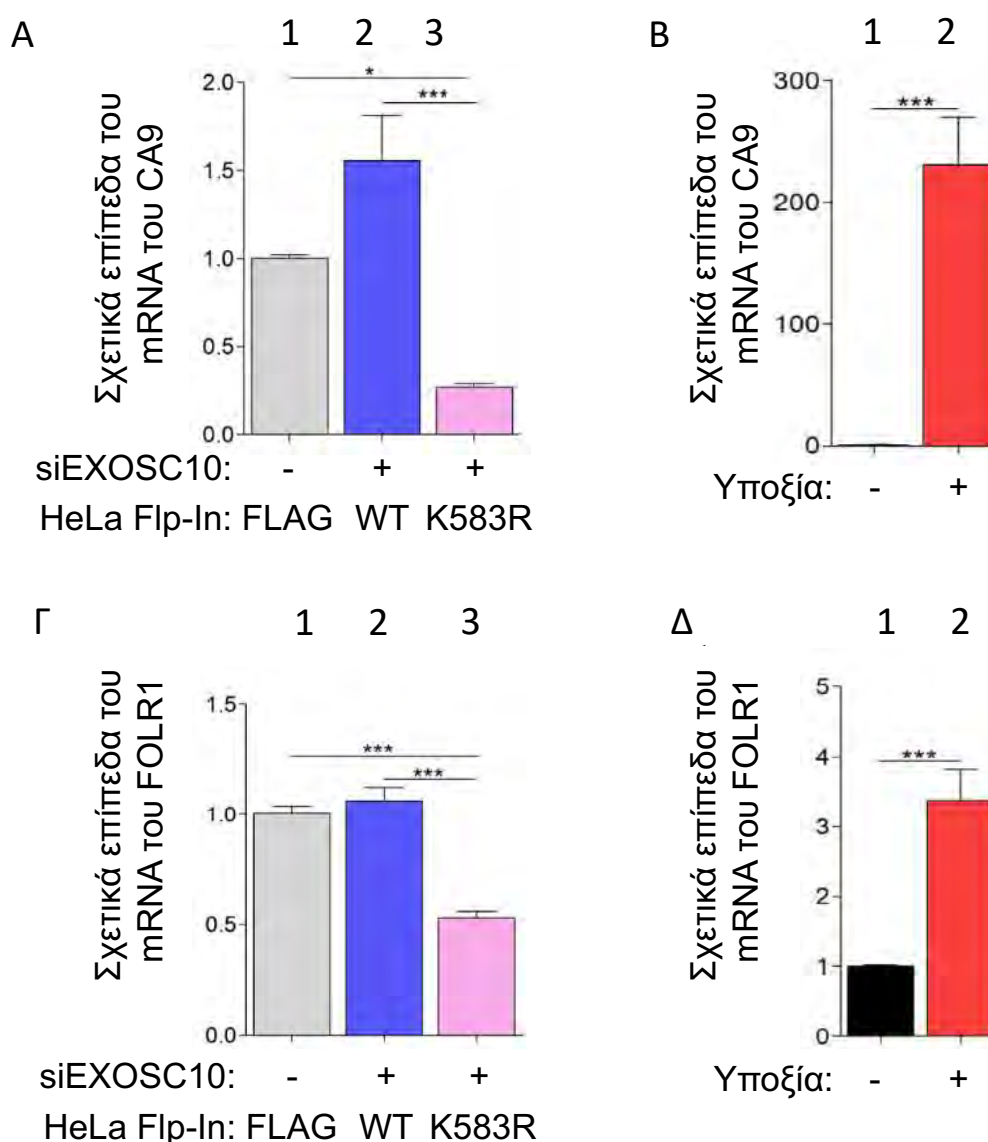
Προχωρώντας στο κύριο ερώτημα το οποίο αφορά την διερεύνηση του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην έκφραση των RNA, ανιχνεύτηκαν στο σύνολο 34 μετάγραφα τα οποία επηρεάζονται από την έκφραση της μη σουμοϋλιωμένης FLAG-EXOSC10 K583R μορφής σε σχέση με την αγρίου τύπου FLAG-EXOSC10 WT (εικόνα 48Α). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης 20 εξ αυτών μειώνονται πάνω από 2 φορές παρουσία της FLAG-EXOSC10 K583R, ενώ αντίθετα τα υπόλοιπα 14 αυξάνονται πάνω από 2 φορές. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι οι στόχοι αυτοί που επηρεάζονται σχετίζονται με την κυτταρική απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα εκ των οποίων και την απόκριση στην υποξία (εικόνα 48Β). Συγκεκριμένα, 8 γονίδια συμπεριλαμβανομένων χαρακτηρισμένων στόχων της υποξίας όπως το CA9 και το PTGS2 βρέθηκαν να μειωρυνθίζονται παρουσία της μη σουμοϋλιωμένης EXOSC10 (εικόνα 48Γ).

μετάγραφα που προέκυψαν να απορρυθμίζονται παρουσία της μη σουμοϋλιωμένης FLAG-EXOSC10. Το μέγεθος της κάθε κουκίδας αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που σχετίζονται με την εκάστοτε διεργασία, ενώ το χρώμα είναι ανάλογο της στατιστικής σημαντικότητας (δεξιά παρουσιάζονται οι δύο κλίμακες μεγέθους: αριθμός γονιδίων και χρώματος: *p*value). Στο χ *α*ξονα αναπαρίσταται η αναλογία *Generatio*, η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό του αριθμού των γονιδίων που σχετίζονται με κάθε διεργασία ως προς τον συνολικό αριθμό των προς μελέτη γονιδίων. Γ) Διάγραμμα που συμβολίζει τους κοινούς στόχους που προέκυψαν μετά την σύγκριση των σχετιζόμενων με την υποξία (Υποξία vs Νορμοξία) και των σχετιζόμενων με τη σουμοϋλίωση της EXOSC10 (K583R vs WT) RNA. Η κλίμακα του χρώματος παρουσιάζεται στα δεξιά και αντιστοιχεί στην $\log_2$ μεταβολή (<0 : μπλε, >0 κόκκινο).

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης RNA και της βιοπληροφορικής ανάλυσης επιλέχθηκαν για επαλήθευση δύο στόχοι, τα γονίδια CA9 και FOLR1, των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από την υποξία και από την σουμοϋλίωση της EXOSC10 αντίστοιχα (Εικόνα 48). Ομοίως με πριν, οι κυτταρικές σειρές HeLa Flp-In FLAG, HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 WT και HeLa Flp-In FLAG-EXOSC10 K583R διαμολύνθηκαν είτε με non-targeted siRNA (sint, ως αρνητικό κοντρόλ), είτε με siRNA έναντι της ενδογενούς EXOSC10 για 24 ώρες, η έκφραση των FLAG ή FLAG-EXOSC10 επάχθηκε με τη προσθήκη δοξυκυκλίνης και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία (1 % O₂). Από τα κύτταρα αυτά, απομονώθηκε το ολικό RNA, κατασκευάστηκε cDNA βιβλιοθήκη και ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων CA9 και FOLR1 με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

Ειδικότερα, όσον αφορά την υποξία, τόσο το γονίδιο CA9 (Εικόνα 49B, σύγκριση διαδρομής 1 και 2) όσο και το FOLR1 (Εικόνα 49Δ, σύγκριση διαδρομής 1 και 2) επάχθηκαν στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία, περίπου 250 και 3.5 φορές αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών παρουσία της αγρίου τύπου FLAG-EXOSC10 (259) ήταν αντίστοιχα με αυτά κυττάρων που εκφράζουν την ενδογενή EXOSC10 (HeLa Flp-In FLAG, sint) (Εικόνα 49Α, σύγκριση διαδρομής 1 και 2 και Εικόνα 49Γ, σύγκριση διαδρομής 1 και 2). Παρουσία της μη σουμοϋλιωμένης FLAG-EXOSC10 K583R, το mRNA τόσο της CA9 (Εικόνα 49Α, διαδρομή 3) όσο και του FOLR1 (Εικόνα 49Γ, διαδρομή 3) μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με την παρουσία της αγρίου τύπου FLAG-EXOSC10 WT και της ενδογενούς EXOSC10 επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της αλληλούχησης (Εικόνα 48). Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνουν την εξαρτώμενη από τη σουμοϋλίωση της EXOSC10 ρύθμιση

των επιπέδων mRNA των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην υποξία, CA9 και FOLR1.



Εικόνα 49: Η απουσία σουμοϋλίωσης της EXOSC10 μειώνει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων της υποξίας CA9 και FOLR1. Έλεγχος των επιπέδων mRNA των γονιδίων CA9 και FOLR1 σε κύτταρα που εκφράζουν την ενδογενή, την αγρίου τύπου FLAG-EXOSC10 ή την μη σουμοϋλιωμένη FLAG-EXOSC10 K583R με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι τιμές που προέκυψαν μετά την κανονικοποίηση ως προς την συνθήκη κοντρόλ (αριστερά: ως προς τη συνθήκη FLAG για τη σύγκριση της αγρίου τύπου με τη μη σουμοϋλιωμένη EXOSC10, δεξιά: ως προς την νορμοξία για την σύγκριση της νορμοξίας με την υποξία) και προέκυψαν από 2 ή 3 βιολογικά ανεξάρτητα πειράματα των 2 τεχνικών επαναλήψεων (διαγράμματα στα αριστερά n:4, στα δεξιά n:6, ***P< 0.001, *P < 0.05). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

Ε. Συζήτηση

Το οξυγόνο είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της λειτουργίας των κυττάρων και κατά συνέπεια των ιστών. Η κατάσταση χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου αναφέρεται ως υποξία και η ύπαρξη της έχει καθοριστικό ρόλο τόσο στην φυσιολογία των ιστών όσο και στη παθολογία (307, 308). Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν τα καρκινικά κύτταρα των στερεών όγκων, όπου όχι μόνο δεν επηρεάζονται από το μειωμένο οξυγόνο, αλλά εκμεταλλεύονται τους μηχανισμούς απόκρισης στην υποξία, με αποτέλεσμα την ευνοϊκή ανάπτυξη τους στις συνθήκες αυτές (192). Επομένως, η εις βάθος κατανόηση των μοριακών μηχανισμών απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στην υποξία αποτελεί κομβικό σημείο έρευνας που θα θέσει τις βάσεις για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων καταπολέμησης του καρκίνου.

Το κύριο μονοπάτι απόκρισης που ενεργοποιείται στην υποξία στηρίζεται στους μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIF δρουν κυρίως επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν σε βασικές βιολογικές διεργασίες των καρκινικών κυττάρων όπως ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και των λιπιδίων, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η διήθηση, η μετάσταση και η διατήρηση της βλαστικότητας (309). Πέραν όμως της μεταγραφικής δράσης των HIF, κατά την απόκριση των κυττάρων στις αλλαγές του διαθέσιμου οξυγόνου, συμβαίνουν και άλλα ανεξάρτητα φαινόμενα, που αφορούν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (310) και τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως ο έλεγχος της σταθερότητας των mRNA (311, 312), του εναλλακτικού ματίσματος (313, 314) και της μετάφρασης (315, 316).

Όσον αφορά την σταθεροποίηση των mRNA, η υποξία (1 % O₂) βρέθηκε ότι προωθεί τη μετακίνηση του παράγοντα HuR από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος συνδέεται σε αλληλουχίες AUUUA, που περιέχονται στο 3' άκρο συγκεκριμένων mRNA, ενισχύοντας την σταθερότητα τους (317). Κάποια ευρέως γνωστά mRNA που περιέχουν τα στοιχεία αυτά και σταθεροποιούνται από την HuR στην υποξία είναι το mRNA του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα *VEGFA* (318), της ερυθροποιητίνης *EPO* (319) και της υδροξυλάσης της τυροσίνης *TH* (320). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η πρόσδεση της HuR και η σταθεροποίηση του mRNA της κινάσης σερίνης-θρεονίνης PIM1 στην υποξία (1 % O₂) ενισχύει την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος (317). Αντίστοιχα, πρόσφατες μελέτες των Tiana et al. (312) και Bauer et al. (321) που χρησιμοποίησαν

μεταβολικά ανάλογα της ουριδίνης για να σημάνουν τα νέο-συντιθέμενα RNA, αποκάλυψαν την επίδραση της υποξίας και στην αποικοδόμηση των RNA. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το πρότυπο αποικοδόμησης των RNA επηρεάζεται σημαντικά από την υποξία με το 25 % εξ αυτών να αφορούν mRNA, οδηγώντας στη μείωση συνολικά του χρόνου ημιζωής τους περίπου στο μισό. Μία κατηγορία των mRNA που αποσταθεροποιούνται στην υποξία αφορά στόχους που συμμετέχουν στην λειτουργία των μιτοχονδρίων, ενισχύοντας περαιτέρω την υπόθεση ότι τα κύτταρα ρυθμίζουν και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο τη γονιδιακή έκφραση με στόχο την εξασφάλιση της επιβίωσης τους σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου.

Με την παρούσα μελέτη, αποκαλύπτουμε ένα νέο σημείο μετα-μεταγραφικού ελέγχου της έκφρασης σημαντικών για την απόκριση στην υποξία (1 % O₂) mRNA, το οποίο αφορά στη ρύθμιση της λειτουργίας του πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου RNA εξωσώματος, μέσω της σουμοϋλίωσης μίας εκ των καταλυτικών του υπομονάδων, της EXOSC10.

Η σουμοϋλίωση είναι μία σχετικά πρόσφατα ανακαλυφθείσα μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία οι πρωτεΐνες SUMO συνδέονται ομοιοπολικά με κατάλοιπα λυσίνης άλλων πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας διάφορες πτυχές της κυτταρικής τους λειτουργίας (22). Η ύπαρξη της σουμοϋλίωσης έχει κριθεί σημαντική για την επιβίωση και απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στρες (322). Συγκεκριμένα, σε συνθήκες στρες, φαίνεται να επηρεάζονται τα ένζυμα που διατελούν τον μηχανισμό σύζευξης των SUMO, οδηγώντας σε μαζικές αλλαγές του συνολικού προτύπου σουμοϋλίωσης ή σε στοχευμένες μεταβολές στη σουμοϋλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων. Πρόσφατη μελέτη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες φυσιολογικής (νορμοξίας) και μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξίας) σε καρκινικά κύτταρα HeLa, αποκάλυψε πως αφενός η πρωτεΐνη EXOSC10 σουμοϋλιώνεται από την SUMO-1 και αφετέρου χάνει τη σουμοϋλίωση της κατά την υποξία. Η EXOSC10 έχει δράση 3'-5' εξωριβονουκλεάσης και η κυτταρική λειτουργία της είναι σχεδόν απόλυτα συνυφασμένη με το RNA εξώσωμα, καταλύοντας την επεξεργασία και την αποικοδόμηση σχεδόν όλων των τύπων RNA (323). Πέραν της υποξίας, η σουμοϋλίωση της EXOSC10 έχει αναφερθεί ότι επηρεάζεται στις αλλαγές της θερμοκρασίας, τόσο κατά το θερμικό σοκ (153), όσο και κατά τη χαμηλή θερμοκρασία (324). Επομένως, η ρύθμιση της EXOSC10 σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο φαίνεται να χρησιμοποιείται ως ένας μηχανισμός απόκρισης των κυττάρων σε

διάφορα στρες. Με αφορμή αυτά τα δεδομένα και λόγω του πιθανού ρόλου της EXOSC10 στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω αποικοδόμησης των RNA, πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής μελέτη με σκοπό την αποσαφήνιση της σημασίας της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 για την κυτταρική λειτουργία της στο πλαίσιο της απόκρισης των κυττάρων στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε με την μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον μηχανισμό σουμοϋλίωσης της EXOSC10. Αρχικά, ελέγχθηκε αν η μείωση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 συμβαίνει αποκλειστικά στα κύτταρα HeLa (262). Όπως φάνηκε από τον έλεγχο της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 μετά από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων από τη SUMO-1 πρωτεϊνών σε εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα HEK293, η αποσουμοϋλίωση στην υποξία συμβαίνει και στις δύο κυτταρικές σειρές (Αποτελέσματα 1.1.1), υποδεικνύοντας την πιθανή καθολικότητα του φαινομένου αυτού. Επιπλέον, πέραν της ενδογενούς πρωτεΐνης, παρόμοιο φαινόμενο αποσουμοϋλίωσης παρουσίασε και η υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου μορφή της EXOSC10 (Αποτελέσματα 1.1.2), υποδηλώνοντας της σημασία της ρύθμισης της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης αυτής από την υποξία.

Δεδομένου του κύριου ρόλου των μεταγραφικών παραγόντων HIF για την απόκριση των κυττάρων στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου, προχωρήσαμε διερευνώντας εάν η παρατηρούμενη αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 επάγεται από την μεταγραφική τους δράση. Αφού ελέγξαμε με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών, την σουμοϋλίωση της ενδογενούς EXOSC10 κατά το πέρας της υποξίας, είδαμε ότι η αποσουμοϋλίωση ξεκινάει νωρίς από τις 2 κιόλας πρώτες ώρες, ασυγχρόνιστα από την σταθεροποίηση του HIF-1α. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα αντίστοιχου πειράματος και ελέγχου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 σε κυτταρικά συστήματα από τα οποία απουσιάζουν οι HIF-1α και HIF-2α (με παροδική αποσιώπηση με τη χρήση κατάλληλων siRNA, είτε σε κύτταρα που δεν τους εκφράζουν λόγω απενεργοποίησης των γονιδίων τους) (Αποτελέσματα 1.1.3) που έδειξαν ότι η αποσουμοϋλίωση παραμένει στην υποξία απουσία των HIFα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο των HIF και της μεταγραφικής τους δράσης.

Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως η υποξία, εκτός από την σουμοϋλίωση, επηρέασε και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC10. Συγκεκριμένα, πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού και ποσοτικοποίησης του φθορισμού της EXOSC10 στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα, έδειξαν πως η

πρωτεΐνη ενώ φυσιολογικά, βρίσκεται στον πυρήνα με ιδιαίτερο εμπλουτισμό στους πυρηνίσκους (Αποτελέσματα 1.1.4), στην υποξία, χάνει τον εστιασμένο εντοπισμό της στους πυρηνίσκους και ένα μεγάλο μέρος της διαχέεται στο πυρηνόπλασμα. Παρόμοιο φαινόμενο διάχυσης παρουσίασαν σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό και οι UBF και NPM1 αντίστοιχα, φανερώνοντας πιθανόν την επίδραση της υποξίας στην γενικότερη κατανομή ή σύσταση των πρωτεϊνικών συμπλόκων στον πυρηνίσκο. Πράγματι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υποξία έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την αρχιτεκτονική λειτουργικών συμπλόκων του πυρήνα, χωρίς όμως να είναι γνωστό πως ακριβώς συμβαίνει αυτό. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η διάχυση της EXOSC10 συμβαίνει γρήγορα κατά την επίδραση της υποξίας (Αποτελέσματα 1.1.4), οδηγούμαστε στην υπόθεση ότι κάποια μη μετα-μεταγραφικά γεγονότα που συμβαίνουν νωρίς κατά την υποξία, όπως για παράδειγμα η αύξηση των ROS ή η ενεργοποίηση κάποιας κινάσης θα μπορούσαν να είναι οι αιτίες για τις παρατηρούμενες μεταβολές στον πυρηνίσκο και στον εντοπισμό της EXOSC10. Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου αποκάλυψε πως η γρήγορη αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου στα πρώτα κιόλας λεπτά έκθεσης στην υποξία, οδηγεί στην πυρηνική ανακατανομή πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας, διευκολύνοντας σημαντικές διεργασίες για την απόκριση των κυττάρων στην υποξία, όπως είναι το εναλλακτικό μάτισμα των mRNA (314). Η επίδραση της υποξίας στον εντοπισμό της EXOSC10 θα μπορούσε να προκαλεί στην συνέχεια και την αποσυνμούλωση της, αφού και τα δύο γεγονότα συμπίπτουν χρονικά.

Για να μελετήσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια πως επηρεάζεται ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην υποξία, οδηγώντας στην της τελική αποσυνμοϋλίωση έπρεπε πρώτα να ταυτοποιήσουμε τα ακριβή ένζυμα του μηχανισμού αυτού, καθώς δεν ήταν γνωστά. Μετά από πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης ενζύμων που καταλύουν την σουμοϋλίωση και αποσυνμοϋλίωση πρωτεϊνών στους πυρηνίσκους και έλεγχου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 αλλά και μετά τον έλεγχο της άμεσης αλληλεπίδρασης αυτών με την EXOSC10, βρήκαμε ότι η σύζευξη της SUMO-1 στην EXOSC10 καταλύεται από την USP36 (Αποτελέσματα 1.2.3) και η τροποποίηση αυτή αντιστρέφεται μέσω της δράσης της SENP3 (Αποτελέσματα 1.2.1) ανεξάρτητα της συγκέντρωσης οξυγόνου. Το πιο άμεσο σενάριο το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την αποσυνμοϋλίωση της EXOSC10, είναι αυτό της αυξημένης απομάκρυνσης των SUMO λόγω της ρύθμισης της SENP3 από την υποξία. Πράγματι, πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν την

παρόμοια με την περίπτωση της EXOSC10, διάχυση της SENP3 στο πυρηνόπλασμα στην υποξία (Αποτελέσματα 1.2.2), η οποία τόσο από εμάς όσο και από προηγούμενες αναφορές στη βιβλιογραφία (303) αποδίδεται στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της από το mTOR. Η αναστολή του mTOR στην υποξία και η παρακείμενη αλλαγή του εντοπισμού της SENP3 θα μπορούσαν να είναι οι αιτίες τόσο για το φαινόμενο της διάχυσης της EXOSC10, όσο και για την αποσυνμούλιωσή της. Όμως η φαρμακολογική αναστολή του mTOR με τη χρήση ραπαμυκίνης δεν προκάλεσε αλλαγές ούτε στον εντοπισμό της EXOSC10, ούτε στα επίπεδα συνμούλιωσής της (Αποτελέσματα 1.2.2).

Εφόσον, οι αλλαγές που εντοπίστηκαν για την υπεύθυνη SUMO ισοπεπτιδάση που απομακρύνει την SUMO-1 από την EXOSC10 στην υποξία δεν μπόρεσαν να εξηγήσουν την αποσυνμούλιωσή της, στραφήκαμε προς την αντίθετη κατεύθυνση, ελέγχοντας την υπόθεση ότι η EXOSC10 σταματάει να συνμουλιώνεται στην υποξία, λόγω της αναστολής της δράσης της USP36. Πράγματι, μετά τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης και του συνεντοπισμού των EXOSC10 και USP36 με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και συνεστιακής μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού, ανακαλύψαμε ότι η μείωση των επιπέδων του οξυγόνου οδηγεί στη κατάργηση της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών, η οποία οφείλεται στην πυρηνική ανακατανομή της EXOSC10 (Αποτελέσματα 1.2.4). Το αποτέλεσμα αυτό εξηγεί την αποσυνμούλιωσή της EXOSC10 στην υποξία και την συνδέει με το φαινόμενο μετακίνησης της από τους πυρηνίσκους. Επομένως, διαμορφώσαμε την υπόθεση ότι οι EXOSC10, USP36 και SENP3 βρίσκονται σε κοινό σύμπλοκο στους πυρηνίσκους, με τις USP36 και SENP3 να ρυθμίζουν σε ισορροπία την συνμούλιωσή της EXOSC10. Η ισορροπία αυτή διαταράσσεται από την υποξία, όπου η διάχυση της EXOSC10 στο πυρηνόπλασμα οδηγεί στην κατάργηση της αλληλεπίδρασής της με την USP36, έχοντας ως αποτέλεσμα την αδυναμία συνμούλιωσής της. Όμως, στην υπόθεσή μας δεν καταφέραμε να εξηγήσουμε πως ακριβώς προκαλείται η αλλαγή του εντοπισμού της EXOSC10 κατά την υποξία.

Πέραν της σημασίας την ανακάλυψης του μηχανιστικού μέρους που συνδέει τον μηχανισμό συνμούλιωσής της EXOSC10 και την επίδραση της υποξίας σε αυτόν, το βασικό ερώτημα της παρούσας διατριβής ήταν η εύρεση της βιολογικής σημασίας της συνμούλιωσής τόσο για την λειτουργία της EXOSC10, όσο και για την απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Δεδομένου του ρόλου της EXOSC10 στην αποικοδόμηση των RNA, ξεκινήσαμε μελετώντας τη σημασία της συνμούλιωσής της για την

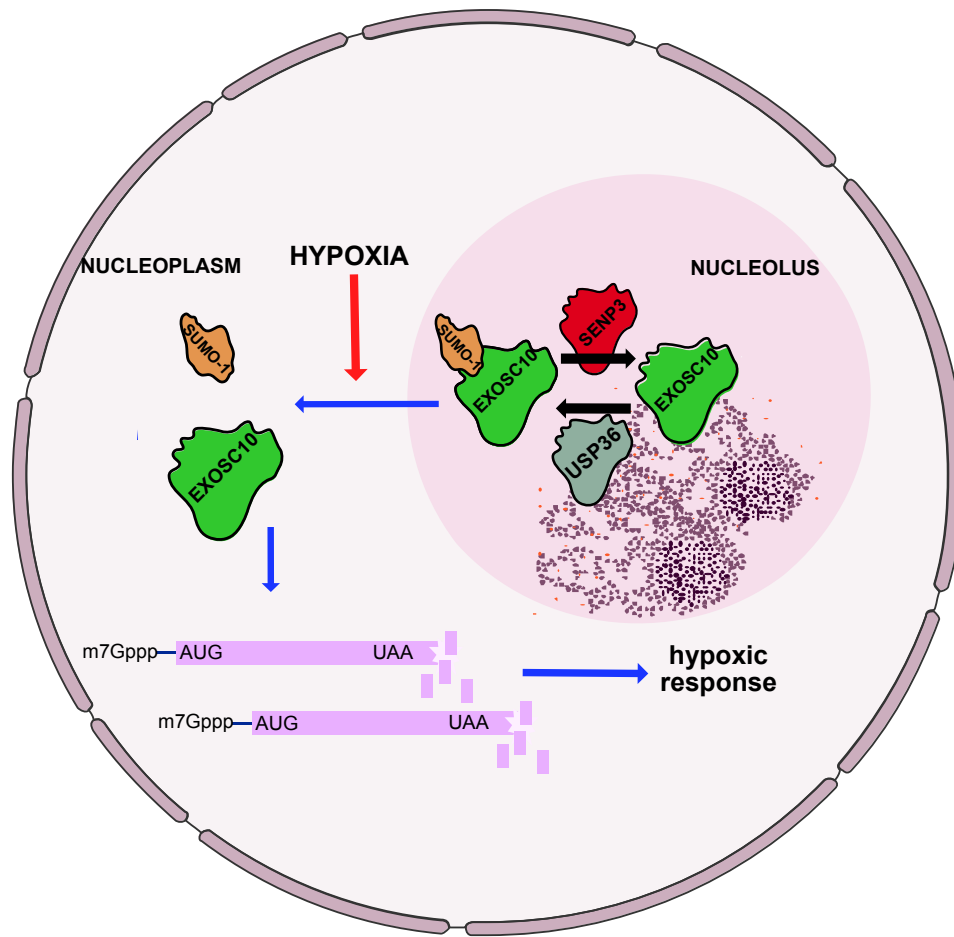
ανάπτυξη των κυττάρων σε γενικότερες βιολογικές διεργασίες (πολλαπλασιασμός, απόπτωση και κινητικότητα) αλλά και για την κυτταρική λειτουργία της στην ρύθμιση των RNA. Δείχθηκε αρχικά ότι η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 (μέσω της μετάλλαξης K583R) δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων. Καθώς, ένας από τους κύριους ρόλους της EXOSC10 είναι η ωρίμανση των ριβοσωμικών RNA, ελέγχθηκε στα πλαίσια συνεργασίας του εργαστηρίου μας με την ερευνητική ομάδα της Dr. Kate Bohnsack στο Πανεπιστήμιο του Γκέτινγκεν, η δράση της σουμοϋλίωσης στην λειτουργία της EXOSC10 στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής και δείχθηκε ότι η τροποποίηση αυτή δεν επηρεάζει την δράση της EXOSC10 στην επεξεργασία των ριβοσωμικών RNA [Filippopoulou et al, CMLS].

Όμως, η EXOSC10 συμμετέχει στην ωρίμανση και αποικοδόμηση και άλλων τύπων RNA, επομένως ελέγχθηκε η συμμετοχή της σουμοϋλίωσης στην ρύθμιση των υπολοίπων, εκτός των ριβοσωμικών, RNA. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του ολικού RNA κυττάρων HeLa που εξέφραζαν την αγρίου τύπου EXOSC10 ή κυττάρων στα οποία η σουμοϋλίωση έχει χαθεί μέσω μετάλλαξης (K583R, Αποτελέσματα 2.1) ή μέσω επώασης σε υποξία, και έγινε σύγκριση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των κυττάρων αυτών. Ενδιαφέρον αποτέλεσε το γεγονός ότι η έκφραση ορισμένων γονιδίων αυξο- ή μειο-ρυθμίζεται ανάλογα την κατάσταση σουμοϋλίωσης της EXOSC10. Ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά συμμετέχουν στην απόκριση των κυττάρων σε διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα και κυρίως στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (Αποτελέσματα 2.4). Πράγματι, η σύγκριση των μεταγράφων που απορρυθμίζονται από την σουμοϋλίωση της EXOSC10 και μεταγράφων που απορρυθμίζονται στην υποξία, φανέρωσε μία μικρή ομάδα κοινών στόχων εκ των οποίων mRNA, γονιδίων απαραίτητων για την κυτταρική προσαρμογή σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Για δύο από αυτούς τους στόχους, τα mRNA των γονιδίων CA9 και FOLR1, επιβεβαιώσαμε και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, ότι απουσία της σουμοϋλίωσης της EXOSC10, η έκφραση τους καταστέλλεται.

Υποθέτουμε λοιπόν πως η εξαρτώμενη από την υποξία διάχυση της EXOSC10 στο πυρηνόπλασμα, λειτουργεί ως ένας ταχύς μηχανισμός απόκρισης στην υποξία που έχει ως στόχο αρχικά την αποσουμοϋλίωση της EXOSC10, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην μείωση της σταθερότητας των mRNA, όπως των CA9 και FOLR1, λειτουργώντας ως ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης που δρα συμβάλλοντας στη ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από την υποξία.

Ένα βασικό ερώτημα που προκύπτει από την παρούσα διατριβή και χρήζει μελλοντικής μελέτης είναι πως ακριβώς σε επίπεδο μηχανισμού, η σουμοϋλίωση της EXOSC10 μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά την σταθερότητα των mRNA. Μία πρόσφατη μελέτη του παράγοντα YTHD2, έδειξε ότι η σουμοϋλίωση του επάγεται στην υποξία και μειώνεται στο οξειδωτικό στρες και με την σειρά της αυξάνει την πρόσδεση του σε μεθυλιωμένα RNA προωθώντας την αποικοδόμηση τους (325). Η λυσίνη 583 της EXOSC10 που συνδέεται η SUMO-1, βρίσκεται στην επικράτεια HRDC, η οποία αποτελεί ρυθμιστική περιοχή της καταλυτική επικράτειας EXO, και κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο, το οποίο πιστεύεται ότι συμμετέχει στην σύνδεση της EXOSC10 στα RNA – υποστρώματα (283). Μία πιθανότητα είναι η παρουσία της SUMO-1 να επηρεάζει την ικανότητα της EXOSC10 να συνδέεται σε RNA. Ένα άλλο σενάριο είναι η πρόσδεση της SUMO-1 να μεταβάλλει την δομή της EXOSC10 επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση της με τους συμπαραγόντες της C1D, MPP6 και MTR4 και κατά συνέπεια με άλλα σύμπλοκα του RNA εξωσώματος που του προσδίδουν την εξειδίκευση στα υποστρώματα του.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή δείξαμε πως η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 αποτελεί έναν μηχανισμό άμεσης απόκρισης των κυττάρων στην υποξία ανεξάρτητου των παραγόντων HIF, στοχεύοντας στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και συμβάλλοντας έτσι στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία (Εικόνα 50). Η υποξία επηρεάζει την αρχιτεκτονική λειτουργικών συμπλόκων του πυρηνίσκου οδηγώντας στην πυρηνική ανακατανομή της EXOSC10 και την επακόλουθη αποσουμοϋλίωση της, έχοντας ως αποτέλεσμα την διαφορική ρύθμιση της έκφρασης mRNA γονιδίων στόχων της υποξίας. Η μετα-μεταγραφική αυτή ρύθμιση πιθανόν συμβάλλει στην καλύτερη προσαρμογή των κυττάρων σε μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η γνώση αυτή θα συμβάλλει σημαντικά στην ανακάλυψη και εξακρίβωση των μη-μεταγραφικών δράσεων της υποξίας, προσφέροντας νέα σημεία ελέγχου για την μελλοντική ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων στόχευσης του καρκίνου.



Εικόνα 50: Προτεινόμενο μοντέλο του μετα-μεταγραφικού ελέγχου της έκφρασης σημαντικών για την απόκριση στην υποξία (1 % O_2) mRNA, το οποίο αφορά την ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας του πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου RNA εξωσώματος, μέσω της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της σουμοϋλίωσης μίας εκ των καταλυτικών του υπομονάδων, της EXOSC10. Η EXOSC10 βρίσκεται σε κοινό σύμπλοκο στους πυρηνίσκους με την E3 λιγάση USP36 και την SUMO ισοπεπτιδάση SENP3 να ρυθμίζουν σε ισορροπία την σουμοϋλίωση της. Η υποξία επάγει την πυρηνική ανακατανομή της EXOSC10, η οποία χάνει την αλληλεπίδραση της με την USP36 έχοντας ως συνέπεια την επακόλουθη αποσουμοϋλίωση της. Η αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 έχει ως αποτέλεσμα την διαφορεική ρύθμιση της έκφρασης mRNA γονιδίων στόχων της υποξίας.

Βιβλιογραφία

1. Bradley D. The evolution of post-translational modifications. *Curr Opin Genet Dev.* 2022;76:101956.
2. Ramazi S, Zahiri J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford).* 2021;2021.
3. Dutta H, Jain N. Post-translational modifications and their implications in cancer. *Front Oncol.* 2023;13:1240115.
4. Cain JA, Solis N, Cordwell SJ. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics.* 2014;97:265-86.
5. Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(11):651-64.
6. Cappadocia L, Lima CD. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev.* 2018;118(3):889-918.
7. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):947-56.
8. Celen AB, Sahin U. Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *FEBS J.* 2020;287(15):3110-40.
9. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* 2004;18(17):2046-59.
10. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 1997;88(1):97-107.
11. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 1996;135(6 Pt 1):1457-70.
12. Chang HM, Yeh ETH. SUMO: From Bench to Bedside. *Physiol Rev.* 2020;100(4):1599-619.
13. Yang M, Hsu CT, Ting CY, Liu LF, Hwang J. Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem.* 2006;281(12):8264-74.
14. Karpiyevich M, Artavanis-Tsakonas K. Ubiquitin-Like Modifiers: Emerging Regulators of Protozoan Parasites. *Biomolecules.* 2020;10(10).
15. Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, Jänne OA. Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5381-90.
16. Ureña E, Pirone L, Chafino S, Pérez C, Sutherland JD, Lang V, et al. Evolution of SUMO Function and Chain Formation in Insects. *Mol Biol Evol.* 2016;33(2):568-84.
17. Su HL, Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene.* 2002;296(1-2):65-73.
18. Clark L, Sue-Ob K, Mukkawar V, Jones AR, Sadanandom A. Understanding SUMO-mediated adaptive responses in plants to improve crop productivity. *Essays Biochem.* 2022;66(2):155-68.
19. Singh M, Singh A, Yadav N, Yadav DK. Current perspectives of ubiquitination and SUMOylation in abiotic stress tolerance in plants. *Front Plant Sci.* 2022;13:993194.
20. Benlloch R, Lois LM. Sumoylation in plants: mechanistic insights and its role in drought stress. *J Exp Bot.* 2018;69(19):4539-54.
21. Srikumar T, Lewicki MC, Raught B. A global *S. cerevisiae* small ubiquitin-related modifier (SUMO) system interactome. *Mol Syst Biol.* 2013;9:668.
22. Vertegaal ACO. Signalling mechanisms and cellular functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(11):715-31.

23. Acuña ML, García-Morin A, Orozco-Sepúlveda R, Ontiveros C, Flores A, Diaz AV, et al. Alternative splicing of the SUMO1/2/3 transcripts affects cellular SUMOylation and produces functionally distinct SUMO protein isoforms. *Sci Rep.* 2023;13(1):2309.
24. Bouchard D, Wang W, Yang WC, He S, Garcia A, Matunis MJ. SUMO paralogue-specific functions revealed through systematic analysis of human knockout cell lines and gene expression data. *Mol Biol Cell.* 2021;32(19):1849-66.
25. Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6252-8.
26. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC. SUMO-4: A novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178056.
27. Wang CY, She JX. SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(2):93-102.
28. Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep.* 2016;6:26509.
29. Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, Bohren KM. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(2):517-20.
30. Namanja AT, Li YJ, Su Y, Wong S, Lu J, Colson LT, et al. Insights into high affinity small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition by SUMO-interacting motifs (SIMs) revealed by a combination of NMR and peptide array analysis. *J Biol Chem.* 2012;287(5):3231-40.
31. Meulmeester E, Kunze M, Hsiao HH, Urlaub H, Melchior F. Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell.* 2008;30(5):610-9.
32. Zhu J, Zhu S, Guzzo CM, Ellis NA, Sung KS, Choi CY, et al. Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29405-15.
33. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35368-74.
34. Zhang XD, Goeres J, Zhang H, Yen TJ, Porter AC, Matunis MJ. SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell.* 2008;29(6):729-41.
35. Ayaydin F, Dasso M. Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5208-18.
36. Chow KH, Elgort S, Dasso M, Powers MA, Ullman KS. The SUMO proteases SENP1 and SENP2 play a critical role in nucleoporin homeostasis and nuclear pore complex function. *Mol Biol Cell.* 2014;25(1):160-8.
37. Nayak A, Müller S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol.* 2014;15(7):422.
38. Schulman BA, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):319-31.
39. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:357-85.
40. Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells.* 2020;9(11).
41. Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell.* 2002;108(3):345-56.
42. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, et al. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell.* 2010;39(4):641-52.

43. Sampson DA, Wang M, Matunis MJ. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21664-9.
44. Xu J, He Y, Qiang B, Yuan J, Peng X, Pan XM. A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:8.
45. Streich FC, Lima CD. Capturing a substrate in an activated RING E3/E2-SUMO complex. *Nature.* 2016;536(7616):304-8.
46. Reverter D, Lima CD. Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature.* 2005;435(7042):687-92.
47. Shi X, Du Y, Li S, Wu H. The Role of SUMO E3 Ligases in Signaling Pathway of Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7).
48. Hochstrasser M. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell.* 2001;107(1):5-8.
49. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10626-31.
50. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278(5344):1803-5.
51. Jang HD, Yoon K, Shin YJ, Kim J, Lee SY. PIAS3 suppresses NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24873-80.
52. Schmidt D, Müller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2872-7.
53. Nishida T, Yasuda H. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2002;277(44):41311-7.
54. Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature.* 2009;462(7275):935-9.
55. Han MM, Hirakawa M, Yamauchi M, Matsuda N. Roles of the SUMO-related enzymes, PIAS1, PIAS4, and RNF4, in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;591:95-101.
56. Chu Y, Yang X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene.* 2011;30(9):1108-16.
57. Liang Q, Deng H, Li X, Wu X, Tang Q, Chang TH, et al. Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J Immunol.* 2011;187(9):4754-63.
58. Ikeuchi Y, Dadakhujayev S, Chandhoke AS, Huynh MA, Oldenberg A, Ikeuchi M, et al. TIF1γ protein regulates epithelial-mesenchymal transition by operating as a small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligase for the transcriptional regulator SnoN1. *J Biol Chem.* 2014;289(36):25067-78.
59. Kerscher O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.* 2007;8(6):550-5.
60. Werner A, Flotho A, Melchior F. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell.* 2012;46(3):287-98.
61. Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell.* 2003;113(1):127-37.
62. Guervilly JH, Takedachi A, Naim V, Scaglione S, Chawhan C, Lovera Y, et al. The SLX4 complex is a SUMO E3 ligase that impacts on replication stress outcome and genome stability. *Mol Cell.* 2015;57(1):123-37.
63. Cappadocia L, Pichler A, Lima CD. Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(12):968-75.
64. Weger S, Hammer E, Heilbronn R. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 2005;579(22):5007-12.
65. Morita Y, Kanei-Ishii C, Nomura T, Ishii S. TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell.* 2005;16(11):5433-44.

66. Yang Q, Tang J, Xu C, Zhao H, Zhou Y, Wang Y, et al. Histone deacetylase 4 inhibits NF- κ B activation by facilitating I κ B α sumoylation. *J Mol Cell Biol.* 2020;12(12):933-45.
67. Sun XX, Sears RC, Dai MS. Deubiquitinating c-Myc: USP36 steps up in the nucleolus. *Cell Cycle.* 2015;14(24):3786-93.
68. Ryu H, Sun XX, Chen Y, Li Y, Wang X, Dai RS, et al. The deubiquitinase USP36 promotes snoRNP group SUMOylation and is essential for ribosome biogenesis. *EMBO Rep.* 2021;22(6):e50684.
69. Rizos H, Woodruff S, Kefford RF. p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle.* 2005;4(4):597-603.
70. Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, Sparks A, Lane DP, Saville MK. p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50157-66.
71. Tokarz P, Woźniak K. SENP Proteases as Potential Targets for Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(9).
72. Kunz K, Piller T, Müller S. SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance. *J Cell Sci.* 2018;131(6).
73. Shen L, Tatham MH, Dong C, Zagórska A, Naismith JH, Hay RT. SUMO protease SENP1 induces isomerization of the scissile peptide bond. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1069-77.
74. Reverter D, Lima CD. Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1060-8.
75. Jansen NS, Vertegaal ACO. A Chain of Events: Regulating Target Proteins by SUMO Polymers. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(2):113-23.
76. Haindl M, Harasim T, Eick D, Muller S. The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep.* 2008;9(3):273-9.
77. Finkbeiner E, Haindl M, Muller S. The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J.* 2011;30(6):1067-78.
78. Bialik P, Woźniak K. SUMO proteases as potential targets for cancer therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):997-1004.
79. Claessens LA, Verlaan-de Vries M, de Graaf IJ, Vertegaal ACO. SENP6 regulates localization and nuclear condensation of DNA damage response proteins by group deSUMOylation. *Nat Commun.* 2023;14(1):5893.
80. Wagner K, Kunz K, Piller T, Tascher G, Hölper S, Stehmeier P, et al. The SUMO Isopeptidase SENP6 Functions as a Rheostat of Chromatin Residency in Genome Maintenance and Chromosome Dynamics. *Cell Rep.* 2019;29(2):480-94.e5.
81. Schulz S, Chachami G, Kozackiewicz L, Winter U, Stankovic-Valentin N, Haas P, et al. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.* 2012;13(10):930-8.
82. Shin EJ, Shin HM, Nam E, Kim WS, Kim JH, Oh BH, et al. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* 2012;13(4):339-46.
83. Talamillo A, Barroso-Gomila O, Giordano I, Ajuria L, Grillo M, Mayor U, et al. The role of SUMOylation during development. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(2):463-78.
84. Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, et al. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell.* 2005;9(6):769-79.
85. Nowak M, Hammerschmidt M. Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development. *Mol Biol Cell.* 2006;17(12):5324-36.
86. Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, Forrová H, Kolarov J, Goffeau A, et al. An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem.* 1995;270(30):18099-109.
87. Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EP. Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* 2002;3(1):RESEARCH0002.

88. Nie M, Xie Y, Loo JA, Courey AJ. Genetic and proteomic evidence for roles of *Drosophila* SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One*. 2009;4(6):e5905.
89. Yukita A, Michiue T, Danno H, Asashima M. XSUMO-1 is required for normal mesoderm induction and axis elongation during early *Xenopus* development. *Dev Dyn*. 2007;236(10):2757-66.
90. Yuan H, Zhou J, Deng M, Liu X, Le Bras M, de The H, et al. Small ubiquitin-related modifier paralogs are indispensable but functionally redundant during early development of zebrafish. *Cell Res*. 2010;20(2):185-96.
91. Wang L, Wansleben C, Zhao S, Miao P, Paschen W, Yang W. SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep*. 2014;15(8):878-85.
92. Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 24):4106-13.
93. Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science*. 2006;313(5794):1751.
94. Yamaguchi T, Sharma P, Athanasiou M, Kumar A, Yamada S, Kuehn MR. Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(12):5171-82.
95. Constanzo JD, Deng M, Rindhe S, Tang KJ, Zhang CC, Scaglioni PP. Pias1 is essential for erythroid and vascular development in the mouse embryo. *Dev Biol*. 2016;415(1):98-110.
96. Hendriks IA, Vertegaal AC. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(9):581-95.
97. Wen D, Wu J, Wang L, Fu Z. SUMOylation Promotes Nuclear Import and Stabilization of Polo-like Kinase 1 to Support Its Mitotic Function. *Cell Rep*. 2017;21(8):2147-59.
98. de la Cruz-Herrera CF, Campagna M, Lang V, del Carmen González-Santamaría J, Marcos-Villar L, Rodríguez MS, et al. SUMOylation regulates AKT1 activity. *Oncogene*. 2015;34(11):1442-50.
99. Sarangi P, Steinacher R, Altmannova V, Fu Q, Paull TT, Krejci L, et al. Sumoylation influences DNA break repair partly by increasing the solubility of a conserved end resection protein. *PLoS Genet*. 2015;11(1):e1004899.
100. Boulanger M, Chakraborty M, Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO and Transcriptional Regulation: The Lessons of Large-Scale Proteomic, Modifomic and Genomic Studies. *Molecules*. 2021;26(4).
101. Rosonina E, Akhter A, Dou Y, Babu J, Sri Theivakadadcham VS. Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription*. 2017;8(4):220-31.
102. Yang SH, Sharrocks AD. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell*. 2004;13(4):611-7.
103. Tu J, Chen Y, Cai L, Xu C, Zhang Y, Zhang C, et al. Functional Proteomics Study Reveals SUMOylation of TFII-I is Involved in Liver Cancer Cell Proliferation. *J Proteome Res*. 2015;14(6):2385-97.
104. Zhang J, Yuan C, Wu J, Elsayed Z, Fu Z. Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation of Forkhead box protein M1b antagonizes its SUMOylation and facilitates its mitotic function. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3708-19.
105. Hamard PJ, Boyer-Guittaut M, Camuzeaux B, Dujardin D, Hauss C, Oelgeschläger T, et al. Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(4):1134-44.
106. Ryu HY. SUMO pathway is required for ribosome biogenesis. *BMB Rep*. 2022;55(11):535-40.
107. Westman BJ, Verheggen C, Hutten S, Lam YW, Bertrand E, Lamond AI. A proteomic screen for nucleolar SUMO targets shows SUMOylation modulates the function of Nop5/Nop58. *Mol Cell*. 2010;39(4):618-31.
108. Finkbeiner E, Haindl M, Raman N, Muller S. SUMO routes ribosome maturation. *Nucleus*. 2011;2(6):527-32.

109. Liu S, Wang L, Jiang D, Wei W, Nasir MF, Khan MS, et al. Sumoylation as an Emerging Target in Therapeutics against Cancer. *Curr Pharm Des.* 2020;26(37):4764-76.
110. Kroonen JS, Vertegaal ACO. Targeting SUMO Signaling to Wrestle Cancer. *Trends Cancer.* 2021;7(6):496-510.
111. Ong JR, Bamodu OA, Khang NV, Lin YK, Yeh CT, Lee WH, et al. SUMO-Activating Enzyme Subunit 1 (SAE1) Is a Promising Diagnostic Cancer Metabolism Biomarker of Hepatocellular Carcinoma. *Cells.* 2021;10(1).
112. Yang Y, Liang Z, Xia Z, Wang X, Ma Y, Sheng Z, et al. SAE1 promotes human glioma progression through activating AKT SUMOylation-mediated signaling pathways. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):82.
113. Liu X, Xu Y, Pang Z, Guo F, Qin Q, Yin T, et al. Knockdown of SUMO-activating enzyme subunit 2 (SAE2) suppresses cancer malignancy and enhances chemotherapy sensitivity in small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2015;8:67.
114. Zhang M, Jiang D, Xie X, He Y, Lv M, Jiang X. miR-129-3p inhibits NHEJ pathway by targeting SAE1 and represses gastric cancer progression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(5):1539-47.
115. Moschos SJ, Jukic DM, Athanassiou C, Bhargava R, Dacic S, Wang X, et al. Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Hum Pathol.* 2010;41(9):1286-98.
116. Li H, Niu H, Peng Y, Wang J, He P. Ubc9 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1588-94.
117. Chen SF, Gong C, Luo M, Yao HR, Zeng YJ, Su FX. Ubc9 expression predicts chemoresistance in breast cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30(9):638-44.
118. Moschos SJ, Smith AP, Mandic M, Athanassiou C, Watson-Hurst K, Jukic DM, et al. SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas. *Oncogene.* 2007;26(29):4216-25.
119. Lara-Ureña N, Jafari V, García-Domínguez M. Cancer-Associated Dysregulation of Sumo Regulators: Proteases and Ligases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14).
120. Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP. The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(7):1542-7.
121. Wu SY, Chiang CM. p53 sumoylation: mechanistic insights from reconstitution studies. *Epigenetics.* 2009;4(7):445-51.
122. Kung CP, Khaku S, Jennis M, Zhou Y, Murphy ME. Identification of TRIML2, a novel p53 target, that enhances p53 SUMOylation and regulates the transactivation of proapoptotic genes. *Mol Cancer Res.* 2015;13(2):250-62.
123. Takayama KI, Suzuki T, Tanaka T, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, et al. TRIM25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene.* 2018;37(16):2165-80.
124. Ashikari D, Takayama K, Tanaka T, Suzuki Y, Obinata D, Fujimura T, et al. Androgen induces G3BP2 and SUMO-mediated p53 nuclear export in prostate cancer. *Oncogene.* 2017;36(45):6272-81.
125. Pelisch F, Pozzi B, Risso G, Muñoz MJ, Srebrow A. DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2012;287(36):30789-99.
126. Nelson V, Davis GE, Maxwell SA. A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis.* 2001;6(3):221-34.
127. Megidish T, Xu JH, Xu CW. Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1). *J Biol Chem.* 2002;277(10):8255-9.
128. Li R, Wei J, Jiang C, Liu D, Deng L, Zhang K, et al. Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2013;73(18):5742-53.
129. Lindenmann U, Brand M, Gall F, Frasson D, Hunziker L, Krosiakova I, et al. Discovery of a Class of Potent and Selective Non-competitive Sentrin-Specific Protease 1 Inhibitors. *ChemMedChem.* 2020;15(8):675-9.

130. Zhou M, Bian Z, Liu B, Zhang Y, Cao Y, Cui K, et al. Long noncoding RNA MCM3AP-AS1 enhances cell proliferation and metastasis in colorectal cancer by regulating miR-193a-5p/SENPI. *Cancer Med.* 2021;10(7):2470-81.
131. Sun XX, Chen Y, Su Y, Wang X, Chauhan KM, Liang J, et al. SUMO protease SENPI deSUMOylates and stabilizes c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(43):10983-8.
132. Yang H, Tang Y, Guo W, Du Y, Wang Y, Li P, et al. Up-regulation of microRNA-138 induce radiosensitization in lung cancer cells. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6557-65.
133. Jacques C, Baris O, Prunier-Mirebeau D, Savagner F, Rodien P, Rohmer V, et al. Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2314-20.
134. Cheng J, Perkins ND, Yeh ET. Differential regulation of c-Jun-dependent transcription by SUMO-specific proteases. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14492-8.
135. Chauhan KM, Chen Y, Liu AT, Sun XX, Dai MS. The SUMO-specific protease SENPI deSUMOylates p53 and regulates its activity. *J Cell Biochem.* 2021;122(2):189-97.
136. Cui CP, Wong CC, Kai AK, Ho DW, Lau EY, Tsui YM, et al. SENPI promotes hypoxia-induced cancer stemness by HIF-1 α deSUMOylation and SENPI/HIF-1 α positive feedback loop. *Gut.* 2017;66(12):2149-59.
137. Xiang-Ming Y, Zhi-Qiang X, Ting Z, Jian W, Jian P, Li-Qun Y, et al. SENPI regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016;63(3):435-40.
138. Shangguan X, He J, Ma Z, Zhang W, Ji Y, Shen K, et al. SUMOylation controls the binding of hexokinase 2 to mitochondria and protects against prostate cancer tumorigenesis. *Nat Commun.* 2021;12(1):1812.
139. Tan M, Zhang D, Zhang E, Xu D, Liu Z, Qiu J, et al. SENP2 suppresses epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through deSUMOylation of TGF- β RI. *Mol Carcinog.* 2017;56(10):2332-41.
140. Cashman R, Cohen H, Ben-Hamo R, Zilberberg A, Efroni S. SENP5 mediates breast cancer invasion via a TGF β RI SUMOylation cascade. *Oncotarget.* 2014;5(4):1071-82.
141. Gao X, Wu Y, Qiao L, Feng X. SENP2 suppresses NF- κ B activation and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin. *Eur J Pharmacol.* 2019;854:179-86.
142. Xie H, Gu Y, Wang W, Wang X, Ye X, Xin C, et al. Silencing of SENP2 in Multiple Myeloma Induces Bortezomib Resistance by Activating NF- κ B Through the Modulation of I κ B α Sumoylation. *Sci Rep.* 2020;10(1):766.
143. Lee SY, Ju MK, Jeon HM, Lee YJ, Kim CH, Park HG, et al. Reactive oxygen species induce epithelial-mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx-2/Snail signaling pathways in MCF-7 cells. *Mol Med Rep.* 2019;20(3):2339-46.
144. Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(7):649-57.
145. Yan S, Sun X, Xiang B, Cang H, Kang X, Chen Y, et al. Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. *EMBO J.* 2010;29(22):3773-86.
146. Han Y, Huang C, Sun X, Xiang B, Wang M, Yeh ET, et al. SENP3-mediated deconjugation of SUMO2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12906-15.
147. Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J.* 2009;28(18):2748-62.
148. Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):874-8.
149. Sahin U, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V. Sumoylation in Physiology, Pathology and Therapy. *Cells.* 2022;11(5).
150. Stankovic-Valentin N, Melchior F. Control of SUMO and Ubiquitin by ROS: Signaling and disease implications. *Mol Aspects Med.* 2018;63:3-17.
151. Guo C, Henley JM. Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. *IUBMB Life.* 2014;66(2):71-7.

152. Niskanen EA, Palvimo JJ. Chromatin SUMOylation in heat stress: To protect, pause and organise?: SUMO stress response on chromatin. *Bioessays*. 2017;39(6).
153. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal*. 2009;2(72):ra24.
154. Silveirinha V, Stephens GJ, Cimarosti H. Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. *J Neurochem*. 2013;127(5):580-91.
155. Lee YJ, Hallenbeck JM. SUMO and ischemic tolerance. *Neuromolecular Med*. 2013;15(4):771-81.
156. Karandikar P, Gerstl JVE, Kappel AD, Won SY, Dubinski D, Garcia-Segura ME, et al. SUMOtherapeutics for Ischemic Stroke. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(5).
157. Bernstock JD, Yang W, Ye DG, Shen Y, Pluchino S, Lee YJ, et al. SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(1):5-16.
158. Wang L, Ma Q, Yang W, Mackensen GB, Paschen W. Moderate hypothermia induces marked increase in levels and nuclear accumulation of SUMO2/3-conjugated proteins in neurons. *J Neurochem*. 2012;123(3):349-59.
159. Niskanen EA, Malinen M, Sutinen P, Toropainen S, Paakinaho V, Vihervaara A, et al. Global SUMOylation on active chromatin is an acute heat stress response restricting transcription. *Genome Biol*. 2015;16(1):153.
160. Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 2):261-6.
161. Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, et al. Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 2001;276(43):40263-7.
162. Stankovic-Valentin N, Drzewicka K, König C, Schiebel E, Melchior F. Redox regulation of SUMO enzymes is required for ATM activity and survival in oxidative stress. *EMBO J*. 2016;35(12):1312-29.
163. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell*. 2006;21(3):349-57.
164. Xu Z, Lam LS, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SW. Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *FASEB J*. 2008;22(1):127-37.
165. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):285-96.
166. Wilson JW, Shakir D, Batie M, Frost M, Rocha S. Oxygen-sensing mechanisms in cells. *FEBS J*. 2020;287(18):3888-906.
167. Liu Q, Palmgren VAC, Danen EH, Le Dévédec SE. Acute vs. chronic vs. intermittent hypoxia in breast Cancer: a review on its application in in vitro research. *Mol Biol Rep*. 2022;49(11):10961-73.
168. Wielockx B, Grinenko T, Mirtschink P, Chavakis T. Hypoxia Pathway Proteins in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cells*. 2019;8(2).
169. Claesson-Welsh L. Oxygen sensing; a stunningly elegant molecular machinery hijacked in cancer. *Ups J Med Sci*. 2020;125(3):205-10.
170. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016;2(12):758-70.
171. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.
172. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
173. Mandl M, Depping R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 β): is it a rare exception? *Mol Med*. 2014;20(1):215-20.
174. Hankinson O. Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol Sci*. 2008;103(1):1-3.
175. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.

176. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4273-8.
177. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*. 1998;7(3):205-13.
178. Semenza GL. The Genomics and Genetics of Oxygen Homeostasis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2020;21:183-204.
179. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22.
180. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 1997;11(1):72-82.
181. Ravenna L, Salvatori L, Russo MA. HIF3 α : the little we know. *FEBS J*. 2016;283(6):993-1003.
182. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310(4):C260-9.
183. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):7987-92.
184. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15.
185. Chapman-Smith A, Lutwyche JK, Whitelaw ML. Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5353-62.
186. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin α /beta pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(3):394-404.
187. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Görlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):235-40.
188. O'Rourke JF, Dachs GU, Gleadle JM, Maxwell PH, Pugh CW, Stratford IJ, et al. Hypoxia response elements. *Oncol Res*. 1997;9(6-7):327-32.
189. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell*. 2007;18(11):4528-42.
190. Tal R, Shaish A, Bangio L, Peled M, Breitbart E, Harats D. Activation of C-transactivation domain is essential for optimal HIF-1 α -mediated transcriptional and angiogenic effects. *Microvasc Res*. 2008;76(1):1-6.
191. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):12969-73.
192. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest*. 2022;132(11).
193. Samanta D, Semenza GL. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870(1):15-22.
194. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*. 2021;599(1):23-37.
195. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007;12(2):108-13.
196. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-97.
197. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-40.

198. Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):150-1.
199. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177-85.
200. Zhang L, Li L, Liu H, Prabhakaran K, Zhang X, Borowitz JL, et al. HIF-1 α activation by a redox-sensitive pathway mediates cyanide-induced BNIP3 upregulation and mitochondrial-dependent cell death. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(1):117-27.
201. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells.* 2019;8(3).
202. Boström P, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Borén J, Carlsson LM, et al. Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1871-6.
203. Rankin EB, Rha J, Selak MA, Unger TL, Keith B, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol Cell Biol.* 2009;29(16):4527-38.
204. Karagiota A, Chachami G, Paraskeva E. Lipid Metabolism in Cancer: The Role of Acylglycerolphosphate Acyltransferases (AGPATs). *Cancers (Basel).* 2022;14(1).
205. Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab.* 2009;9(6):512-24.
206. Hu B, Guo Y, Garbacz WG, Jiang M, Xu M, Huang H, et al. Fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol.* 2015;63(4):855-62.
207. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 2014;9(1):349-65.
208. Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(9):1142-52.
209. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 14):3485-93.
210. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9030-7.
211. Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, Semenza GL. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(5):L941-9.
212. Chiche J, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 2009;69(1):358-68.
213. Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol.* 2006;76:217-57.
214. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9(6):677-84.
215. Flamme I, Krieg M, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HIF/HIF-2 α . *Am J Pathol.* 1998;153(1):25-9.
216. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 α in angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9087-98.
217. Ramírez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M, Simon MC. HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev Cell.* 2006;11(1):81-92.

218. Ramírez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells*. 2001;19(4):279-86.
219. Qin Y, Zhang J, Babapoor-Farrokhran S, Applewhite B, Deshpande M, Megarity H, et al. PAI-1 is a vascular cell-specific HIF-2-dependent angiogenic factor that promotes retinal neovascularization in diabetic patients. *Sci Adv*. 2022;8(9):eabm1896.
220. Tsuzuki T, Okada H, Cho H, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, et al. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;168(1):95-101.
221. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2006;26(37):9471-81.
222. Chang J, Erler J. Hypoxia-mediated metastasis. *Adv Exp Med Biol*. 2014;772:55-81.
223. Yang SW, Zhang ZG, Hao YX, Zhao YL, Qian F, Shi Y, et al. HIF-1 α induces the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer stem cells through the Snail pathway. *Oncotarget*. 2017;8(6):9535-45.
224. Huang CH, Yang WH, Chang SY, Tai SK, Tzeng CH, Kao JY, et al. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia*. 2009;11(12):1371-82.
225. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. 2008;10(3):295-305.
226. Leong HS, Chambers AF. Hypoxia promotes tumor cell motility via RhoA and ROCK1 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):887-8.
227. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, et al. Retraction Note: Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2020;579(7799):456.
228. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10819-29.
229. Hasmmim M, Noman MZ, Lauriol J, Benlalam H, Mallavialle A, Rosselli F, et al. Hypoxia-dependent inhibition of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis involves NANOG induction in target cells. *J Immunol*. 2011;187(8):4031-9.
230. Bae KM, Dai Y, Vieweg J, Siemann DW. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res*. 2016;6(5):1078-88.
231. Shan F, Huang Z, Xiong R, Huang QY, Li J. HIF1 α -induced upregulation of KLF4 promotes migration of human vascular smooth muscle cells under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2020;235(1):141-50.
232. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*. 2006;20(5):557-70.
233. Rani S, Roy S, Singh M, Kaithwas G. Regulation of Transactivation at C-TAD Domain of HIF-1. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:2407223.
234. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, Sée V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
235. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer*. 2005;117(5):764-74.
236. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 17):2976-86.
237. Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjöland H, et al. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1 α in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett*. 2004;569(1-3):293-300.
238. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell*. 2007;131(2):309-23.

239. Shan B, Gerez J, Haedo M, Fuertes M, Theodoropoulou M, Buchfelder M, et al. RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(1):13-27.
240. Li J, Xu Y, Long XD, Wang W, Jiao HK, Mei Z, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity. *Cancer Cell*. 2014;25(1):118-31.
241. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(3):646-52.
242. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell*. 2007;131(3):584-95.
243. Kang X, Li J, Zou Y, Yi J, Zhang H, Cao M, et al. PIASy stimulates HIF1 α SUMOylation and negatively regulates HIF1 α activity in response to hypoxia. *Oncogene*. 2010;29(41):5568-78.
244. Ao Q, Su W, Guo S, Cai L, Huang L. SENP1 desensitizes hypoxic ovarian cancer cells to cisplatin by up-regulating HIF-1 α . *Sci Rep*. 2015;5:16396.
245. Wang X, Liang X, Liang H, Wang B. SENP1/HIF-1 α feedback loop modulates hypoxia-induced cell proliferation, invasion, and EMT in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):1819-26.
246. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α . *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):1922-31.
247. Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, et al. The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46576-85.
248. Loinard C, Ginouvès A, Vilar J, Cochain C, Zouggari Y, Recalde A, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization. *Circulation*. 2009;120(1):50-9.
249. Núñez-O'Mara A, Gerpe-Pita A, Pozo S, Carlevaris O, Urzelai B, Lopitz-Otsoa F, et al. PHD3-SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity. *J Cell Sci*. 2015;128(1):40-9.
250. Sallais J, Alahari S, Tagliaferro A, Bhattacharjee J, Post M, Caniggia I. Factor inhibiting HIF1-A novel target of SUMOylation in the human placenta. *Oncotarget*. 2017;8(69):114002-18.
251. Cai Q, Verma SC, Kumar P, Ma M, Robertson ES. Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS One*. 2010;5(3):e9720.
252. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*. 2003;11(4):1043-54.
253. Kuo HY, Chang CC, Jeng JC, Hu HM, Lin DY, Maul GG, et al. SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(47):16973-8.
254. Diehl C, Akke M, Bekker-Jensen S, Mailand N, Streicher W, Wikström M. Structural Analysis of a Complex between Small Ubiquitin-like Modifier 1 (SUMO1) and the ZZ Domain of CREB-binding Protein (CBP/p300) Reveals a New Interaction Surface on SUMO. *J Biol Chem*. 2016;291(24):12658-72.
255. Yang W, Sheng H, Warner DS, Paschen W. Transient focal cerebral ischemia induces a dramatic activation of small ubiquitin-like modifier conjugation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(5):892-6.
256. Bernstock JD, Peruzzotti-Jametti L, Leonardi T, Vicario N, Ye D, Lee YJ, et al. SUMOylation promotes survival and integration of neural stem cell grafts in ischemic stroke. *EBioMedicine*. 2019;42:214-24.
257. Lee YJ, Castri P, Bembry J, Maric D, Auh S, Hallenbeck JM. SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. *J Neurochem*. 2009;109(1):257-67.

258. Rawlings N, Lee L, Nakamura Y, Wilkinson KA, Henley JM. Protective role of the deSUMOylating enzyme SENP3 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2019;14(4):e0213331.
259. Gu J, Fan Y, Liu X, Zhou L, Cheng J, Cai R, et al. SENP1 protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via a HIF1 α -dependent pathway. *Cardiovasc Res*. 2014;104(1):83-92.
260. Cimarosti H, Ashikaga E, Jaafari N, Dearden L, Rubin P, Wilkinson KA, et al. Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(1):17-22.
261. Kunz K, Wagner K, Mendler L, Hölper S, Dehne N, Müller S. SUMO Signaling by Hypoxic Inactivation of SUMO-Specific Isopeptidases. *Cell Rep*. 2016;16(11):3075-86.
262. Chachami G, Stankovic-Valentin N, Karagiota A, Basagianni A, Plessmann U, Urlaub H, et al. Hypoxia-induced Changes in SUMO Conjugation Affect Transcriptional Regulation Under Low Oxygen. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(6):1197-209.
263. Blüthner M, Bautz FA. Cloning and characterization of the cDNA coding for a polymyositis-scleroderma overlap syndrome-related nucleolar 100-kD protein. *J Exp Med*. 1992;176(4):973-80.
264. Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' $\rightarrow$ 5' exonucleases. *Genes Dev*. 1999;13(16):2148-58.
265. Zinder JC, Lima CD. Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev*. 2017;31(2):88-100.
266. Januszky K, Lima CD. The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol*. 2014;24:132-40.
267. Chlebowski A, Lubas M, Jensen TH, Dziembowski A. RNA decay machines: the exosome. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(6-7):552-60.
268. Liu Q, Greimann JC, Lima CD. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*. 2006;127(6):1223-37.
269. Januszky K, Lima CD. Structural components and architectures of RNA exosomes. *Adv Exp Med Biol*. 2010;702:9-28.
270. Staals RH, Bronkhorst AW, Schilders G, Slomovic S, Schuster G, Heck AJ, et al. Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J*. 2010;29(14):2358-67.
271. Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, et al. The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J*. 2010;29(14):2342-57.
272. Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(4):227-39.
273. Razew M, Galej WP. What's NEXT for the exosome? *Mol Cell*. 2022;82(13):2355-7.
274. Davidson L, Francis L, Cordiner RA, Eaton JD, Estell C, Macias S, et al. Rapid Depletion of DIS3, EXOSC10, or XRN2 Reveals the Immediate Impact of Exoribonucleolysis on Nuclear RNA Metabolism and Transcriptional Control. *Cell Rep*. 2019;26(10):2779-91.e5.
275. Meola N, Domanski M, Karadoulama E, Chen Y, Gentil C, Pultz D, et al. Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Mol Cell*. 2016;64(3):520-33.
276. Callahan KP, Butler JS. TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rps6. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3540-7.
277. Schmidt K, Butler JS. Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013;4(2):217-31.
278. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Pruijn GJ, et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*. 2001;107(4):451-64.
279. Schaeffer D, Clark A, Klauer AA, Tsanova B, van Hoof A. Functions of the cytoplasmic exosome. *Adv Exp Med Biol*. 2011;702:79-90.
280. Wasmuth EV, Lima CD. The Rps6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(2):846-60.

281. Schuch B, Feigenbutz M, Makino DL, Falk S, Basquin C, Mitchell P, et al. The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J.* 2014;33(23):2829-46.
282. Stead JA, Costello JL, Livingstone MJ, Mitchell P. The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(16):5556-67.
283. Midtgaard SF, Assenholt J, Jonstrup AT, Van LB, Jensen TH, Brodersen DE. Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):11898-903.
284. Henras AK, Soudet J, G rus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougin A, et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(15):2334-59.
285. Pirouz M, Munaf  M, Ebrahimi AG, Choe J, Gregory RI. Exonuclease requirements for mammalian ribosomal RNA biogenesis and surveillance. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6):490-500.
286. Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJ, Watkins NJ. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol.* 2013;200(5):577-88.
287. Sloan KE, Knox AA, Wells GR, Schneider C, Watkins NJ. Interactions and activities of factors involved in the late stages of human 18S rRNA maturation. *RNA Biol.* 2019;16(2):196-210.
288. Mullineux ST, Lafontaine DL. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie.* 2012;94(7):1521-32.
289. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-63.
290. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 2016;26(1):52-64.
291. Marin-Vicente C, Domingo-Prim J, Eberle AB, Visa N. RRP6/EXOSC10 is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *J Cell Sci.* 2015;128(6):1097-107.
292. Domingo-Prim J, Endara-Coll M, Bonath F, Jimeno S, Prados-Carvajal R, Friedl nder MR, et al. EXOSC10 is required for RPA assembly and controlled DNA end resection at DNA double-strand breaks. *Nat Commun.* 2019;10(1):2135.
293. Petit FG, Jamin SP, Kernanec PY, Becker E, Halet G, Primig M. EXOSC10/Rrp6 is essential for the eight-cell embryo/morula transition. *Dev Biol.* 2022;483:58-65.
294. Ulmke PA, Xie Y, Sokpor G, Pham L, Shomroni O, Berulava T, et al. Post-transcriptional regulation by the exosome complex is required for cell survival and forebrain development via repression of P53 signaling. *Development.* 2021;148(3).
295. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sj stedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017;357(6352).
296. Meng ZY, Fan YC, Zhang CS, Zhang LL, Wu T, Nong MY, et al. EXOSC10 is a novel hepatocellular carcinoma prognostic biomarker: a comprehensive bioinformatics analysis and experiment verification. *PeerJ.* 2023;11:e15860.
297. Impens F, Radoshevich L, Cossart P, Ribet D. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12432-7.
298. Zhao Y, Kwon SW, Anselmo A, Kaur K, White MA. Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20999-1002.
299. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(4):525-31.
300. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1 alpha and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):995-1006.

301. Sanij E, Hannan RD. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics*. 2009;4(6):374-82.
302. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol*. 2016;17(1):19.
303. Raman N, Nayak A, Muller S. mTOR signaling regulates nucleolar targeting of the SUMO-specific isopeptidase SENP3. *Mol Cell Biol*. 2014;34(24):4474-84.
304. Artemenko M, Zhong SSW, To SKY, Wong AST. p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer Lett*. 2022;535:215593.
305. Shubina MY, Musinova YR, Sheval EV. Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: Evolution of Structure and Functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(9):941-50.
306. Chen Y, Li Y, Dai RS, Savage JC, Shinde U, Klimek J, et al. The ubiquitin-specific protease USP36 SUMOylates EXOSC10 and promotes the nucleolar RNA exosome function in rRNA processing. *Nucleic Acids Res*. 2023.
307. Okazaki K, Maltepe E. Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen Med*. 2006;1(1):71-83.
308. Imanirad P, Dzierzak E. Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;51(4):256-63.
309. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24).
310. Collier H, Albanese A, Kwok CS, Kou J, Rocha S. Functional crosstalk between chromatin and hypoxia signalling. *Cell Signal*. 2023;106:110660.
311. Bertero T, Rezzonico R, Pottier N, Mari B. Impact of MicroRNAs in the Cellular Response to Hypoxia. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;333:91-158.
312. Tiana M, Acosta-Iborra B, Hernández R, Galiana C, Fernández-Moreno M, Jimenez B, et al. Metabolic labeling of RNA uncovers the contribution of transcription and decay rates on hypoxia-induced changes in RNA levels. *RNA*. 2020;26(8):1006-22.
313. Natua S, Ashok C, Shukla S. Hypoxia-induced alternative splicing in human diseases: the pledge, the turn, and the prestige. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(6):2729-47.
314. Taze C, Drakouli S, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, Georgatsou E, et al. Short-term hypoxia triggers ROS and SAFB mediated nuclear matrix and mRNA splicing remodeling. *Redox Biol*. 2022;58:102545.
315. Chee NT, Lohse I, Brothers SP. mRNA-to-protein translation in hypoxia. *Mol Cancer*. 2019;18(1):49.
316. Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):228-37.
317. Blanco FF, Jimbo M, Wulfschuh J, Gallagher I, Deng J, Enyenihi L, et al. The mRNA-binding protein HuR promotes hypoxia-induced chemoresistance through posttranscriptional regulation of the proto-oncogene PIM1 in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2016;35(19):2529-41.
318. Goldberg-Cohen I, Furneaux H, Levy AP. A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *J Biol Chem*. 2002;277(16):13635-40.
319. Ho V, Acquaviva A, Duh E, Bunn HF. Use of a marked erythropoietin gene for investigation of its cis-acting elements. *J Biol Chem*. 1995;270(17):10084-90.
320. Czyzyk-Krzeska MF, Dominski Z, Kole R, Millhorn DE. Hypoxia stimulates binding of a cytoplasmic protein to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9940-5.
321. Bauer R, Meyer SP, Kloss KA, Guerrero Ruiz VM, Reuscher S, Zhou Y, et al. Functional RNA Dynamics Are Progressively Governed by RNA Destabilization during the Adaptation to Chronic Hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10).
322. Enserink JM. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*. 2015;10:4.
323. Fasken MB, Morton DJ, Kuiper EG, Jones SK, Leung SW, Corbett AH. The RNA Exosome and Human Disease. *Methods Mol Biol*. 2020;2062:3-33.

324. Knight JR, Bastide A, Peretti D, Roobol A, Roobol J, Mallucci GR, et al. Cooling-induced SUMOylation of EXOSC10 down-regulates ribosome biogenesis. *RNA*. 2016;22(4):623-35.
325. Hou G, Zhao X, Li L, Yang Q, Liu X, Huang C, et al. SUMOylation of YTHDF2 promotes mRNA degradation and cancer progression by increasing its binding affinity with m6A-modified mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(5):2859-77.