



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου *CYLD* στην
απόκριση στην υποξία σε κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού
HCC1937 και εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK293**

Ματενόγλου Ευαγγελία
Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευφροσύνη Παρασκευά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Επιβλέπουσα
- Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Βιοχημείας
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

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

Λάρισα, Οκτώβριος, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS
The effect of *CYLD* gene deletion on the response to hypoxia in
HCC1937 breast adenocarcinoma cells and HEK293 human
embryonic kidney cells**

By
Matenoglou Evangelia
MD

Advisory Thesis Committee:

- Efrosyni Paraskeva, Associate Professor of Cellular Physiology, Supervisor
- Georgia Chachami, Lecturer of Biochemistry
- Matthaïos Speletas, Professor of Medical Immunology

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

Larissa, October, 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Κυτταρικής Φυσιολογίας, κυρίας Παρασκευά Ευφροσύνης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Παρασκευά Ευφροσύνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών αλλά και για την εμπιστοσύνη και διαρκή καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ για την υπομονή και μεθοδικότητα με την οποία μοιράστηκε τις επιστημονικές της γνώσεις μαζί μου.

Ακόμα ευχαριστώ τον υπεύθυνο του Π.Μ.Σ., Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας, κύριο Σπελέτα Ματθαίο για την ορθή οργάνωση και εύρυθμη λειτουργία του προγράμματος.

Ευχαριστώ επίσης την κυρία Χαχάμη Γεωργία, λέκτορα Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την παρακολούθηση και ανάγνωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο και ουσιαστικό ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συνεχή ηθική και ψυχολογική υποστήριξη που μου χαρίζουν απλόχερα σε κάθε μου μικρό ή μεγάλο βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	15
ABSTRACT.....	17
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
1.1. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	19
1.2. Ουβικιτινίωση	20
1.2.1 Η πρωτεΐνη ουβικιτίνη.....	20
1.2.2 Το μονοπάτι της ουβικιτινίωσης.....	21
1.2.3 Τύποι ουβικιτινίωσης.....	23
1.2.4 Δράσεις της ουβικιτινίωσης.....	24
1.2.5 Αποουβικιτινίωση.....	25
1.2.6 Οι αποουβικιτινάσες.....	26
1.2.7 Χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοπατιών ρυθμιζόμενων μέσω ουβικιτινίωσης	27
1.3 Η αποουβικιτινάση CYLD	28
1.3.1 Δομή της CYLD.....	29
1.3.2 Η ρύθμιση της CYLD.....	29
1.3.3 Δράσεις της CYLD.....	31
1.3.3.1 Η επίδραση της CYLD στη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων και ο ρόλος της στην κυτταρική μετακίνηση.....	32
1.3.3.2 Ο ρόλος της CYLD στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και θάνατο.....	33
1.3.3.3 Η CYLD στο μονοπάτι του NF-kB.....	34
1.3.3.4 CYLD και καρκίνος.....	35
1.4 Η κυτταρική απόκριση στην υποξία	36
1.4.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF.....	37
1.4.1.1 Ισομορφές και δομικά χαρακτηριστικά.....	37
1.4.2 Γονίδια στόχοι των παραγόντων HIF.....	38
1.4.3 Η ρύθμιση του παράγοντα HIF-1α.....	39
1.4.3.1 Η εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση.....	39
1.4.3.2 Η ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1.....	41
1.4.3.2.1 Ρύθμιση της σύνθεσης του HIF-1α.....	41
1.4.3.2.2 Ρύθμιση των επιπέδων και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α	41

1.4.3.2.2.1 Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.....	41
1.4.3.2.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	42
1.4.3.2.2.3 Ρύθμιση του HIF-1α από το σύστημα της ουβικιτίνης.....	44
1.4.4 Η επίδραση του HIF-1α σε κυτταρικές λειτουργίες.....	45
1.4.5 Η επίδραση του HIF-1α σε παθολογικές καταστάσεις.....	46
1.4.5.1 Η επίδραση του HIF-1α στον καρκίνο.....	47
1.4.5.1.1 Η στόχευση του παράγοντα HIF-1 στη θεραπεία του καρκίνου.....	48
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1 Υλικά	49
2.1.1 Κυτταρικές Σειρές.....	49
2.1.2 Αντιδραστήρια.....	49
2.2. Μέθοδοι	50
2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	50
2.2.2 Κατάψυξη κυττάρων.....	51
2.2.3 Απόψυξη κυττάρων.....	51
2.2.4 Κατεργασία κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.....	51
2.2.5 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	51
2.2.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών.....	52
2.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS- PAGE.....	53
2.2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	57
2.2.9 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	57
2.2.10 Ανοσοανίχνευση.....	59
2.2.11 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού / επιβίωσης με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.....	60
2.2.12 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων.....	61
2.2.13 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini-preparation).....	62
2.2.14 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων.....	63
2.2.15 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας με τη χρήση της λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς (Luciferase assay).....	63
2.2.16 Απομόνωση ολικού RNA.....	65
2.2.17 Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή.....	65
2.2.18 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Quantitative Real Time PCR - qRT-PCR).....	66

2.2.19 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
3.1 Επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της <i>CYLD</i> στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό / επιβίωση κυττάρων HCC1937 και HEK293 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....	69
3.2 Επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της <i>CYLD</i> στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α κυττάρων HCC1937 και HEK293.....	71
3.3 Έλεγχος της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου της <i>CYLD</i> στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 κυττάρων HEK293.....	73
3.4 Επίδραση της υποξίας στα επίπεδα mRNA της LOX σε κύτταρα HCC1937 και HEK293.....	75
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADRP (Adipose differentiation-related protein): πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων
- AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase): ακυλομεταφεράση της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης
- ALDOA (Aldolase A): Αλδολάση Α
- ARD: Arrest defective protein
- ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
- ASB4: Ankyrin repeat and SOCS box containing 4
- Asp (Aspartic acid): ασπαραγινικό οξύ
- ATM (Ataxia-telangiectasia mutated): μεταλλαγμένη κινάση αταξία-τηλεαγγειεκτασία
- ATP (Adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη
- Bcl-3 (B-cell lymphoma 3): πρωτεΐνη λεμφώματος Β-κυττάρων
- BNIP3 (Bcl-2-Interacting-protein 3): πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Bcl-2
- CAP (Cytoskeleton-associated proteins): πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τον κυτταροσκελετό
- CBP (Creb-binding protein): πρωτεΐνη που προσδένεται στον παράγοντα CREB
- CCND1 (cyclin D1): κυκλίνη D1
- CD39/CD70 (Cluster of differentiation): σύμπλεγμα διαφοροποίησης
- CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1): εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 1
- CITED (C-terminal domain): πρωτεΐνη που συνδέεται με την καρβοξυτελική επικράτεια
- CK1δ (Casein kinase 1δ): κινάση της καζεΐνης 1δ
- CREB (cAMP response element binding): παράγοντας που προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης στο κυκλικό AMP
- CYLD (Cylindromatosis): πρωτεΐνη κυλινδρωμάτωσης
- Cys (Cysteine): κυστεΐνη
- DNA (Deoxyribonucleic acid): δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- DUB (Deubiquitinating enzyme): αποουβικτινάση
- Dvl: Dishevelled
- EB1: End-binding protein 1

EEY/F: glutamic acid-glutamic acid-tyrosine/phenylalanine
EMT (Epithelial-mesenchymal transition): μετάπτωση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό τύπο
ENO1 (Enolase 1): ενολάση 1
EPO (Erythropoietin): ερυθροποιητίνη
ERK (extracellular signal-regulated kinase): κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα
FABP (Fatty acid-binding protein): πρωτεΐνη πρόσδεσης σε λιπαρά οξέα
Fbw7: F-box/WD repeat-containing protein 7
FIH (Factor inhibiting HIF): αναστολέας των HIF
Fz υποδοχείς: Frizzled
GAP (GTPase activating protein): πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPάσης
Gly (Glycine): γλυκίνη
GSK (Glycogen synthase kinase): κινάση της συνθάσης γλυκογόνου
GTP (Guanosine triphosphate): τριφωσφορική γουανοσίνη
HDAC (Histone deacetylase): απακετυλάση ιστονών
HECT: Homologous to the E6AP carboxyl terminus
HIF (Hypoxia Inducible Factor): επαγόμενος από την υποξία παράγοντας
His (Histidine): ιστιδίνη
HK1/2 (Hexokinase): εξοκινάση
HPV (Human papilloma virus): ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων
HRE (Hypoxia response element): στοιχείο απόκρισης στην υποξία
HSP90 (Heat shock protein): πρωτεΐνη θερμικού σοκ
IFN-γ (Interferone-γ): ιντερφερόνη-γ
IκB (Inhibitor of kappa B): αναστολέας του κάπα B
IKK (IκB kinase): κινάση του IκB
IL-1β (Interleukin-1β): ιντερλευκίνη-1β
IPAS (Inhibitory PAS domain protein): ανασταλτική πρωτεΐνη της PAS επικράτειας
JAMM: JAB1/MPN/Mov34 μεταλλοπρωτεάση
JNK: c-Jun N-terminal kinase
LDHA (Lactate dehydrogenase A): γαλακτική δεϋδρογενάση A
LPS (Lipopolysaccharide): λιποπολυσακχαρίτης
LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1): πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας

MAPK (Mitogen activated-protein kinase): κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα

MBP (Microtubule-binding protein): πρωτεΐνη προσδεμένη σε μικροσωληνίσκους

MCPIP1: Monocyte chemotactic protein- induced protein-1

MgcRacGAP: Male germ cell Rac GTPase-activating protein

MJD (Machado-Josephin domain protease): πρωτεάση με επικράτεια Machado-Josephin

mTOR (Mammalian target of rapamycin): στόχος ραπαμυκίνης θηλαστικών

NEMO (NF-kappa-B essential modulator): απαραίτητος ρυθμιστής του NF-κB

NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): πυρηνικός παράγοντας κάπα-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτή των ενεργοποιημένων B κυττάρων

NTHi (Nontypeable Haemophilus influenzae): άτυπο στέλεχος αιμόφιλου ινφλουένζας

OTU (Ovarian tumor protease): πρωτεάση όγκου ωοθηκών

PCAF (P300/CBP-associated factor): παράγοντας σχετιζόμενος με το p300/CBP

PDGF (Platelet derived growth factor): αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων

PDK1 (Pyruvate dehydrogenase kinase 1): κινάση της πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης 1

PGF (Placental growth factor): αυξητικός παράγοντας πλακούντα

PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1): κινάση του φωσφογλυκερικού 1

PHD (Prolyl-hydroxylase): προλυλ-υδροξυλάση

PFK (Phosphofructokinase): φωσφοφρουκτοκινάση

PI3K (phosphoinositide 3-kinase): κινάση της 3 φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης

PKA (protein kinase A): πρωτεϊνική κινάση A

PKM2 (Pyruvate kinase M2): ισομορφή M2 της πυροσταφυλικής κινάσης

PPAR-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma): υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων γ

RACK1 (Receptor for activated C kinase 1): υποδοχέας 1 για την ενεργοποιημένη κινάση C

RING: Really Interesting New Gene

RIP1 (Receptor-interacting protein 1): πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με υποδοχείς

ROS (Reactive oxygen species): ενεργές ρίζες οξυγόνου

TAD (Transactivation domain): περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής

TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1): κινάση που ενεργοποιείται από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β

TGF (Transforming growth factor): αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού

TNF (Tumor necrosis factor): παράγοντας νέκρωσης όγκων

TRAF (TNF receptor associated factor): παράγοντας σχετιζόμενος με τον υποδοχέα TNF

TRIM: Tripartite motif family

TRIP (TRAF-interacting protein): πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον TRAF

SGF (Sarcoma growth factor): αυξητικός παράγοντας σαρκώματος

SIAH: Seven in absentia homolog

SPOP: Speckle-type POZ protein

UCH (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase): υδρολάση καρβοξυτελικού άκρου ουβικιτίνης

USP (Ubiquitin-specific proteases): ειδική πρωτεάση ουβικιτίνης

VEGF (Vascular endothelial growth factor): αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

VHL: Von Hippel Lindau

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποξία, που ορίζεται ως χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου (PO₂) στους ιστούς, χαρακτηρίζει φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις όπως η εμβρυογένεση και ο καρκίνος. Ο οργανισμός για να ανταπεξέλθει στην υποξία ρυθμίζει βιολογικές διαδικασίες, μέσω της δράσης των επαγόμενων από την υποξία ετεροδιμερών μεταγραφικών παραγόντων HIF (Hypoxia Inducible Factors). Σε συνθήκες νορμοξίας οι α υπομονάδες των HIF υδροξυλιώνονται από προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs), ουβικιτινιώνονται από την pVHL και αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα.

Η ουβικιτινίωση αποτελεί μία αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Ενώ ο μηχανισμός που οδηγεί στην προσθήκη ουβικιτίνης στους παράγοντες HIFα είναι καλά μελετημένος, λίγα είναι γνωστά για την αναίρεση της τροποποίησης.

Η αποουβικιτινάση CYLD είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία αναγνωρίστηκε αρχικά στην οικογενή κυλινδρωμάτωση και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Η CYLD επιδρά σε βασικές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, ο κυτταρικός κύκλος και ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτά του παράγοντα NF-κB και της JNK κινάσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στην απόκριση στην υποξία κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού HCC1937 και εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK293. Μελετήθηκαν, σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, η επίδραση της απαλοιφής της *CYLD* στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και στη μεταγραφική δράση του HIF-1.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η επίδραση της απαλοιφής της *CYLD* στην υποξία διαφέρει ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές. Στην καρκινική σειρά HCC1937, η απουσία της *CYLD* προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας και μείωση της επαγωγής των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α, ενώ στα κύτταρα HEK293 επέφερε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες υποξίας και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων HIF-1α. Επιπλέον, και στις δύο κυτταρικές σειρές, η απαλοιφή της *CYLD* οδήγησε σε μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1, λυσυλ-οξειδάση (lysyl-oxidase *LOX*), σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την επαγωγή του στην υποξία. Τέλος, σε πειράματα δοκιμασίας

λουσιφεράσης, η απαλοιφή της *CYLD* προκάλεσε μείωση της βασικής μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και δεν επηρέασε την επαγωγή της μεταγραφικής δράσης του σε συνθήκες υποξίας.

Συμπερασματικά, η απαλοιφή της *CYLD* επηρεάζει διαφορετικά την επιβίωση / πολλαπλασιασμό καρκινικών και εμβρυϊκών κυττάρων και την επαγωγή του παράγοντα HIF-1α σε αυτά.

ABSTRACT

Hypoxia, defined as low oxygen partial pressure (PO₂) in tissues, characterizes physiological and pathological conditions such as embryogenesis and cancer. To cope with hypoxia, the organism regulates biological processes mediated by the action of the heterodimeric Hypoxia Inducible transcription Factors (HIFs). Under normoxic conditions the HIF α subunits are hydroxylated by prolyl hydroxylases (PHDs), ubiquitinated by pVHL and degraded in the proteasome.

Ubiquitination is a reversible post-translational modification. While the mechanism leading to the ubiquitination of HIF α subunits is well studied, little is known about the factors involved in their deubiquitination.

The deubiquitinase CYLD is a tumor suppressor protein that was initially identified in Familial Cylindromatosis and has been associated with the development of various forms of cancer. CYLD plays a key role in physiological cellular processes including survival, proliferation, apoptosis, the cell cycle and regulates signaling pathways such as those of NF- κ B and JNK kinase.

The purpose of the present thesis is to study the effect of *CYLD* gene deletion on the response to hypoxia of HCC1937 breast adenocarcinoma cells and HEK293 embryonic kidney cells. The effect of *CYLD* gene deletion on cell survival / proliferation, HIF-1 α protein levels and HIF-1 transcriptional activity was studied under normoxic and hypoxic conditions.

The results presented here show that the effect of *CYLD* gene deletion differs between the two cell lines. In the breast adenocarcinoma cell line HCC1937, the absence of *CYLD* caused increased cell proliferation under normoxia and hypoxia and a decreased hypoxic induction of HIF-1 α protein levels, while in embryonic cells it resulted in decreased cell proliferation and increased induction of HIF-1 α protein levels under hypoxia. In addition, in both cell lines, deletion of *CYLD* led to decreased mRNA levels of the HIF-1 target gene, lysyl-oxidase (*LOX*), under normoxia and hypoxia, without significantly affecting its induction under hypoxia. Finally, in a luciferase reporter assay, *CYLD* deletion led to a decrease in HIF-1 basic transcriptional activity without affecting the induction of its transcriptional activity under hypoxia.

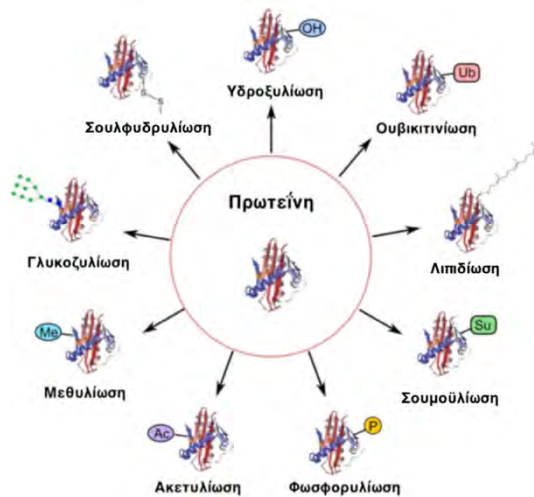
In conclusion, the deletion of *CYLD* has different effects on survival / proliferation and induction of HIF-1 α expression in cancer and embryonic cells.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει διαπιστωθεί ότι το ανθρώπινο πρωτέωμα είναι αρκετά πολυπλοκότερο από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Ενώ εκτιμάται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 20000-25000 γονίδια, ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών φαίνεται να ξεπερνά το 1 εκατομμύριο (1). Έτσι συμπεραίνεται πως ένα γονίδιο μπορεί να κωδικοποιήσει περισσότερες από μία πρωτεΐνες και αυτό επιτυγχάνεται, σε μεγάλο βαθμό, χάρη στην παραγωγή εναλλακτικών mRNA μεταγράφων.

Ωστόσο η αύξηση της πολυπλοκότητας από το επίπεδο του γονιδιώματος σε αυτό του πρωτεώματος εξυπηρετείται και από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν τη δράση, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη σταθερότητα και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και άλλους συμπαράγοντες (2) (Εικόνα 1). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μπορεί να δεχτεί μια πρωτεΐνη περιλαμβάνουν την προσθήκη μιας μικρής πρωτεΐνης (ουβικιτινίωση, σουμοϋλίωση, νεντυλίωση) ή την προσθήκη μιας χημικής ομάδας (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, νιτροζυλίωση, γλυκοζυλίωση) (3). Στις περισσότερες περιπτώσεις η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών αποτελεί μία ρυθμιζόμενη αντιστρεπτή διαδικασία.



Εικόνα 1: Είδη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Μετατροπή από (4).

Η σημασία των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων για τη λειτουργία των πρωτεϊνών γίνεται αντιληπτή στις περιπτώσεις όπου πρωτεΐνες που έχουν υποστεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών όπως ο

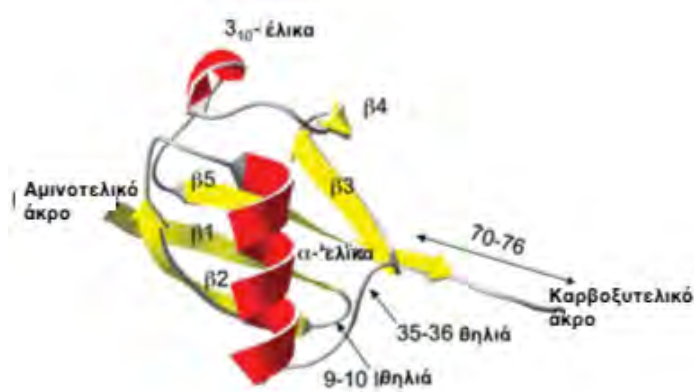
καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο και νευρολογικές παθήσεις (5).

1.2. Ουβικιτινίωση

Η ουβικιτινίωση είναι μια δυναμική και αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία ένα ή περισσότερα μόρια ουβικιτίνης προσδένονται σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου, μέσω της δράσης τριών ενζύμων (E1, E2, E3) (6). Η σύνδεση της ουβικιτίνης μπορεί όχι μόνο να οδηγήσει σε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στο σύστημα του πρωτεασώματος (ανακάλυψη για την οποία οι Aaron Ciechanover, Avram Herschko και Irwin Rose τιμήθηκαν με το βραβείο Χημείας Νόμπελ 2004), αλλά συμμετέχει στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διεργασιών και σηματοδοτικών μονοπατιών (7).

1.2.1 Η πρωτεΐνη ουβικιτίνη

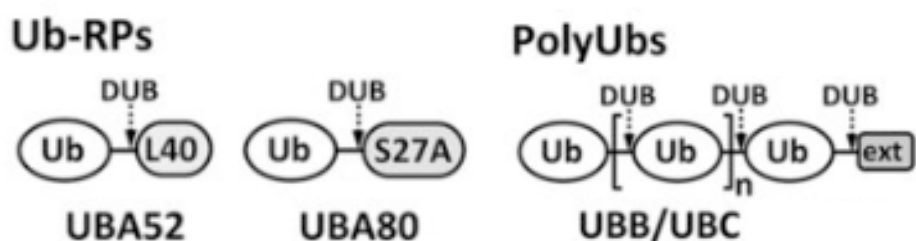
Η ουβικιτίνη είναι μια υψηλά συντηρημένη, θερμοάαντοχη μικρή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 8,5-kD η οποία αποτελείται από 76 αμινοξέα (8). Παρουσιάζει μια σφαιρική τριτοταγή δομή που ονομάζεται “b-grasp fold” και συναντάται ευρέως σε άλλες παρόμοιες πρωτεΐνες, η οποία αποτελείται από παράλληλες και αντιπαράλληλες β-πλευρικές αλυσίδες που περιβάλλουν μια κεντρικά τοποθετημένη α-έλικα (9) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης ουβικιτίνης. Ανατύπωση από Jackson.2006 (8).

Τέσσερα γονίδια (*UBA52*, *UBA80*, *UBB*, *UBC*) είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση της ουβικιτίνης (10), (11) (Εικόνα3). Τα γονίδια *UBB* και *UBC* κωδικοποιούν πολυμερή ουβικιτίνης, διαδοχικά συνδεδεμένα σε μορφή “head-to-tail”, ενώ τα γονίδια *UBA52* και *UBA80* κωδικοποιούν ένα μόριο ουβικιτίνης συνδεδεμένο στο καρβοξυτελικό του άκρο με τη ριβοσωμική πρωτεΐνη (RP) L40 και S27a

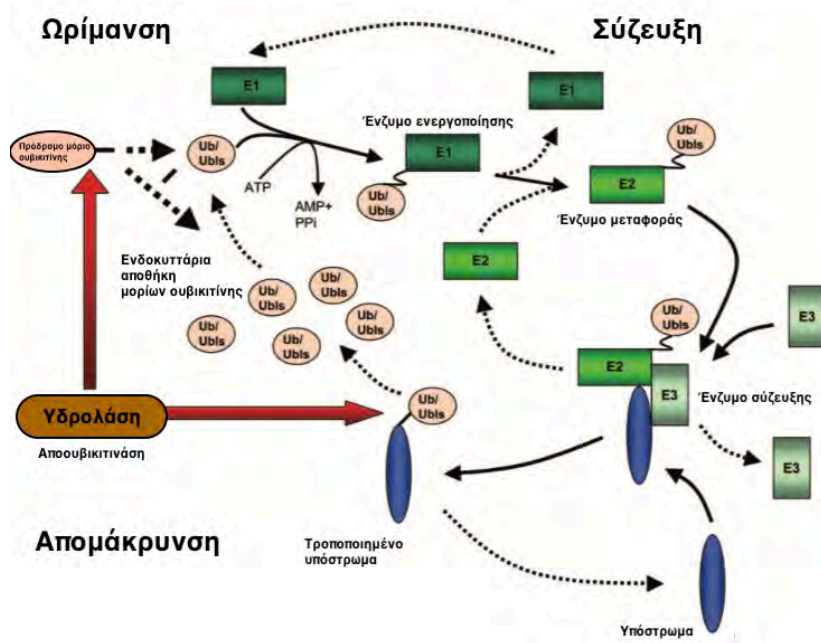
αντίστοιχα (12) (13) (Εικόνα 3). Τα ώριμα μόρια της ουβικιτίνης προκύπτουν ύστερα από απελευθέρωση των μορίων ουβικιτίνης από ένζυμα τα οποία ονομάζονται αποουβικιτινάσες (deubiquitinating enzymes-DUBs) (14), ο ρόλος και η λειτουργία των οποίων θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.



Εικόνα 3: Τα τέσσερα υπεύθυνα γονίδια για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης ουβικιτίνης. Ανατύπωση από Grou.2015 (14).

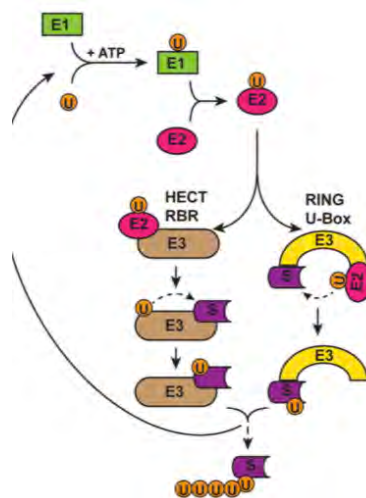
1.2.2 Το μονοπάτι της ουβικιτινίωσης

Η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη υπόστρωμα επιτυγχάνεται μέσω της δράσης ενός καταρράκτη τριών σταδίων που περιλαμβάνει αρχικά την ενεργοποίηση της ουβικιτίνης, στη συνέχεια τη σύζευξη-μεταφορά και τέλος την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη στόχο (15) (Εικόνα 4). Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων είναι απαραίτητη η δράση τριών ενζύμων που ανήκουν στην κατηγορία των E λιγασών. Στο αρχικό στάδιο οι E1 λιγάσες (εκπροσωπούνται από 2 ισομορφές) ενεργοποιούν το μόριο ουβικιτίνης, με το σχηματισμό ενός θειοεστερικού δεσμού μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου του καταλοίπου γλυκίνης της ουβικιτίνης και της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου E1, μέσω μιας ATP-εξαρτώμενης αντίδρασης. Κατόπιν οι E2 λιγάσες (περίπου 40 ισομορφές είναι γνωστές σήμερα) δέχονται στο ενεργό τους κέντρο την ενεργοποιημένη ουβικιτίνη και τη μεταφέρουν στην πρωτεΐνη υπόστρωμα με τη βοήθεια των E3 λιγασών (15), (16). Οι E3 λιγάσες, που ξεπερνούν σε αριθμό τις 600, αναγνωρίζουν και συνδέονται με την πρωτεΐνη στόχο, εξασφαλίζοντας εξειδίκευση στη διαδικασία.



Εικόνα 4: Ο κύκλος της ουβικιτινώσεως. Ανατύπωση από Hermann.2007 (17).

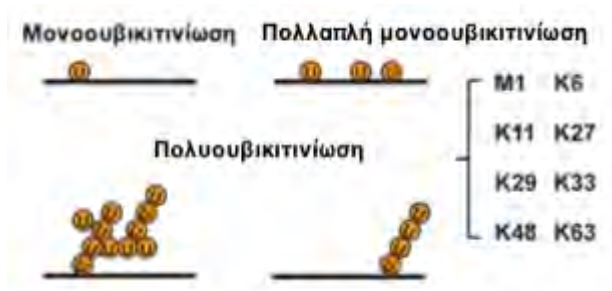
Οι E3 λιγάσες διακρίνονται σε δύο κύριες οικογένειες, οι οποίες διαφέρουν δομικά και λειτουργικά: τις RING (really interesting new gene) E3 λιγάσες και τις HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) E3 λιγάσες (Εικόνα 5). Οι RING E3 λιγάσες αποτελούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία λειτουργούν ως γέφυρες που μεσολαβούν την άμεση μεταφορά της ενεργοποιημένης ουβικιτίνης από τις E2 λιγάσες στις πρωτεΐνες υποστρώματα. Αντίθετα οι HECT E3 λιγάσες αρχικά μεταφέρουν την ουβικιτίνη από την E2 λιγάση στο ενεργό τους κέντρο, και στη συνέχεια στην πρωτεΐνη στόχο (18).



Εικόνα 5: Οι οικογένειες RING και HECT των E3 λιγασών και ο τρόπος δράσης τους. Ανατύπωση από Wu.2013 (19).

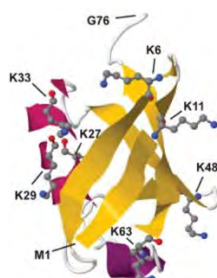
1.2.3 Τύποι ουβικιτινίωσης

Η ουβικιτινίωση διακρίνεται σε τρεις τύπους, ανάλογα με τον αριθμό των μορίων ουβικιτίνης που συνδέονται στην πρωτεΐνη στόχο, καθένας από τους οποίους φαίνεται ότι μεσολαβεί και διαφορετικές λειτουργίες (Εικόνα 6). Η μονοουβικιτινίωση χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ενός μόνο μορίου ουβικιτίνης. Η πολλαπλή μονοουβικιτινίωση περιλαμβάνει την προσθήκη πολλών μορίων ουβικιτίνης σε διαφορετικά κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου και η πολυουβικιτινίωση αφορά τις περιπτώσεις σύνδεσης στην πρωτεΐνη στόχο μιας αλυσίδας μορίων ουβικιτίνης (17).



Εικόνα 6: Οι τύποι ουβικιτινίωσης Ανατύπωση από Wu.2013 (19).

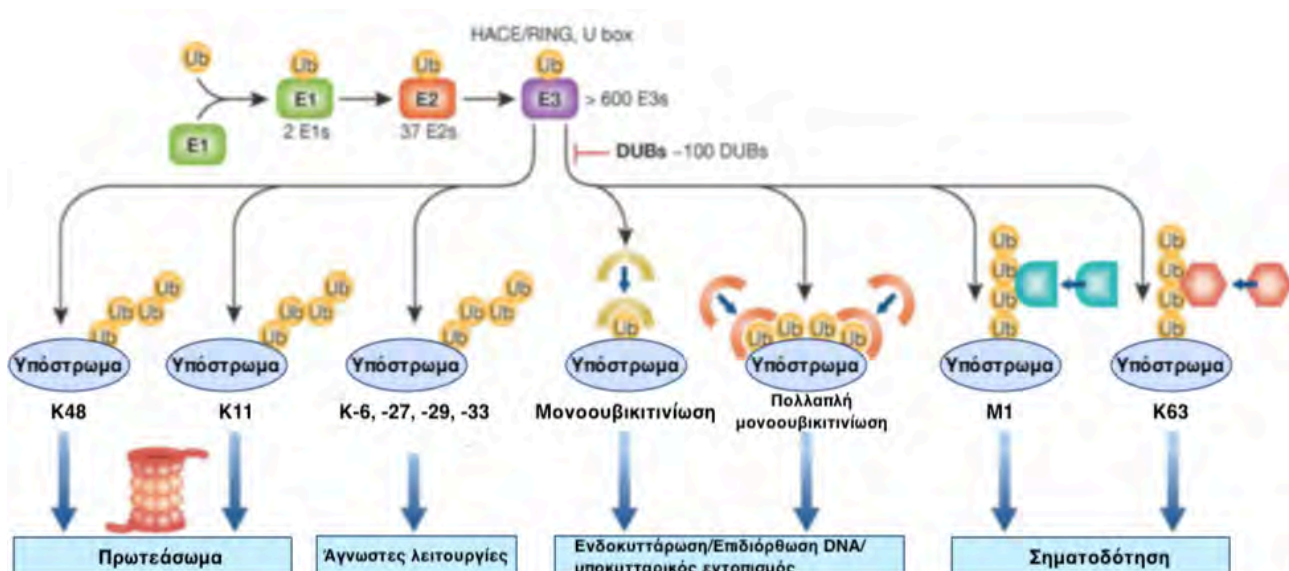
Στην περίπτωση της πολυουβικιτινίωσης, οι αλυσίδες ουβικιτίνης διακρίνονται σύμφωνα με το κατάλοιπο λυσίνης της ουβικιτίνης στο οποίο συνδέονται σε K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 αλυσίδα (Εικόνα 7). Οι δεσμοί που δημιουργούνται μεταξύ των μορίων ουβικιτίνης μέσα στην αλυσίδα είναι ισοπεπτιδικοί μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της γλυκίνης του ενός μορίου ουβικιτίνης και της ε-αμινομάδας της λυσίνης του προηγούμενου (20). Ξεχωριστή μορφή αλυσίδας πολυουβικιτίνης, η οποία δεν σχηματίζεται σε κατάλοιπο λυσίνης αλλά στο πρώτο αμινοξύ της ουβικιτίνης, τη μεθειονίνη (M1), αποτελεί η γραμμική ουβικιτινίωση.



Εικόνα 7: Οι θέσεις των 7 καταλοίπων λυσίνης και του καταλοίπου μεθειονίνης τα οποία καθορίζουν τον τύπο αλυσίδας ουβικιτίνης. Με κίτρινο απεικονίζονται οι β-αλυσίδες και με μωβ η α-έλικα. Ανατύπωση από Wu.2013 (19).

1.2.4 Δράσεις της ουβικιτινίωσης

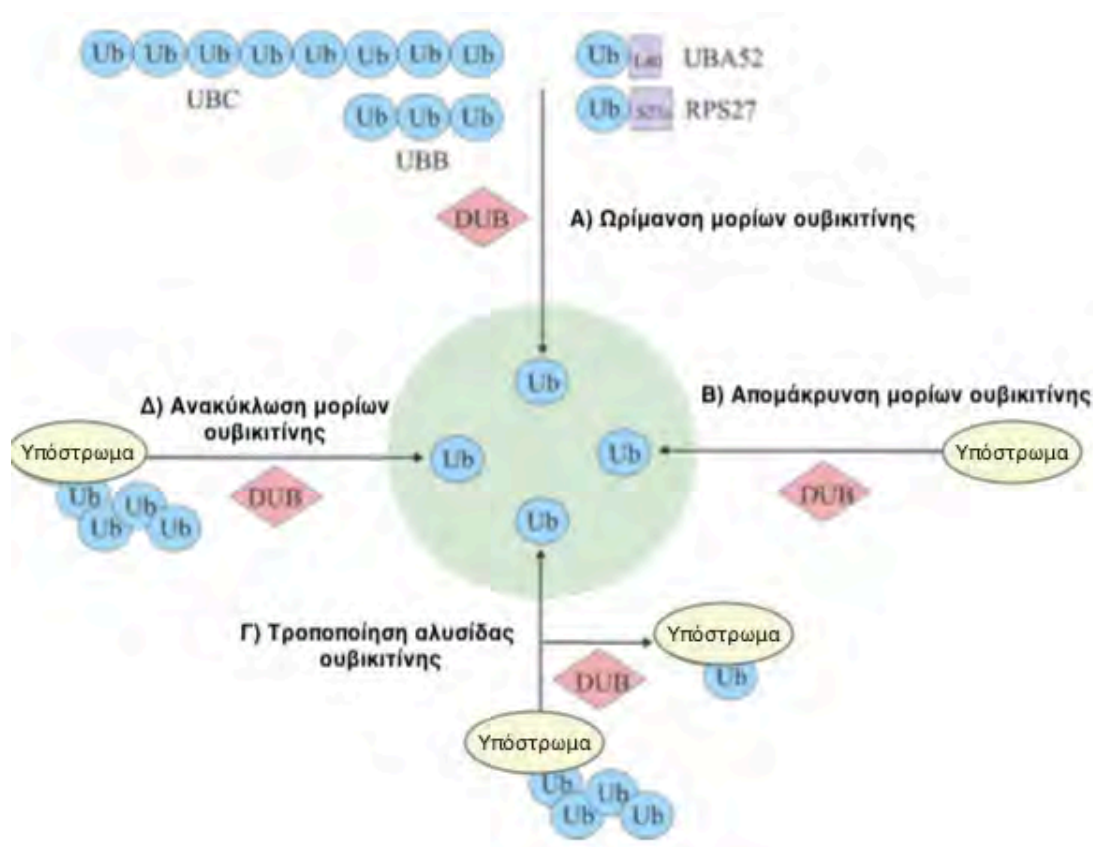
Οι δράσεις της ουβικιτινίωσης διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο αλλά και με την αλυσίδα που φέρει η πρωτεΐνη στόχος (Εικόνα 8). Η μονοουβικιτινίωση και η πολλαπλή μονοουβικιτινίωση μεσολαβούν κυρίως την είσοδο των πρωτεϊνών στόχων σε εκκριτικά κυστίδια, διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και ρύθμισης των ιστονών (21) ενώ η πολυουβικιτινίωση είναι υπεύθυνη τόσο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στόχων όσο και για τη ρύθμιση μη πρωτεολυτικών κυτταρικών λειτουργιών, οι οποίες καθορίζονται από το κατάλοιπο λυσίνης το οποίο φέρει την αλυσίδα και περιλαμβάνουν ενδεικτικά την επιδιόρθωση του DNA, τη μεταγωγή σήματος και διεργασίες του κυτταρικού κύκλου (22). Συγκεκριμένα, προσθήκη αλυσίδας K48, η οποία είναι η γνωστότερη και καλύτερα μελετημένη για τη δράση της, αποτελεί το σήμα για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στόχων στο πρωτεάσωμα. Την ίδια λειτουργία φαίνεται να εξυπηρετεί και η αλυσίδα K11, η οποία πιθανόν έχει παράλληλα ρυθμιστικό ρόλο σε μη πρωτεολυτικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαίρεση (23). Οι γνώσεις μας όσον αφορά τις αλυσίδες K6, K27, K29 και K33 είναι περιορισμένες και οι δράσεις τους παραμένουν αδιευκρίνιστες, ενώ έχει επιβεβαιωθεί η συμμετοχή της γραμμικής (M1) και K63 αλυσίδας σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (21).



Εικόνα 8: Οι λειτουργίες της ουβικιτινίωσης καθορίζονται από τον τύπο αλυσίδας ουβικιτίνης. Μετατροπή από Fulda.2012 (24).

1.2.5 Αποουβικιτινίωση

Η ουβικιτινίωση είναι μια δυναμική και αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία αναιρείται από εξειδικευμένα ένζυμα, τις αποουβικιτινάσες. Οι αποουβικιτινάσες έχουν τέσσερις κύριες δράσεις: 1) συμβάλουν στην ωρίμανση των πρόδρομων μορίων ουβικιτίνης, είτε διασπώντας τα πολυμερή σε μονομερή, είτε απομακρύνοντας την ουβικιτίνη από τη ριβοσωμική πρωτεΐνη στην οποία είναι προσδεμένη αρχικά, 2) αναστέλλουν την αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί ουβικιτινίωση, 3) μετατρέπουν τις αλυσίδες ουβικιτίνης από έναν τύπο σε διαφορετικό τροποποιώντας την επίδρασή τους στην πρωτεΐνη στόχο και τέλος 4) εξασφαλίζουν την ανακύκλωση των μορίων ουβικιτίνης (25) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Οι τέσσερις δράσεις των αποουβικιτινασών.

A: ωρίμανση των μορίων ουβικιτίνης, B: απομάκρυνση των μορίων ουβικιτίνης από την πρωτεΐνη υπόστρωμα, Γ: καθορισμός του τύπου αλυσίδας της ουβικιτίνης, Δ: ανακύκλωση μορίων ουβικιτίνης. Μετατροπή από Kubaichuk.2019 (22).

1.2.6 Οι αποουβικιτινάσες

Οι αποουβικιτινάσες οι οποίες μεσολαβούν την απομάκρυνση των μορίων ουβικιτίνης από τις πρωτεΐνες (26), καθορίζουν την τύχη των πρωτεϊνών και αυτό τις καθιστά ενδιαφέρον θεραπευτικό στόχο προς έρευνα.

Ο αριθμός των γνωστών αποουβικιτινινασών που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα πλησιάζει τις 100. Διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με τις δομικές και λειτουργικές τους ιδιότητες. Οι αποουβικιτινάσες των οικογενειών USPs (ubiquitin specific proteases), UCHs (ubiquitin-C terminal hydrolases), OTUs (otubain/ovarian tumor proteases) και MJDs (Machado–Joseph disease protein domain proteases) ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεασών κυστεΐνης και διαθέτουν παρόμοια καταλυτική τριάδα αμινοξέων (Cys,His,Asn/Asp). Οι αποουβικιτινάσες της οικογένειας JAMM (JAB1/MPN/MOV34 metalloproteases) είναι μεταλλοπρωτεάσες ψευδαργύρου (Zn^{2+}) (25).

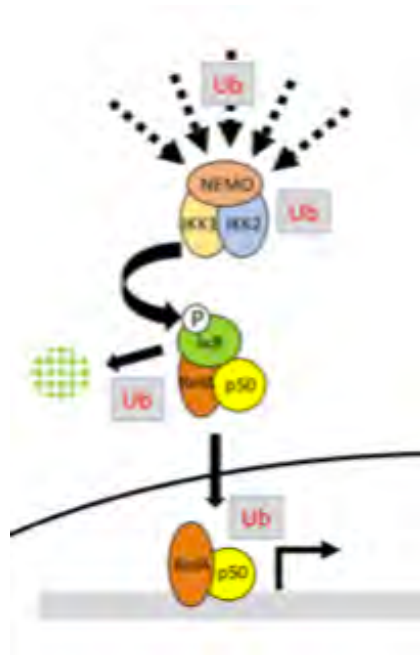
Εκτός από την ανακύκλωση των μορίων ουβικιτίνης, οι αποουβικιτινάσες έχουν εξέχοντα ρόλο και στη ρύθμιση άλλων κυτταρικών διαδικασιών οι οποίες ρυθμίζονται μέσω της ουβικιτινίωσης και περιλαμβάνουν την απόπτωση (27), το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (28), τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό μέσω ρύθμισης της μεταγραφής (29) και την κυτταρική σηματοδότηση (30). Ακόμα και οι ίδιες οι αποουβικιτινάσες υφίστανται ουβικιτινίωση με τρόπο που επηρεάζει τόσο τη δραστηριότητά τους όσο και την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες υποστρώματα (31), (32), (33).

Η ουβικιτινίωση συσχετίζεται με την εμφάνιση παθήσεων που περιλαμβάνουν: νευροεκφυλιστικές νόσους, μολυσματικές ιϊκές ασθένειες, παθήσεις του ανοσιακού συστήματος ακόμα και καρκίνο, με αποτέλεσμα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό να αποτελούν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο (34). Μέχρι στιγμής αναστολείς του πρωτεασώματος χρησιμοποιούνται με επιτυχία στην αντιμετώπιση κακοηθειών (35). Ωστόσο η ανάπτυξη αντίστασης εναντίον τους εγείρει την ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών στόχων. Οι αποουβικιτινάσες, θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν υποσχόμενο, εναλλακτικό στόχο, αν και, ενώ έχει σημειωθεί πρόοδος στην ανάπτυξη αναστολέων, φαίνεται οι αναστολείς αυτοί να στερούνται ειδικότητας στοχεύοντας ένα ευρύ φάσμα ενζύμων (36), (37).

1.2.7 Χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοπατιών ρυθμιζόμενων μέσω ουβικιτινίωσης

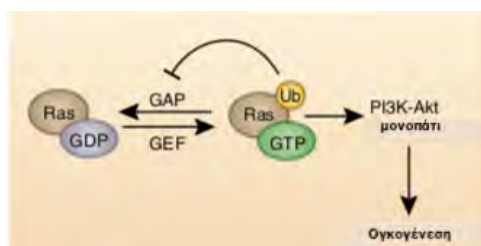
Χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοπατιών και πρωτεϊνών που ρυθμίζονται μέσω της ουβικιτινίωσης αποτελούν το μονοπάτι του NF-κB, η πρωτεΐνη με δράση GTPάσης Ras και οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors).

Η δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος εμπλέκεται στην ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, απόπτωσης (38), ανοσιακής απάντησης και φλεγμονής (39), βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό υπό τον έλεγχο του μονοπατιού της ουβικιτίνης (40). Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη NEMO, η οποία φωσφορυλιώνει τον αναστολέα του NF-κB, IκB, ενεργοποιείται μέσω ουβικιτινίωσης. Ο φωσφορυλιωμένος IκB ουβικιτινιώνεται επίσης, και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση απελευθερώνοντας τον NF-κB και επιτρέποντας τη μετακίνησή του στον πυρήνα όπου θα δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας (40) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η ρύθμιση του κανονικού μονοπατιού του NF-κB μέσω του συστήματος της ουβικιτίνης. Ανατύπωση από Courtois.2018 (40).

Στην περίπτωση της GTPάσης Ras, η ουβικιτινίωσή της παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τα ένζυμα GAP διατηρώντας την συνεχώς ενεργή (41) (Εικόνα 11).

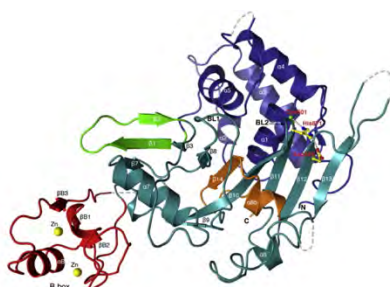


Εικόνα 11: Η ουβικιτινίωση της πρωτεΐνης Ras προκαλεί τη συνεχή ενεργοποίησή της. Μετατροπή από Porovic.2014 (34).

Τέλος, η ουβικιτινίωση ρυθμίζει την αποικοδόμηση των παραγόντων HIFα σε συνάρτηση με τα επίπεδα οξυγόνου, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια.

1.3 Η αποουβικιτινάση CYLD

Η αποουβικιτινάση CYLD ανήκει στην υποοικογένεια των USP αποουβικιτινινασών (Εικόνα 12). Η έκφρασή της κατά την εμβρυϊκή ζωή περιορίζεται στον εγκέφαλο, τους όρχεις και τους σκελετικούς μύες, ενώ στην ενήλικη ζωή εκφράζεται σε περισσότερους ιστούς στους οποίους περιλαμβάνονται ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η καρδιά, οι νεφροί, ο σπλήνας, οι ωοθήκες, οι πνεύμονες και τα λευκοκύτταρα (42). Το υπεύθυνο για την κωδικοποίησή της γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16q12-13 και έχει συσχετιστεί με την προδιάθεση ανάπτυξης οικογενούς κυλινδρωμάτωσης. Πρόκειται για μία κληρονομική νόσο η οποία εμφανίζεται συνήθως κατά τη διάρκεια της 2^{ης}-3^{ης} δεκαετίας της ζωής και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη πολλαπλών καλοηθών όγκων του δέρματος (κυλινδρώματα) σε τριχωτά μέρη του σώματος, κυρίως στο κρανίο. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 70% περίπου των περιπτώσεων οι ασθενείς είναι ετεροζυγώτες για το υπεύθυνο γονίδιο κατά τη γέννηση ενώ στα κυλινδρώματα παρατηρείται απώλεια της ετεροζυγωτίας (43).



Εικόνα 12: Η δομή της πρωτεΐνης CYLD. Ανατύπωση από Komander.2008 (44).

1.3.1 Δομή της CYLD

Η πρωτεΐνη CYLD αποτελείται από 956 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 107 kDa. Ως αποουβικιτινάση δρα έναντι γραμμικών αλυσίδων (M1) και αλυσίδων K63 (45). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 13 περιλαμβάνει: 1) τρεις επικράτειες που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με στοιχεία του κυτταροσκελετού (cytoskeletal-associated protein-glycine conserved CAP-Gly), οι οποίες εξυπηρετούν την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες όπως η απακετυλάση 6 των ιστονών (HDAC6) αλλά και ο ρυθμιστικός παράγοντας του NF-κB (NEMO) (46), (47), 2) δύο επικράτειες USP (ubiquitin specific protease) που φέρουν μια καταλυτική τριάδα αμινοξέων Cys, His, Asp (Cys-601, His-871, Asp-889) και είναι υπεύθυνες για τη δράση αποουβικιτινάσης (44), 3) μια επικράτεια μοτίβου B-box (zinc-finger-like B-box), χαρακτηριστική των TRIM (tripartite motif) πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των E3 λιγασών, η οποία είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια και καθορίζει τον υποκυτταρικό κυτταροπλασματικό εντοπισμό της CYLD (48) και τέλος, 4) δύο επικράτειες πλούσιες σε κατάλοιπα προλίνης (proline-rich domain) οι οποίες πιθανό να υποβοηθούν την αλληλεπίδραση της CYLD με επικράτειες SH3 (Src homology) που φέρουν άλλες πρωτεΐνες συμμετέχοντας σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης ή στη μεταφορά κυστιδίων (49).



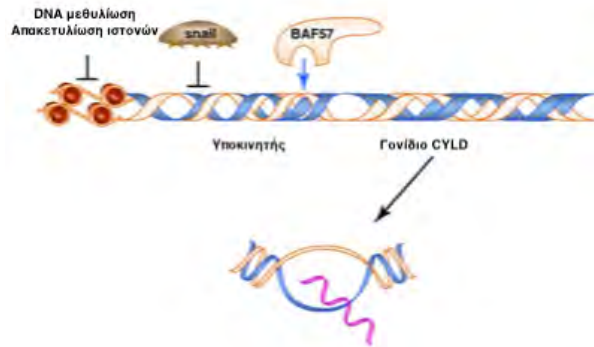
Εικόνα 13: Οι λειτουργικές επικράτειες της πρωτεΐνης CYLD. Μετατροπή από Massoumi.2009 (49).

1.3.2 Η ρύθμιση της CYLD

Τα επίπεδα έκφρασης της CYLD ρυθμίζονται στο στάδιο της μεταγραφής του γονιδίου της ενώ αποτελεί στόχο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που μεταβάλλουν τη λειτουργία της.

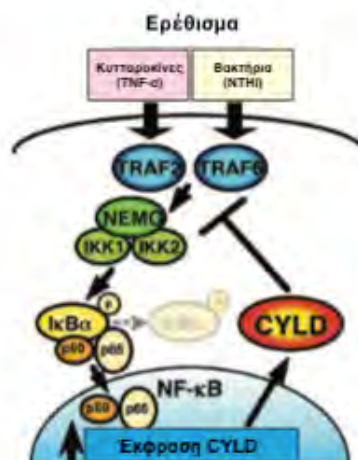
Αύξηση της έκφρασης της CYLD σε μεταγραφικό επίπεδο παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα BAF57 (BRG1 or

hBRM-associated factors) (50) (Εικόνα 14). Ο BAF57 είναι υπομονάδα του ανθρώπινου ανάλογου του SW1/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) πρωτεϊνικού συμπλόκου αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων, το οποίο στην περίπτωση της CYLD δρα επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της.



Εικόνα 14: Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της CYLD στο επίπεδο της μεταγραφής μέσω της δράσης μεταγραφικών παραγόντων ή επιγενετικών μηχανισμών. Μετατροπή από Massoumi.2009 (49).

Η μεταγραφή του γονιδίου της CYLD επάγεται και από τον παράγοντα NF-κB, ύστερα από ενεργοποίηση από εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α, η ιντερλευκίνη IL-1β και άτυπα στελέχη του αιμόφιλου της ινφλουένζα (NTHi) (51) (Εικόνα 15). Η επαγωγή της CYLD από τον NF-κB ρυθμίζεται μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης καθώς η CYLD δρα ως αναστολέας του μονοπατιού του NF-κB (51).



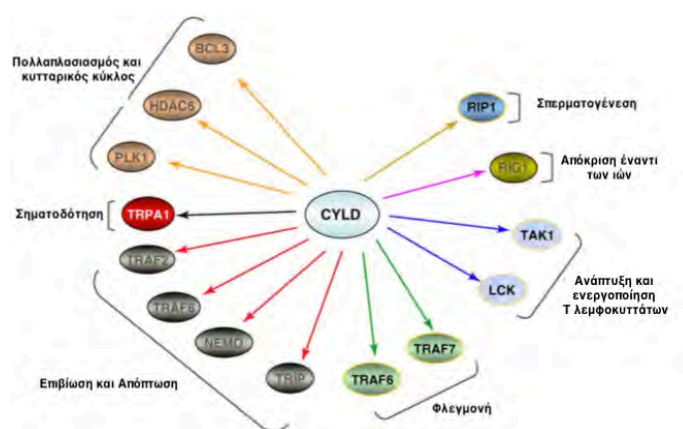
Εικόνα 15: Η CYLD αποτελεί γονίδιο στόχο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και δρα αναστέλλοντας το μονοπάτι του. Μετατροπή από Jono.2004 (51).

Αντιθέτως, μείωση της έκφρασης της CYLD επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης στον υποκινητή του γονιδίου κατασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο Snail1, του οποίου η έκφραση μεσολαβεί τη μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (epithelial-mesenchymal transition - EMT) διευκολύνοντας τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (49) (Εικόνα 14). Ακόμα σε καρκινικά κύτταρα η μεταγραφή του mRNA της CYLD καταστέλλεται ύστερα από μεθυλίωση του DNA (52) ή ακετυλίωση των ιστονών στον υποκινητή του γονιδίου της (53) (Εικόνα 14).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η φωσφορυλίωση του καταλοίπου σερίνης στη θέση 418 της CYLD από τις IKKα, IKKβ και IKKε κινάσες φαίνεται να οδηγεί στην απώλεια της δράσης αποουβικιτινάσης. Παρόμοια αποτελέσματα έχει και η σουμυλίωση της CYLD (54). Ακόμα η ουβικιτινίωση της CYLD με προσθήκη αλυσίδα K48 προκαλεί αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα. Υπεύθυνη για την τροποποίηση αυτή είναι η πρωτεΐνη E6 του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) η οποία δρα ως E3 λιγάση και μάλιστα η δραστηριότητά της ενισχύεται σε συνθήκες υποξίας (55).

1.3.3 Δράσεις της CYLD

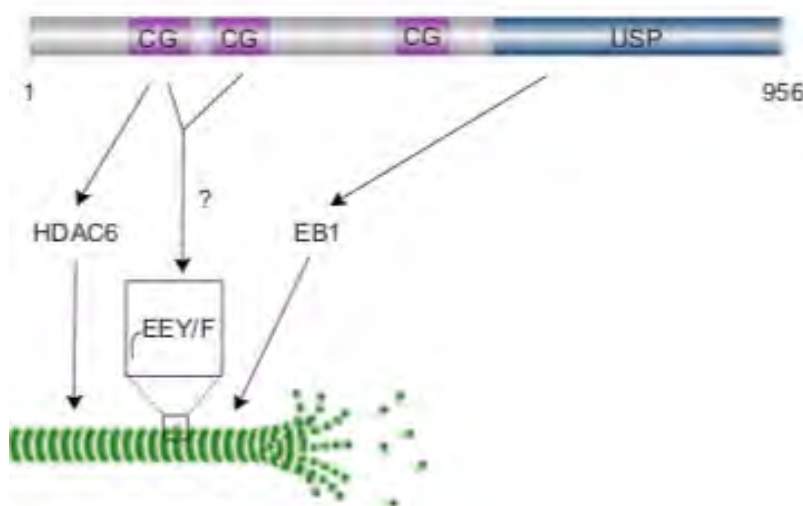
Οι δράσεις της CYLD επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στο οποίο περιλαμβάνονται φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες και παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 16). Ενδεικτικά θα αναφερθούν η επίδρασή της στη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων και της κυτταρικής μετακίνησης, του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θανάτου, της ανοσιακής απάντησης και φλεγμονής (μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού του NF-κB) και του καρκίνου.



Εικόνα 16: Η δράση της CYLD σε ποικίλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Μετατροπή από Massoumi.2009 (49).

1.3.3.1 Η επίδραση της CYLD στη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων και ο ρόλος της στην κυτταρική μετακίνηση

Η CYLD αλληλεπιδρά άμεσα με το καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης των μικροσωληνίσκων μέσω των Cap-Gly επικρατειών που φέρει στο αμινοτελικό της άκρο (56) (Εικόνα 17). Επιπλέον η αλληλεπίδραση της CYLD με τους μικροσωληνίσκους μπορεί να είναι και έμμεση μεσολαβούμενη από τη σύνδεση της με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στους μικροσωληνίσκους (microtubule binding proteins MBPs) όπως η EB1 και η HDAC6 (57). Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η ενίσχυση του πολυμερισμού, μέσω μείωσης της κρίσιμης συγκέντρωσης μορίων τουμπουλίνης που απαιτείται για το σχηματισμό μικροσωληνίσκων (56) και της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της αναστολής της δράσης της HDAC6, γεγονός που αυξάνει το επίπεδο της ακετυλιωμένης α-τουμπουλίνης (46).

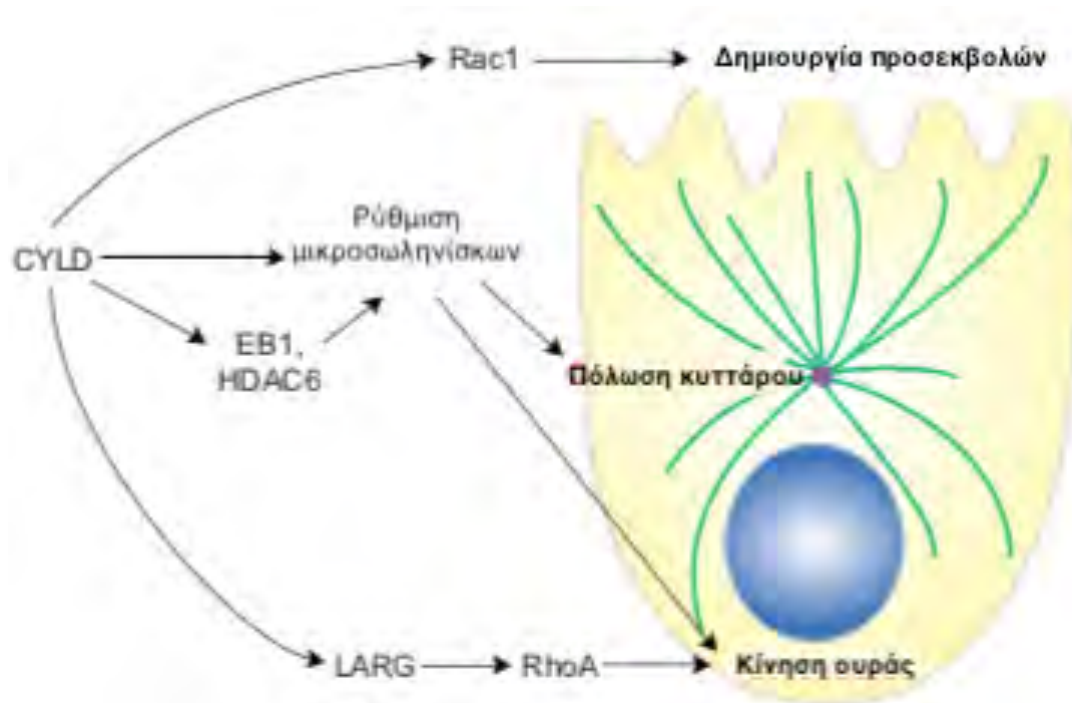


Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της CYLD και των μικροσωληνίσκων.

Οι επικράτειες CAP-GLY μεσολαβούν την αλληλεπίδραση με την HDAC και τα μόρια τουμπουλίνης μέσω του μοτίβου EEY/F, ενώ η επικράτεια USP συμμετέχει στη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη EB1. Μετατροπή από Yang.2016 (57).

Η CYLD επηρεάζει επίσης την κυτταρική μετανάστευση (Εικόνα 18). Η αποσιώπηση του γονιδίου της CYLD σε ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων έχει σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της κυτταρικής μετανάστευσης και την αναστολή της

αγγειογένεσης (58), καθώς η CYLD ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Rac1 και RhoA, υπεύθυνες αντίστοιχα για το σχηματισμό προσεκβολών στη μεμβράνη του προσθίου τμήματος του κυττάρου και για την κίνηση της ουράς στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου (58) (59).



Εικόνα 18: Η συμμετοχή της CYLD στην κυτταρική μετανάστευση.

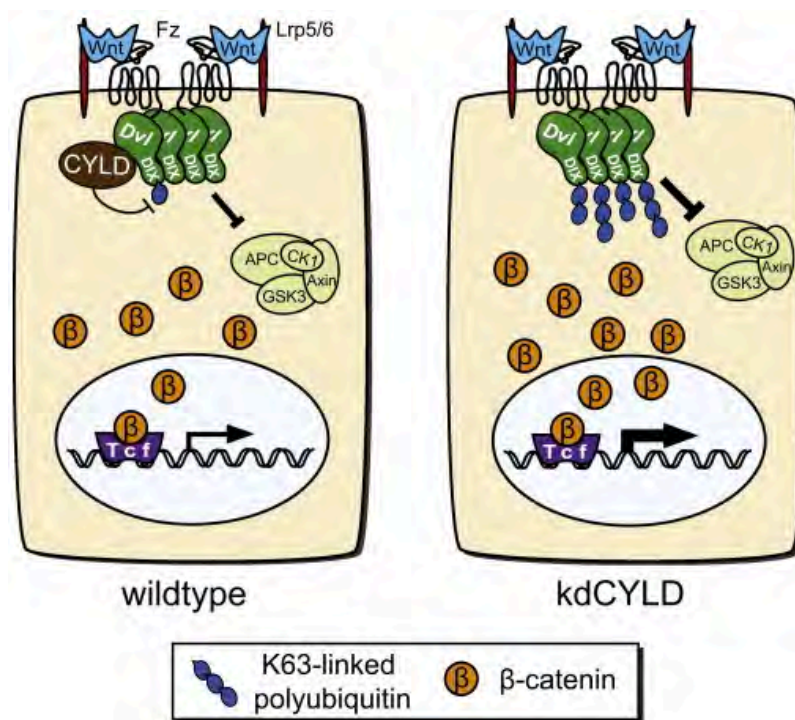
Ρυθμίζοντας τη δράση των μικροσωληνίσκων η CYLD καθορίζει την πόλωση του κυττάρου ενώ ενεργοποιώντας τη Rac1 και RhoA συμβάλλει στη δημιουργία προσεκβολών στο πρόσθιο τμήμα και την κίνηση της ουράς στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου, αντίστοιχα. Μετατροπή από Yang.2016 (57).

Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα έχει δείχθει ότι τόσο η καταστολή της ενδογενούς δράσης της CYLD όσο και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αναστέλλουν την κυτταρική μετακίνηση (57).

1.3.3.2 Ο ρόλος της CYLD στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και θάνατο

Η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού μεσολαβείται από τη δράση της CYLD στο μονοπάτι του Wnt/ β -catenin (Εικόνα 19). Η αποουβικιτινίωση της Dvl από τη CYLD ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι καταργώντας ή μειώνοντας τη μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό (60). Παρόμοια δράση έχει και η αποουβικιτινίωση της πρωτεΐνης Bcl3, η οποία δρα ως συνενεργοποιητικός

παράγοντας του NF-κB, εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση και μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση (49).



Εικόνα 19: Η δράση της CYLD στο μονοπάτι του Wnt/β-Catenin. Στα κύτταρα αγρίου τύπου μετά την πρόσδεση του Wnt στους υποδοχείς Fz και Lrp5/6 στρατολογείται η ουβικιτινωμένη πρωτεΐνη Dvl. Η αποουβικιτινίωσή της από τη CYLD καταστέλλει τη μεταγωγή του σήματος. Αντίθετα στα κύτταρα που λείπει η CYLD, η ουβικιτινίωση της Dvl εξυπηρετεί τη μεταγωγή σήματος και καταλήγει στην αύξηση των επιπέδων της μεταγραφικά ενεργής β-catenin. Ανατύπωση από Tauriello.2010 (60).

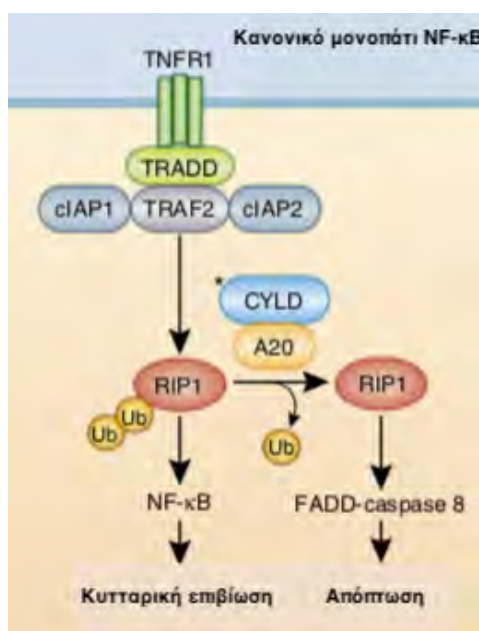
Τέλος η CYLD αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο, μειώνοντας την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κB και JNK από τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α αποουβικιτινιώνοντας την πρωτεΐνη TRAF2 (61) (62).

1.3.3.3 Η CYLD στο μονοπάτι του NF-κB

Ένας από τους βασικούς ρόλους της CYLD στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας είναι η συμμετοχή της στο μονοπάτι του NF-κB (Εικόνα 20).

Η CYLD λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού και αποουβικιτινιώνοντας τον παράγοντα NEMO καταστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κB (Εικόνα 15). Η ρύθμιση του μονοπατιού του NF-κB από την CYLD μεσολαβείται

και από άλλες, άμεσες ή έμμεσες, αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που προηγούνται στον καταρράκτη των αντιδράσεων και περιλαμβάνουν τα μόρια TRAF2, TRAF6, TRAF7, TAK1, RIP1, TRIP (63).



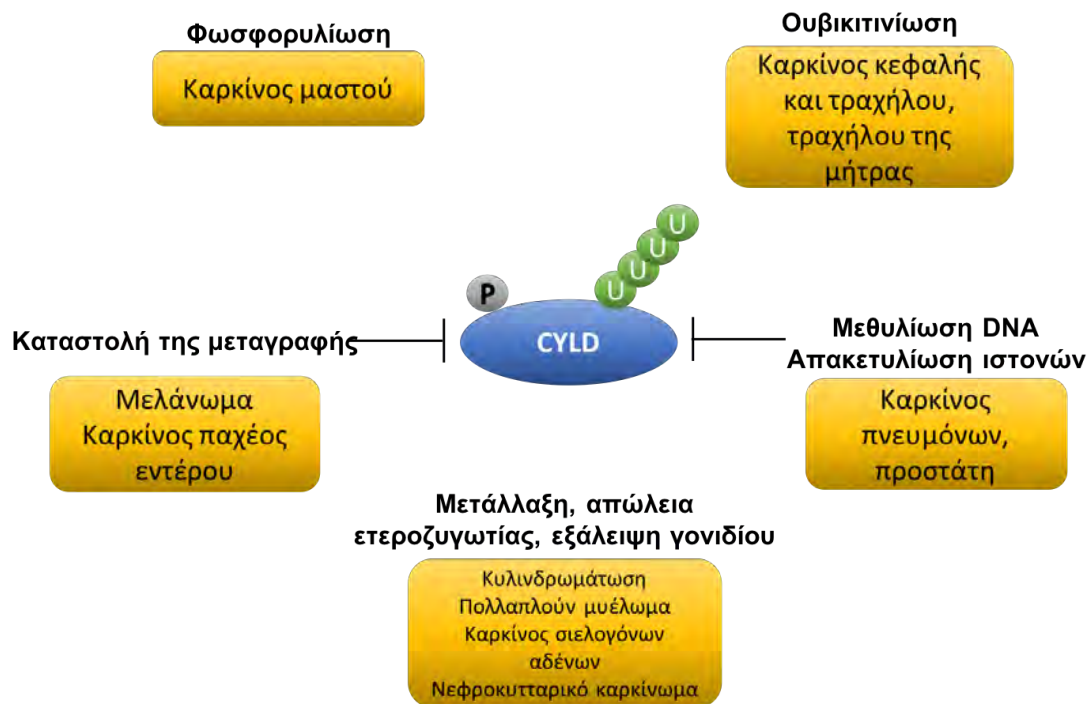
Εικόνα 20: Η ουβικιτινίωση της πρωτεΐνης RIP1 στο κανονικό μονοπάτι του NF-κΒ προάγει την κυτταρική επιβίωση ενώ η αποουβικιτινίωση την απόπτωση. Μετατροπή από Porovic.2014 (34).

Συνεπώς η απουσία του γονιδίου *CYLD* είναι υπεύθυνη για την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού και επαγωγή του παράγοντα NF-κΒ που στην περίπτωση των Β λεμφοκυττάρων προκαλεί υπεραντιδραστικότητα και υπερπλασία του λεμφικού ιστού με αποτέλεσμα την ανώμαλη λειτουργία των οργάνων του λεμφικού συστήματος (64), ενώ στην περίπτωση των Τ λεμφοκυττάρων προκαλεί από αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης γ (IFN-γ) έως και εκδήλωση συμπτωμάτων φλεγμονής του εντέρου με χαρακτηριστικά ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου εντέρου (ΙΦΝΕ) (65).

1.3.3.4 *CYLD* και καρκίνος

Η *CYLD* αναγνωρίστηκε αρχικά ως το υπεύθυνο μεταλλαγμένο γονίδιο για την ανάπτυξη οικογενούς κυλινδρωμάτωσης (familial cylindromatosis FC). Επιπλέον, μεταλλάξεις ή απώλεια της δράσης αποουβικιτινάσης της *CYLD* συμβάλλουν στην ανάπτυξη διαφορετικών τύπων καρκίνου (63) (Εικόνα 21). Πιο συγκεκριμένα η εξάλειψη του γονιδίου σχετίζεται με το σύνδρομο κυλινδρωμάτωσης, το πολλαπλόν

μυέλωμα (66), όγκους των σιελογόνων αδένων (67) και το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (68). Αντίστοιχα η καταστολή της μεταγραφής, που προκαλείται από την πρόσδεση στον υποκινητή του γονιδίου παραγόντων όπως SNAIL, HIC1, ZNF202 έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη μελανώματος (69) και καρκίνου του παχέος εντέρου (70), ενώ η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου που προκαλείται από μεθυλίωση του DNA και απακετυλίωση των ιστονών στον υποκινητή της CYLD σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου των πνευμόνων (71) και του προστάτη (72). Όσον αφορά τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις η φωσφορυλίωση της CYLD από την IKKε κινάση προκαλεί απώλεια της δράσης της και οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού αδρανοποιώντας την αποουβικιτινάση (73) (74). Επιπλέον, η ουβικιτινίωσή της με K48 αλυσίδα από την πρωτεΐνη E6 του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV έχει σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της CYLD στο πρωτεάσωμα και την εμφάνιση καρκίνων που σχετίζονται με τον HPV (55). Είναι ενδιαφέρον ότι η ουβικιτινίωση της CYLD από την E6 επάγεται σε συνθήκες υποξίας (55).



Εικόνα 21: Μεταλλάξεις και αλλαγές της έκφρασης του γονιδίου της CYLD σε διάφορους τύπους καρκίνου.

1.4 Η κυτταρική απόκριση στην υποξία

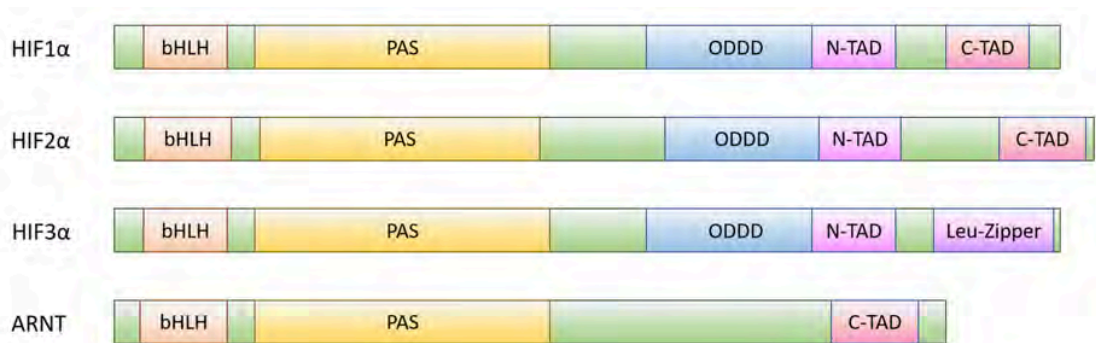
Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου και τις βιοχημικές διεργασίες παραγωγής ενέργειας. Η υποξία, που περιγράφεται ως μια κατάσταση στην

οποία ένας οργανισμός ή ένα κύτταρο στερείται οξυγόνου, συναντάται φυσιολογικά τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (75) όσο και στην ενήλικη ζωή (έντονη σωματική άσκηση). Ωστόσο υπάρχουν και αρκετές παθολογικές καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από συνθήκες υποξίας όπως η ισχαιμία των ιστών, η φλεγμονή και η καρκινογένεση (76). Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε χαμηλή συγκέντρωση O₂ ενεργοποιεί σύνθετους μηχανισμούς προσαρμογής που καταλήγουν στην έκφραση πολυάριθμων γονιδίων τα οποία επιφέρουν μεταξύ άλλων αλλαγές στην ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (77). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που συντονίζουν την κυτταρική απόκριση στην υποξία ονομάζονται επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF.

1.4.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF

1.4.1.1 Ισομορφές και δομικά χαρακτηριστικά

Οι HIF είναι ετεροδιμερείς παράγοντες αποτελούμενοι από μια α υπομονάδα, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση οξυγόνου, και μια β υπομονάδα, γνωστή επίσης και ως ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά (78) (Εικόνα 22). Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις διακριτές α υπομονάδες HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *HIF1A*, *EPAS1* και *HIF3A* αντίστοιχα και μία κοινή για όλα τα μέλη HIFβ υπομονάδα (79). Η έκφραση των ισομορφών ποικίλει ανάμεσα στους διάφορους ιστούς. Ο HIF-1α εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ οι HIF-2α και HIF-3α διατηρούν ιστοειδική έκφραση (80). Σε συνθήκες υποξίας η HIFα υπομονάδα αλληλεπιδρά με την HIFβ υπομονάδα και μετά τον ετεροδιμερισμό προκύπτουν οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF-1, HIF-2 και HIF-3 (81). Οι HIF-1, HIF-2 και ο συνενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας p300/CBP (Creb-binding protein), του οποίου η λειτουργία αναφέρεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στη συνέχεια, (82) αναγνωρίζουν στους υποκινητές των γονιδίων στόχων μια ειδική αλληλουχία DNA (5'-A/G CGTC -3') η οποία έχει ονομαστεί στοιχείο απόκρισης στην υποξία (HRE) (83). Ο παράγοντας HIF-3 είναι λιγότερο μελετημένος και τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της δράσης των HIF-1 και HIF-2 (84) (85).

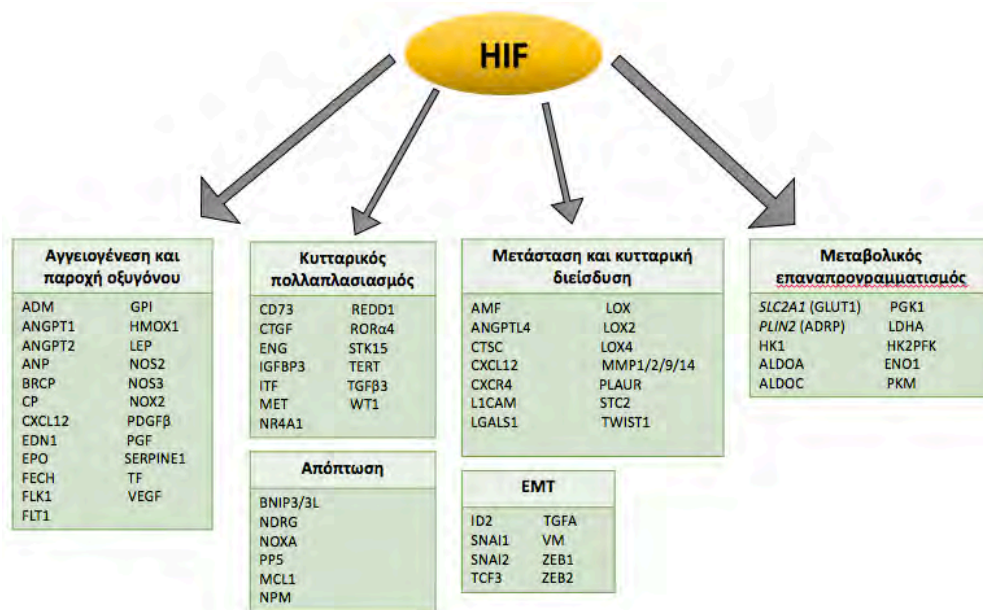


Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων HIF και των λειτουργικών επικρατειών τους. Ανατύπωση από Chee.2019 (86).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών με δομή βασικής έλικας-θηλιάς-έλικας bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim) (78) και διατηρούν σε μεγάλο βαθμό ομοιότητες ανάμεσα στις δομικές τους επικράτειες (87) (Εικόνα 22). Όλα τα μέλη φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο την επικράτεια bHLH η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των HIF στο DNA και δύο επικράτειες PAS (PAS-A και PAS-B) οι οποίες εξυπηρετούν τον ετεροδιμερισμό (88). Η εξαρτώμενη από το οξυγόνο επικράτεια αποικοδόμησης ODDD (oxygen dependent degradation domain) περιλαμβάνει αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης καθοριστικά για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών και ανευρίσκεται αποκλειστικά στις ισομορφές HIFα (89). Το καρβοξυτελικό άκρο των HIFα ισομορφών φέρει περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD (Trans-Activation-Domain) που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων των HIF. Οι HIF-1α και HIF-2α έχουν δύο περιοχές TAD, μία αμινοτελική N-TAD, η οποία βρίσκεται μέσα στην περιοχή ODDD, και μία καρβοξυτελική C-TAD (90). Η ισομορφή HIF-3α έχει μία N-TAD περιοχή (91) και ο ARNT μία περιοχή C-TAD. Οι TAD των HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν υψηλή απόκλιση αλληλουχίας επιτρέποντας έτσι εκλεκτικότητα ως προς την επιλογή των γονιδίων στόχων των δύο ισομορφών (92).

1.4.2 Γονίδια στόχοι των παραγόντων HIF

Οι παράγοντες HIF ρυθμίζουν γονίδια στόχους που μεσολαβούν ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Σε αυτά περιλαμβάνονται γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση λειτουργιών που σχετίζονται με την αγγειογένεση και παροχή οξυγόνου στους ιστούς, το μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, την κυτταρική επιβίωση και απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Γονίδια στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων HIF.

Πολλές μελέτες δείχνουν πως υπάρχουν τόσο κοινά όσο και διαφορετικά γονίδια στόχοι μεταξύ των ισομορφών HIF (93). Πιο συγκεκριμένα η μεταγραφή των γονιδίων *HK1*, *HK2*, *PFK*, *ALDOA*, *PGK1*, *LDHA* που κωδικοποιούν ένζυμα της γλυκολυτικής οδού ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον παράγοντα HIF-1 ενώ ο παράγοντας HIF-2 εμπλέκεται στη μεταγραφή των γονιδίων *EPO*, *POU5F1*, *TGFA*, *CCND1* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την ερυθροποίηση, την ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων και τον κυτταρικό κύκλο (94) (79). Στους κοινούς στόχους των HIF-1 και HIF-2 ανήκουν ενδεικτικά τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν το μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, την πρωτεΐνη ADRP (adipose differentiation-related protein), την ιντερλευκίνη-6 και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) (94).

1.4.3 Η ρύθμιση του παράγοντα HIF-1α

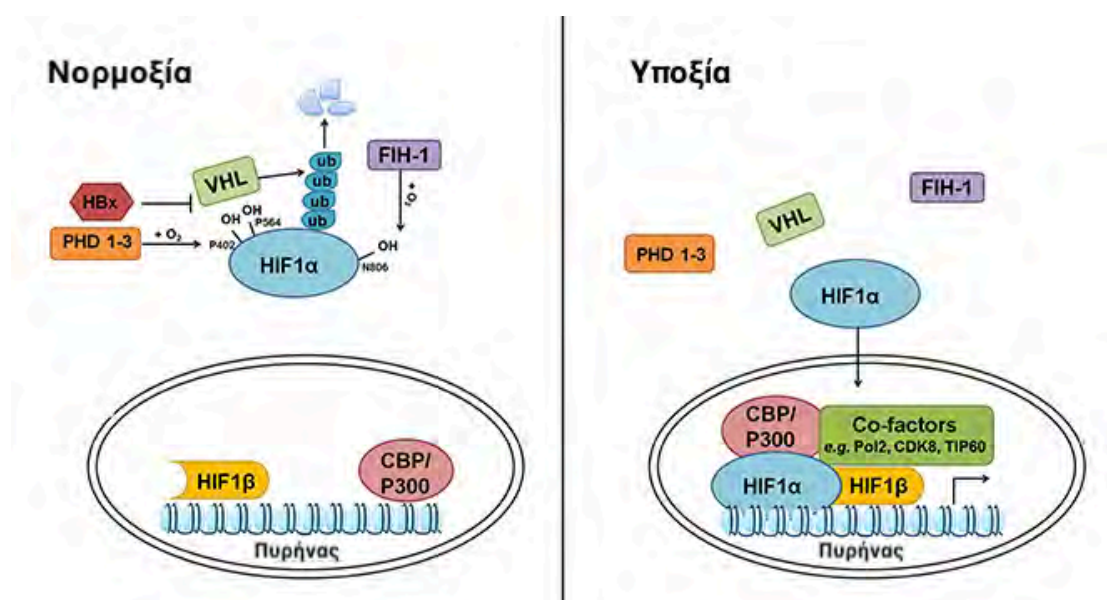
1.4.3.1 Η εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση

Ο παράγοντας HIF-1α είναι ιδιαίτερα ασταθής σε συνθήκες νορμοξίας (συγκέντρωση οξυγόνου 21%) διότι παρά τη συνεχή σύνθεσή του, τροποποιείται από το σύστημα της ουβικιτίνης και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα (Εικόνα 24). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της υδροξυλίωσης σε δύο κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 406 και 564 από ειδικές για τους HIF προλυλ-4 υδροξυλάσες γνωστές και ως PHD (prolyl hydroxylase domain) που λειτουργούν ως κυτταρικοί αισθητήρες οξυγόνου (95). Στη συνέχεια η E3

λιγάση Von Hippel Lindau (pVHL) αναγνωρίζει τα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα προλίνης και ουβικιτινώνει τον HIF-1α, οδηγώντας τον για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (96).

Ο μηχανισμός αυτός αναστέλλεται όταν το κύτταρο εκτεθεί σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 24). Σε αυτή την περίπτωση, η έλλειψη οξυγόνου αλλά, πιθανόν, και η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στα μιτοχόνδρια αναστέλλει τη δράση των υδροξυλασών. Επομένως ο HIF-1α σταθεροποιείται, διμερίζεται με τον παράγοντα HIF-1β και ενεργεί ως μεταγραφικός παράγοντας (97).

Επιπλέον σε συνθήκες νορμοξίας ο παράγοντας αναστολής του HIF (factor inhibiting HIF, FIH) υδροξυλιώνει τον HIF-1α στο κατάλοιπο ασπαραγίνης που βρίσκεται στη θέση 803 και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300/CBP μειώνοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (98) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Η ρύθμιση του παράγοντα HIF-1α από το οξυγόνο. Σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης P⁴⁰² και P⁵⁶⁴ από τις PHDs, ουβικιτινώνεται από την E3 λιγάση VHL και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Επιπλέον η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης N⁸⁰⁶ από τον FIH εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον p300/CBP. Η υποξία αναστέλλει τις PHDs και FIH, εμποδίζει την υδροξυλίωση του HIF-1α και επιτρέπει τη σταθεροποίηση και την μεταγραφική ενεργοποίησή του. Μετατροπή από Chen.2017 (99).

1.4.3.2 Η ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1

1.4.3.2.1 Ρύθμιση της σύνθεσης του HIF-1α

Η ανεξάρτητη από την υποξία ρύθμιση του HIF-1α μεσολαβείται από καταστάσεις όπως το μηχανικό στρες (100), χημικά και ορμονικά ερεθίσματα όπως η αγγειοτενσίνη II (101), ο λιποπολυσακχαρίτης LPS (102), αυξητικοί παράγοντες (103), η θρομβίνη (104), η γλυκόζη (105), ιντερλευκίνες (IL-1β, IL-6, IL-8) (106), ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) (104) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α (107). Οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών και επάγουν τη μεταγραφή ή/και τη μετάφραση του HIF-1α mRNA (97). Η μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α επάγεται ύστερα από ενεργοποίηση του NF-κB (107) (108).

Η πρόσδεση εξωτερικών σηματοδοτικών μορίων στα οποία περιλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες σε υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες ή υποδοχείς κινάσης τυροσίνης οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία συμμετέχουν στην σύνθεση του HIF-1α και περιλαμβάνουν τα μονοπάτια των PI3K και MAP κινασών. Επιπλέον, η αναστολή της δράσης του mTOR αναστέλλει τη μετάφραση του παράγοντα HIF-1α (109).

1.4.3.2.2 Ρύθμιση των επιπέδων και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α

1.4.3.2.2.1 Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

Η ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας και σταθερότητας του παράγοντα HIF-1α επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες όπως οι HSP90, RACK1, CITED2, IPAS, ARD1 και MgcRacGAP (97) (110).

HSP90/RACK1

Η πρωτεΐνη RACK1 αλληλεπιδρά με την ελογκίνη C, η οποία συμπεριλαμβάνεται στο σύμπλοκο E3 λγάσης του VHL, και επάγει την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα (111). Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP90 (heat shock protein90) δρα ως θετικός ρυθμιστής των επιπέδων και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Η HSP90 προσδέεται στην επικράτεια PAS-A του HIF-1α με τρόπο ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση οξυγόνου (112) και ανταγωνίζεται ισχυρά την πρωτεΐνη RACK1 για την ίδια θέση δέσμευσης (111). Τη θετική επίδραση της HSP90 στη ρύθμιση του HIF-1α επιβεβαιώνουν μελέτες, στις οποίες αναστολείς της HSP90 οδηγούν σε ανεξάρτητη από τον VHL καταστροφή του HIF-1α στο πρωτεάσωμα (111).

MgcRacGap

Αρνητική επίδραση στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 έχει η πρωτεΐνη MgcRacGap (male germ cell Rac GTPase Activating Protein) η οποία αποτελεί ρυθμιστή των Rho πρωτεϊνών που εμπλέκονται κυρίως στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (110). Η MgcRacGap προσδένεται στη PAS-B επικράτεια του HIF-1α εμποδίζοντας τον ετεροδιμερισμό με τον παράγοντα ARNT (113).

CITED2

Η πρωτεΐνη CITED2, η έκφραση της οποίας αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας, εμποδίζει την πρόσδεση του HIF-1α στην p300 και αναστέλλει τη μεταγραφική του δράση (114).

ARD1

Ως αρνητικός ρυθμιστής λειτουργεί και η ακετυλοτρανσφεράση ARD1, η οποία μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας. Η ARD1 καταλύει την ακετυλίωση του καταλοίπου λυσίνης στη θέση 532 της επικράτειας ODDD, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης HIF-pVHL και την επαγωγή της αποικοδόμησης του HIF-1α στο πρωτεάσωμα (115).

IPAS

Η πρωτεΐνη IPAS (inhibitory PAS domain), η οποία είναι ένα εναλλακτικό μετάγραφο του HIF-3α που στερείται TAD επικράτειας, συνδέεται μέσω της PAS επικράτειάς της με τον HIF-1α δημιουργώντας ετεροδιμερές, το οποίο αδυνατεί να προσδεθεί στο DNA. Έτσι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής καταστέλλοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-1α (116).

1.4.3.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Εκτός από την εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση O₂ υδροξυλίωση στην οποία υπόκειται το μόριο του HIF-1, υπάρχουν και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες ρυθμίζουν τη σταθερότητα, τη μεταγραφική δραστηριότητα και την υποκυτταρική εντόπιση του HIF. Σε αυτές περιλαμβάνονται: η ακετυλίωση, η s-νιτροξυλίωση, η φωσφορυλίωση και η σουμοϋλίωση.

Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση φαίνεται να ρυθμίζει τον HIF-1α τόσο θετικά όσο και αρνητικά ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο φέρει την τροποποίηση (117). Έτσι η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α αποσταθεροποιεί τον παράγοντα και εμποδίζει την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων. Η απακετυλίωση από την HDAC4 αντιστρέφει το αποτέλεσμα (117). Αντίθετα, η ακετυλίωση

καταλοίπων λυσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α από τον σχετιζόμενο με το σύμπλοκο p300/CBP παράγοντα PCAF (p300/CBP associated factor) ευνοεί την πρόσδεση του παράγοντα p300 ενισχύοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Σε συμφωνία με αυτό η κατάργηση της ακετυλίωσης από την SIRT1 (sirtuin1) καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του HIF-1 (118).

S-νιτροζυλίωση

Η S-νιτροζυλίωση είναι η οξειδοαναγωγική προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε σουλφυδρυλικές ομάδες και συναντάται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (119). Η S-νιτροζυλίωση στην ODDD επικράτεια (Cys⁵³³) αποτρέπει την αποικοδόμηση του HIF-1α σταθεροποιώντας τον παράγοντα με τρόπο ανεξάρτητο από τη δράση των προλυλ-υδροξυλασών (120).

Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση είναι η καλύτερα μελετημένη από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκειται ο HIF-1α. Θετική ρύθμιση προκαλεί η επαγόμενη από την υποξία φωσφορυλίωση στην επικράτεια C-TAD (Thr⁷⁹⁶) του HIF-1α, η οποία εμποδίζει την υδροξυλίωση από τον FIH αυξάνοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του παράγοντα (121). Όμοια αποτελέσματα έχει και η φωσφορυλίωση στην επικράτεια C-TAD από την κινάση ERK1/2 (122). Η τροποποίηση αυτή καλύπτει το σήμα πυρηνικής εξόδου του HIF-1α και αυξάνει τη συγκέντρωσή του στον πυρήνα και τη δραστηριότητά του (123). Σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω αναστολής της αποικοδόμησής του επιφέρει η φωσφορυλίωση από τις κινάσες ATM (ataxia telangiectasia mutated) (124), PKA (protein kinase A) (125) και CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) (126).

Αρνητική επίδραση στη ρύθμιση του HIF-1α έχει η φωσφορυλίωση από την κινάση της καζεΐνης I CK1δ (casein kinase1δ) η οποία εμποδίζει το διμερισμό με τον HIF-1β μειώνοντας την επαγωγή γονιδίων στόχων του HIF-1 (127). Αποσταθεροποίηση του HIF-1α και αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα προκαλεί η φωσφορυλίωση της ODDD επικράτειας από την κινάση συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK3). Η GSK3 ενεργοποιείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT σε μακροχρόνια υποξία (128) καθώς και ύστερα από φωσφορυλίωση από την κινάση PLK (polo like kinase) (129).

Σουμοϋλίωση

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της σουμοϋλίωσης του παράγοντα HIF-1α στη σταθερότητα και μεταγραφική του δραστηριότητα είναι αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τόσο την αύξηση της σταθερότητας και

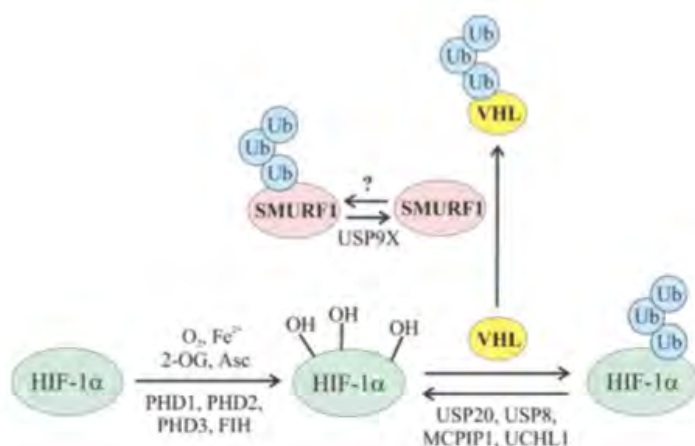
μεταγραφικής του δράσης (130) (131) όσο και την επαγωγή της αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα (132) (133) (134) (135).

1.4.3.2.3 Ρύθμιση του HIF-1α από το σύστημα της ουβικιτίνης

Η ουβικιτινίωση αποτελεί βασική μετα-μεταφραστική τροποποίηση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης των επιπέδων του HIF-1α, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 1.4.3.1, καθώς σηματοδοτεί την καταστροφή του παράγοντα στο πρωτεάσωμα. (22).

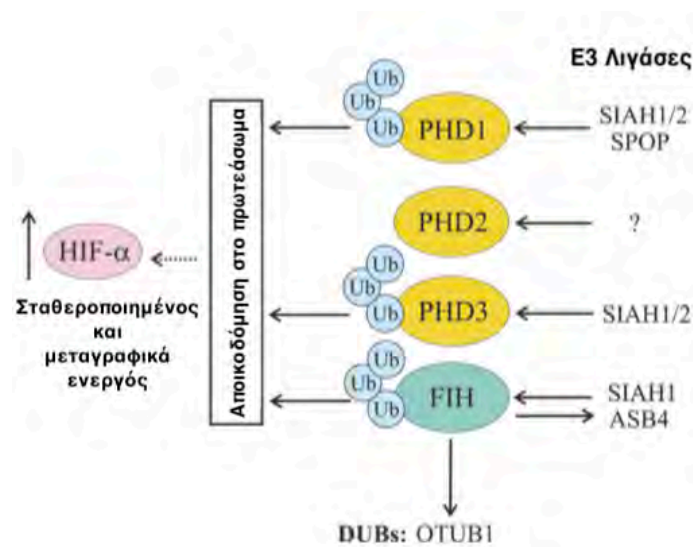
Ενώ η ουβικιτινίωση του HIF-1α από την E3 λιγάση pVHL είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 25), η κατάργηση της ουβικιτινίωσης του HIF-1α οδηγεί στη σταθεροποίηση του και την πυρηνική του μετακίνηση. Στις αποουβικιτινάσες που επιδρούν άμεσα στον HIF-1α συμπεριλαμβάνονται: η USP20 (136) η MCPIP1 που συναντάται κυρίως σε φλεγμονώδεις διεργασίες (137), η USP8 η οποία επιδρά και στη ρύθμιση του HIF-2α (138) και η UCHL1 (139).

Επιπλέον, η ρύθμιση των επιπέδων της pVHL επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α. Η pVHL αποτελεί στόχο της SMURF1 E3 λιγάσης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή της και τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Κατά αντιστοιχία η SMURF1 υπόκειται σε ρύθμιση μέσω ουβικιτινίωσης, από άγνωστη μέχρι στιγμής E3 λιγάση, και αποουβικιτινίωσης που μεσολαβείται από την USP9x (140).



Εικόνα 25: Η συμμετοχή των E3 λιγασών και αποουβικιτινινασών στην οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α. Ο υδροξυλιωμένος HIF-1α ουβικιτινιώνεται από την pVHL η οποία ρυθμίζεται μέσω ουβικιτινίωσης από τη SMURF1. Η αποουβικιτινίωση του HIF-1α επιτελείται από τις USP20, USP8, MCPIP1 και UCHL1. Ανατύπωση από Kubaichuk.2019 (22).

Ρύθμιση μέσω ουβικιτινίωσης υφίστανται και οι υδροξυλάσες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του HIF-1α (Εικόνα 26). Πιο συγκεκριμένα, οι PHD1/3 και FIH υδροξυλάσες ουβικιτινιώνονται από τις SIAH1/2 E3 λιγάσες, των οποίων η δράση αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας, κατάσταση που οδηγεί τελικά στην καταστροφή των υδροξυλασών μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος και στη σταθεροποίηση των HIFα (141) (142). Παρόμοιο ρόλο έχει και η E3 λιγάση SPOP η οποία υδροξυλιώνει την PHD1 και η απώλειά της έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη (143).



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των PHDs και του παράγοντα FIH από το μονοπάτι της ουβικιτίνης. Μετατροπή από Kubaichuk.2019 (22).

Εκτός από τη ρύθμιση των επιπέδων του HIF-1α που εξαρτάται από τη συγκέντρωση οξυγόνου, το μονοπάτι της ουβικιτίνης επηρεάζει του HIF-1α ασκώντας δράση και ανεξάρτητα από το οξυγόνο (22). Η ουβικιτινίωση από την E3 λιγάση TRAF6 προκαλεί τη σταθεροποίηση του HIF-1α (144), ενώ η E3 λιγάση Fbw7 στρατολογείται έπειτα από τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από την GSK3 κινάση και σηματοδοτεί την καταστροφή του στο πρωτεάσωμα (145).

1.4.4 Η επίδραση του HIF-1α σε κυτταρικές λειτουργίες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF ως κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία δρουν συντονισμένα και ενεργοποιούν τη μεταγραφή πολλών διακριτών γονιδίων που μεσολαβούν την προσαρμογή σε καταστάσεις που προκαλούν

συστηματική υποξία. Τέτοιες καταστάσεις είναι η οξεία απώλεια αίματος, η πνευμονία αλλά και το αυξημένο υψόμετρο, που οδηγούν σε μειωμένη κυτταρική συγκέντρωση οξυγόνου. Η υποξία επάγει την έκφραση των HIF οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην αύξηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων (146). Βασικότερο γονίδιο στόχος των HIF σε αυτή την κυτταρική διεργασία είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ερυθροποιητίνη, *EPO*, η οποία είναι υπεύθυνη για την επιβίωση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροκυττάρων (147).

Επιπλέον, προκειμένου να αντιμετωπιστεί τοπικά η αυξημένη ανάγκη οξυγόνωσης των ιστών οι HIF επάγουν την αγγειογένεση και την αναδιαμόρφωση των αγγείων ενεργοποιώντας γονίδια τα οποία κωδικοποιούν αγγειακούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF, PGF, PDGF αλλά και κυτταροκίνες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (148).

Στα πλαίσια της προσαρμοστικής ικανότητας των κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου ανήκει και ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού (149).

Βασικός μηχανισμός είναι η αλλαγή από τον οξειδωτικό στο γλυκολυτικό μεταβολισμό που επιτυγχάνεται με την επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της γλυκολυτικής οδού (111). Στα γονίδια στόχους του HIF-1 ανήκουν γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς γλυκόζης (*GLUT1* και *GLUT3*), γλυκολυτικά ένζυμα (*HK1/2*, *ENO1*, *PGK1* και *PKM2*) αλλά και πρωτεΐνες των οποίων η δράση μειώνει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και κατά συνέπεια την κατανάλωση οξυγόνου και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (*PDK1* και *BNIP3*) (150) (151).

Αλλαγή επέρχεται και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Σε συνθήκες υποξίας προκαλείται αύξηση της λιπογένεσης που επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής γονιδίων στόχων των παραγόντων HIF (*PPAR γ* , *FABP-3*, *FABP-4*, *FABP-7*, *LRP1* και *VLDLR*) που σχετίζονται με την πρόσληψη, σύνθεση και αποθήκευση λιπαρών οξέων (152). Ακόμη, ο HIF-1 ασκεί προστατευτική δράση έναντι της λιποτοξικότητας προωθώντας το σχηματισμό λιποσταγονιδίων μέσω της επαγωγής της έκφρασης των *AGPAT2* (acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 2) (153) και λιπίνης-1 (154).

1.4.5 Η επίδραση του HIF-1α σε παθολογικές καταστάσεις

Η επίδραση του HIF-1 στη ρύθμιση παθολογικών καταστάσεων καλύπτει ένα ευρύ φάσμα παθήσεων και μπορεί να είναι τόσο θετική όσο και αρνητική.

Ο HIF-1 ασκεί προστατευτική δράση έναντι της καρδιακής ανεπάρκειας (155), στεφανιαίας νόσου και περιφερικής αγγειοπάθειας (156) επάγοντας την έκφραση αγγειογόνων αυξητικών παραγόντων (VEGF, SGF-1, PGF) που συμβάλλουν στη αναδιαμόρφωση των αγγείων και τη νεοαγγειογένεση (156) και ενζύμων όπως CD39, CD73 που επάγουν την αγγειοδιαστολή (157).

Παρά την θετική ρύθμιση σε ορισμένες νόσους του καρδιαγγειακού, η δράση του HIF δύναται να συμβάλλει στην παθογένεση νόσων που περιλαμβάνουν την πνευμονική και συστηματική υπέρταση (96), την οικογενή ερυθροκυττάρωση (158), την αποφρακτική υπνική άπνοια (156) και τον καρκίνο (159).

1.4.5.1 Η επίδραση του HIF-1α στον καρκίνο

Σύμφωνα με αποτελέσματα βιοψιών που έχουν ληφθεί από πρωτοπαθείς συμπαγείς όγκους αλλά και μεταστάσεις, τα υψηλά επίπεδα του HIF-1α έχουν συσχετιστεί με αυξημένη θνητότητα και κακή πρόγνωση σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου που ενδεικτικά περιλαμβάνουν τον καρκίνο μαστού, παχέος εντέρου, ουροδόχου κύστεως, πνευμόνων, προστάτη, ωοθηκών κ.α (156). Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν παθολογικά αυξημένα επίπεδα πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ανώμαλη αγγείωση και ανάπτυξη υποξικών περιοχών (160).

Μεταλλάξεις γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση των παραγόντων HIF και καταλήγουν στην ενεργοποίηση και απορρύθμιση της λειτουργίας των έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Απώλεια της δράσης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών με κυριότερο εκπρόσωπο της κατηγορίας την πρωτεΐνη VHL, η μετάλλαξη του γονιδίου της οποίας εντοπίστηκε στα κύτταρα του νεφρικού καρκινώματος αλλά και του παρεγκεφαλιδικού αιμαγγειοβλαστώματος, αυξάνει τη σταθεροποίηση του HIFα (161). Επιπλέον, ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως για παράδειγμα το BCR-ABL στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία αυξάνει και πάλι τα επίπεδα του HIF-1α μέσω της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR (162).

Η δράση των ισομορφών HIF-1α και HIF-2α διαφοροποιείται ανάμεσα στους τύπους καρκίνου όπως διαφοροποιείται και στη φυσιολογική επαγωγή των γονιδίων στόχων (94). Χαρακτηριστικά, ενώ η έκφραση του HIF-1α στον καρκίνο του στομάχου σχετίζεται με κακή πρόγνωση (163), δεν ισχύει το ίδιο και για την έκφραση του HIF-2α (164). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανό να οφείλεται εκτός από τη ρύθμιση

διαφορετικών γονιδίων στόχων και στην αλληλεπίδραση της κάθε ισομορφής με διαφορετικά σύμπλοκα ογκογονικών ή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (94).

Τα καρκινικά κύτταρα που διατηρούν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων HIF είναι πιο ανθεκτικά και έχουν πλεονέκτημα επιβίωσης συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα αφού ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που καθορίζουν βασικές λειτουργίες στη βιολογία των καρκινικών κυττάρων. Μεταξύ των λειτουργιών αυτών διακρίνονται: η αγγειογένεση, η γενετική αστάθεια, η αποφυγή της ανοσιακής απάντησης, η κυτταρική διείσδυση και μετάσταση, η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπιδίων, η ρύθμιση του pH και η αντίσταση στην ακτινοθεραπεία (160) (165).

1.4.5.1.1 Η στόχευση του παράγοντα HIF-1 στη θεραπεία του καρκίνου

Ο παράγοντας HIF-1 λόγω της συμβολής του στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου αποτελεί ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Διάφορες χημικές ενώσεις και εγκεκριμένα φάρμακα έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην αναστολή του HIF-1 στοχεύοντας διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους περιλαμβάνονται: η έκφραση mRNA, η πρωτεϊνσύνθεση και η σταθεροποίηση του HIF-1α καθώς και ο ετεροδιμερισμός, η σύνδεση στο DNA και η μεταγραφική ικανότητα του HIF-1 (166). Παραδείγματα αναστολέων οι οποίοι βρίσκονται είτε στη φάση κλινικών δοκιμών είτε χορηγούνται ήδη σε ασθενείς είναι οι καρδιακές γλυκοσίδες όπως η διγοξίνη, οι αναστολείς τοποϊσομεράσης όπως η τοποτεκάνη και συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια όπως το EZN2968 που λειτουργούν ως αναστολείς της μετάφρασης του HIF-1α mRNA. Ακόμα, η μπορτεζομίμη, που ανήκει στους αναστολείς πρωτεασώματος, δρα μειώνοντας τη μεταγραφική ικανότητα του HIF-1 ενώ η ακριφλαβίνη προσδέεται στην PAS-B επικράτεια του HIF-1α και εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό με τη β υπομονάδα. Οι ανθρακυκλίνες, στις οποίες ανήκει η δοξορουμπικίνη, συνδέονται στο DNA, αποτρέπουν τη σύνδεση του HIF-1 και αναστέλλουν έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Κυτταρικές Σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινων νεφρικών εμβρυϊκών κυττάρων HEK293T και ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού HCC1937. Τα HEK293T είναι κύτταρα με υψηλή ικανότητα διαμόλυνσης τα οποία προκύπτουν από τη κυτταρική σειρά HEK293 στην οποία έχει εισαχθεί το γονίδιο για το ιικό αντιγόνο SV40-T (simian virus 40). Τα HCC1937 προέρχονται από πρωτοπαθές πορώδες αδenoκαρκίνωμα και απομονώθηκαν από θήλυ ασθενή 23 ετών σταδίου IIB κατά TNM και βαθμού 3. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα αγρίου τύπου (WT) και κύτταρα στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του γονιδίου της αποουβικιτινάσης CYLD (KO CYLD) με τη μέθοδο CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – CAS9 (CRISPR-associated protein 9), τα οποία αναπτύχθηκαν από την ομάδα της Επικ. Καθηγήτριας κ. Ε. Χατζηβασιλείου (τμήμα Ιατρικής Α.Π.Θ.).

2.1.2 Αντιδραστήρια

Η προμήθεια των υλικών και αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, έγινε όπως φαίνεται παρακάτω:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), ορός εμβρύου βοός (FBS), αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, διάλυμα 0,25% τρυψίνης-0,53mM EDTA: BIOSERA, Nuaille, France
- Tris-Base, κυανό της βρωμοφαινόλης, Triton X-100, PMSF, APS, λουμινόλη: Sigma-Adrich, St Louis, MO, USA
- SDS, DTT, γλυκίνη, Tween20, άγαρ, μεθανόλη: Applichem, Darmstadt, Germany
- Ισοπροπανόλη, αιθανόλη, TEMED: Merck, Darmstadt, Germany
- Ακρυλαμίδιο, Ponceau S: SERVA, Heidelberg, Germany
- Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης: Macherey-Nagel, Duren, Germany
- DMSO: Jena Bioscience, Germany
- MTS: Promega, Madison, WI, USA
- Bactotrypton, bacto-yeast extract: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ

- Πρωτεϊνικός μάρτυρας (Bluestar Prestained Protein Marker): Genetics, Dueren, Germany
- SYBR Green: KAPABIOSYSTEMS, Indianapolis, IN, USA
-

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ή σε Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) στο οποίο είχε προστεθεί ορός εμβρύου βοός 10% (fetal bovine serum FBS) και συνδυασμός αντιβιοτικών πενικιλίνη 100U/ml και στρεπτομυκίνη 100mg/ml. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας 5% CO₂.

Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου γινόταν κάθε 48-72 ώρες ενώ ανακαλλιέργεια όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας ή του πιάτου καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, αφαιρούνταν το θρεπτικό μέσο, ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline PBS) (Πίνακας 1), προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος 0,25% τρυψίνης-0,53mM EDTA και επώαση στον κλίβανο με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων. Ο έλεγχος της αποκόλλησης γινόταν με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου. Ακολουθούσε προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου, επαναιώρηση, τοποθέτηση του κατάλληλου αριθμού των κυττάρων σε φλάσκες ή τρυβλία κατάλληλου μεγέθους και μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο. Όλοι οι χειρισμοί γίνονταν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής κάτω από άσηπτες συνθήκες, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης.

PBS	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	8mM
KH ₂ PO ₄	1,46mM

Πίνακας 1: Σύσταση διαλύματος PBS.

2.2.2 Κατάψυξη κυττάρων

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων και την επαναιώρηση του κυτταρικού διαλύματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1 τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Κατόπιν αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και έγινε επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο στο οποίο έχει προστεθεί 10% v/v (όγκο κατ' όγκο) διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethyl sulfoxide DMSO). Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράστηκε σε μικροσωληνίσκους (cryovials) χωρητικότητας 1,5 ml και καταψύχθηκε σταδιακά αρχικά στους -80°C και στη συνέχεια σε δεξαμενή υγρού αζώτου.

2.2.3 Απόψυξη κυττάρων

Για την απόψυξη των κυττάρων τα φιαλίδια αποψύχθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C με συνεχή ανακίνηση. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε φλάσκες 75cm², στις οποίες έχει ήδη προστεθεί το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και ακολούθησε ανάμειξη και καλλιέργεια σε κλίβανο CO₂.

2.2.4 Κατεργασία κυττάρων σε συνθήκες υποξίας

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία κατάλληλου μεγέθους και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο ανανεώθηκε 2-16 ώρες πριν την έναρξη της επώασης σε συνθήκες υποξίας. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε ειδικό θάλαμο υποξίας (INVIVO2 200 workstation, Ruskinn Life Sciences) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂.

2.2.5 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Αρχικά έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και έκπλυση των κυττάρων με κρύο PBS. Ακολούθησε προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος λύσης (lysis buffer) (50 έως 120 μl ανάλογα με την επιφάνεια καλλιέργειας) (Πίνακας 2) και αποκόλληση των κυττάρων με τη χρήση ειδικής σπάτουλας (cell scraper).

Διάλυμα λύσης (lysis buffer)	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Tris-Cl pH 8.0	50mM
NaCl	150mM
MgCl ₂	2mM
Triton X-100	1%
PMSF	0,2mM

Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος λύσης (lysis buffer).

Το κυτταρικό λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5ml, αναδεύτηκε με τη χρήση μικροπιπέτας και επωάστηκε στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000rpm για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C ώστε να κατακρημνιστούν τα υπολείμματα των κυτταρικών μεμβρανών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο. Από το υπερκείμενο ποσότητα 5μl χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και στο υπόλοιπο προστέθηκε διάλυμα επιφόρτωσης (4X Laemmli Buffer) (Πίνακας 3) σε αναλογία 1:3 (τελική συγκέντρωση 1X). Τέλος τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4X Laemmli Buffer	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Tris-Cl pH 6.8	250mM
SDS	9,2%
Γλυκερόλη	40%
Κυανό της βρωμοφαινόλης	0,1%
DTT	100mM

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος επιφόρτωσης (Laemmli Buffer).

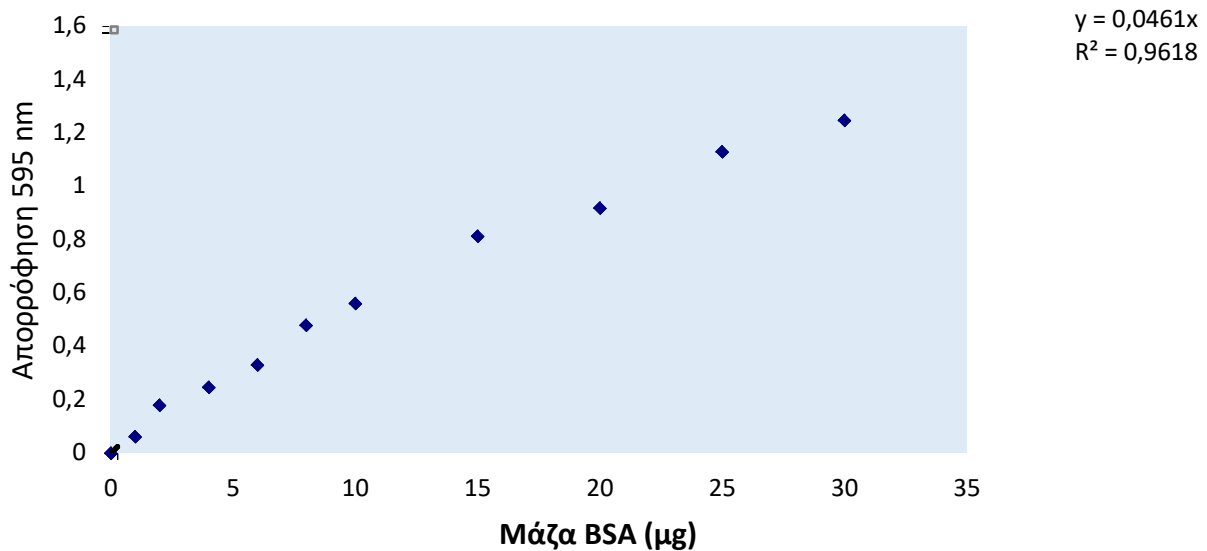
2.2.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 δημιουργεί σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μέγιστου

απορρόφησής της από 465nm σε 595nm. Η απορρόφηση στα 595nm είναι ανάλογη της ποσότητας των πρωτεϊνών στο δείγμα.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 2μl πρωτεϊνικού δείγματος, 800μl απιονισμένου νερού και 200μl αντιδραστηρίου Biorad και ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού φάσματος (UV-VIS), (U-2900 Hitachi), στα 595nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο προστέθηκαν μόνο 800μl απιονισμένου νερού και 200μl αντιδραστηρίου Biorad.

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του κάθε δείγματος έγινε βάσει της πρότυπης καμπύλης αναφοράς αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin-BSA) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αλβουμίνης (BSA).

2.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών είναι η κίνηση μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ο ρυθμός με τον οποίο κινούνται οι πρωτεΐνες (σε μονάδες $\text{cm}^2 / \text{Vsec}$) εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά του συστήματος ηλεκτροφόρησης και των πρωτεϊνών. Αυτά περιλαμβάνουν την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, τη θερμοκρασία του συστήματος, το pH, τον τύπο του ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο των πρωτεϊνών (167).

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου η πηκτή χρησιμεύει ως ηθμός επιλογής με βάση το μέγεθος των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Καθώς

οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου, η δομή των πόρων της πηκτής επιτρέπει τη μεταφορά των μικρότερων σε μέγεθος πρωτεϊνών ταχύτερα. Το μέγεθος πρωτεϊνών που είναι δυνατόν να διαχωριστούν κυμαίνεται από 5-250kD (167).

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis) γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS) το οποίο δεσμεύεται μη ομοιοπολικά στην εξωτερική επιφάνεια των πρωτεϊνών κατά τρόπο που προσδίδει συνολικά αρνητικό φορτίο και επίμηκες σχήμα καταργώντας την πολύπλοκη τριτοταγή τους δομή. Επιπλέον προσδίδει σε όλες τις πρωτεΐνες παρόμοια αναλογία φορτίου προς μάζα δεδομένου ότι δεσμεύεται 1,4 g SDS ανά 1 g πρωτεΐνης (μία στοιχειομετρία περίπου ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα). Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός μεταφοράς της δεσμευμένης πλέον με SDS πρωτεΐνης μέσα στην πηκτή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και κατ' επέκταση από το μοριακό βάρος (167).

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης με τη δις-ακρυλαμίδη σχηματίζοντας έτσι ένα δίκτυο πολυακρυλαμίδης. Ο πολυμερισμός αρχίζει με το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) που αποτελεί οξειδωτικό παράγοντα και πηγή ελευθέρων ριζών και η αντίδραση καταλύεται από το τετραμέθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED) το οποίο ενισχύει την παραγωγή των ριζών από το APS (167).

Για την ασυνεχή ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι απαραίτητη η παρασκευή δύο πηκτών ακρυλαμιδίου: της πηκτής διαχωρισμού (separating gel) (Πίνακας 4) και της πηκτής επιστοιβάξης (stacking gel) (Πίνακας 5). Η πηκτή διαχωρισμού είναι υπεύθυνη για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος ενώ η πηκτή επιστοιβάξης που έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων συγκεντρώνει τα πρωτεϊνικά δείγματα σε μια στενή περιοχή ανάμεσα στα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος (Cl⁻, Gly⁻). Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές είναι αυτή που καθορίζει το μέγεθος των πόρων που θα δημιουργηθούν: μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου συνεπάγεται μικρότερο μέγεθος πόρων και αντίστροφα.

Πηκτή διαχωρισμού (separating gel) 10%		
<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Ποσότητες</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Ακρυλαμίδιο 40%	2,5ml	10%
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	2,5ml	25%
SDS 10%	100μl	1%
H ₂ O	4,52ml	45,2%
APS 10%	40μl	0,4%
TEMED	40μl	4%

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού (10ml).

Πηκτή επιστοιβαξής (stacking gel) 4%		
<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Ποσότητες</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Ακρυλαμίδιο 40%	1ml	4%
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	2,5ml	25%
SDS 10%	100μl	1%
H ₂ O	6,33ml	63,3%
APS 10%	62,5μl	6,52%
TEMED	62,5μl	0,625%

Πίνακας 5: Σύσταση πηκτής επιστοιβαξής (10ml).

Σε ειδική διάταξη που αποτελούνταν από δύο εφαπτόμενα μεταξύ τους λεπτά τζάμια διαστάσεων τοποθετήθηκε αρχικά η πηκτή διαχωρισμού και εφόσον ήταν σταθερή προστέθηκε το διάλυμα της πηκτής επιστοιβαξής. Αμέσως μετά την τοποθέτηση και πριν ακόμα σταθεροποιηθεί η πηκτή επιστοιβαξής εφαρμόστηκε μέσα σε αυτή μια ειδική οδοντωτή μήτρα η οποία δημιούργησε τα φρεάτια που δέχτηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Η συνολική πλέον διάταξη που περιλάμβανε την πηκτή πολυακρυλαμίδιου μέσα στις πλάκες τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (Πίνακας 6). Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Biorad (Εικόνα 28).

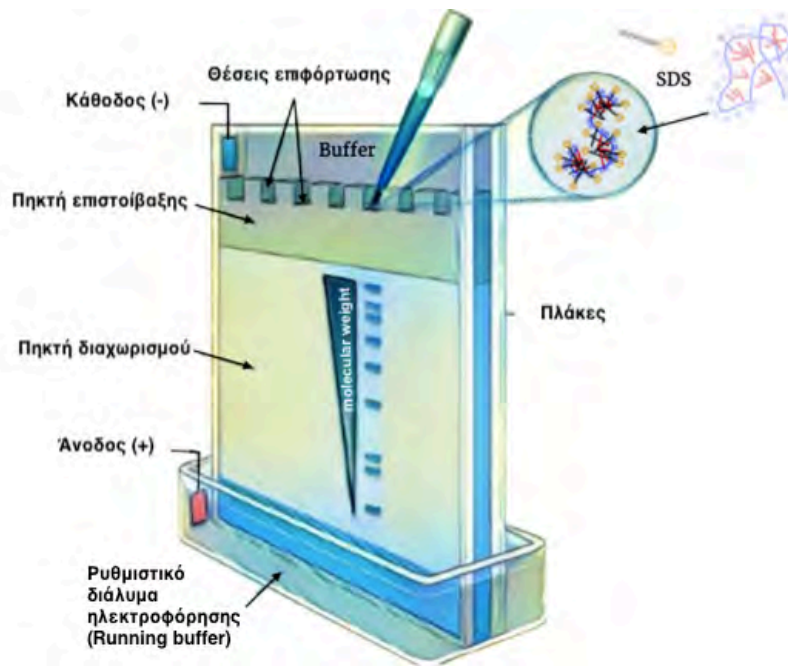
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer)	
pH ~ 8,3	
Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris Base	25mM
Γλυκίνη	190mM
SDS	0,1%

Πίνακας 6: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer).

Η φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων και του μάρτυρα (πρωτεϊνικό δείγμα γνωστών μοριακών βαρών) έγινε με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton αφού πρώτα υποβλήθηκαν σε σύντομη διαδικασία βρασμού στους 95°C για 3-5 λ επτά και φυγοκεντρήθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα (shortspin) στις 10000 rpm. Τέλος η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε σε τροφοδοτικό μηχανήμα και εφαρμόστηκε σταθερή τάση 120V για περίπου 1 ώρα ή έως ότου η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης έφτασε στο κατώτερο άκρο της πηκτής (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης Bio-rad. Ανατύπωση από: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1658100.pdf



Εικόνα 29: Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Ανατύπωση από: “Protein Gel Analysis”, <https://www.creative-proteomics.com/services/protein-gel-and-imaging-analysis.htm>

2.2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και έπειτα την ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη χρήση αρχικά ειδικού για την κάθε πρωτεΐνη πρώτου αντισώματος και στη συνέχεια μη ειδικού για το πρώτο δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είναι η συχνότερη επιλογή καθώς χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη μη-ειδική πρόσδεση αντισωμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες της μίας ανοσοανιχνεύσεις, αφού ξηραθεί και αποθηκευτεί (167).

2.2.9 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη βασίζεται στην αρχή της μετακίνησης των πρωτεϊνών μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο όπως και η ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία γίνεται σε υγρό περιβάλλον διαλύματος μεταφοράς (Transfer Buffer) (Πίνακας 7).

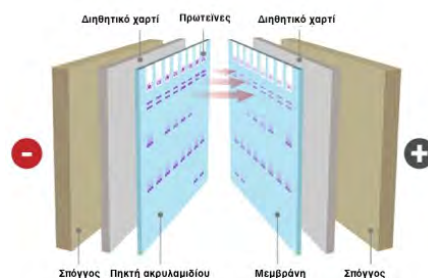
Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Tris Base	25mM
Γλυκίνη	190mM
SDS	0,1%
Μεθανόλη	20%

Πίνακας 7: Σύσταση διαλύματος μεταφοράς (Transfer Buffer)

Συγκεκριμένα, αρχικά εμποτίστηκαν όλα τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και η διάταξη που εφαρμόστηκε ήταν η εξής: σε ειδική θήκη τοποθετήθηκε αρχικά σπόγγος, τρία διηθητικά χαρτιά στο μέγεθος της πηκτής, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τρία ακόμα διηθητικά χαρτιά στο ίδιο μέγεθος και σπόγγος (Εικόνα 30). Η τοποθέτηση των επιμέρους προαναφερθέντων υλικών έγινε με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η παγίδευση τυχόν φυσαλίδων η οποία θα παρεμπόδιζε την ομαλή ροή του ηλεκτρικού ρεύματος.

Η θήκη τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή και προστέθηκε το διάλυμα μεταφοράς. Κατά τη μεταφορά εφαρμόστηκε συνεχής ανάδευση σε ψυχόμενες συνθήκες. Τέλος η συσκευή συνδέθηκε σε τροφοδοτικό μηχάνημα και εφαρμόστηκε σταθερή τάση 100V για 1 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας η μεταφορά των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με τη χρώση της μεμβράνης με διάλυμα χρωστικής Ponceau S, η οποία βάφει αντιστρεπτά τις ζώνες των πρωτεϊνών με κόκκινο χρώμα. Ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης με απιονισμένο νερό και φωτογράφιση της μεμβράνης. Η χρωστική απομακρύνθηκε ύστερα από έκπλυση με διάλυμα 1X PBS-0,1% Tween20.



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανατύπωση από: “Western Blotting Transfer Products”, <https://www.bosterbio.com/products/western-blot-reagents/protein-transfer.html>

2.2.10 Ανοσοανίχνευση

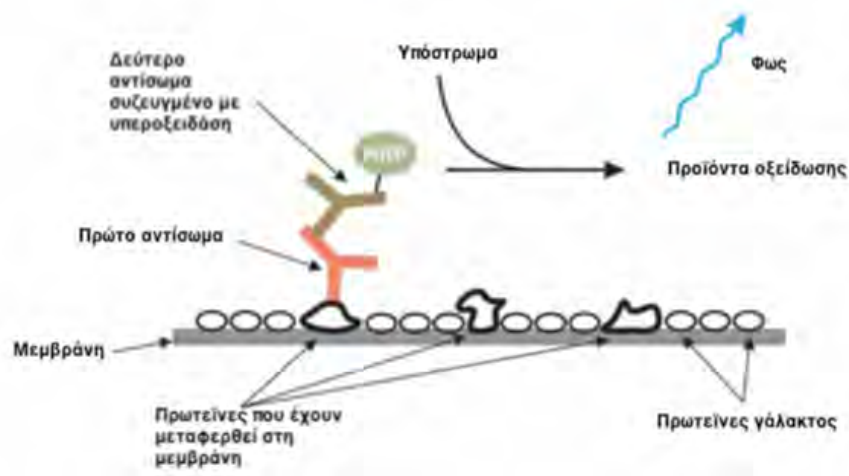
Η ανίχνευση των πρωτεϊνών βασίζεται στην ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους. Αρχικά η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα κορεσμού -blocking solution PBS-0,1% Tween20-5% γάλα και ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την πρωτεΐνη στόχο, για 18-20 ώρες στους 4°C ή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (Πίνακας 8). Κατόπιν έγινε συλλογή του διαλύματος του πρώτου αντισώματος και η μεμβράνη ξεπλύθηκε με διάλυμα 1X PBS-0,1% Tween20 τρεις φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο, και συγκεκριμένα την Fc σταθερή περιοχή του, η οποία είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου από το οποίο παρασκευάστηκε το αντίσωμα (Πίνακας 8). Τέλος η μεμβράνη ξεπλύθηκε και πάλι με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

1^ο αντίσωμα	Αραίωση
Anti-HIF-1α (Lyberopoulou A et al.)	1:2000 (PBS-0,1% Tween20-5% γάλα)
Anti-Cyld (E-4: sc 74434)	1:200 (PBS-0,1% Tween20-5% γάλα)
Anti-Tubulin (Cell Signaling Biotechnology)	1:10000 (PBS-0,1% Tween20-1% BSA)
2^ο αντίσωμα	Αραίωση
Anti-rabbit IgG, HRP	1:5000 (PBS-0,1% Tween20-5% γάλα)
Anti-mouse IgG, HRP	1:3000 (PBS-0,1% Tween20-5% γάλα)

Πίνακας 8: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση Western.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Εικόνα 31). Η υπεροξειδάση (που είναι συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα) παρουσία υπεροξειδίου προκαλεί οξείδωση της λουμινόλης και εκπομπή φωτονίων στις θέσεις της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που καταλαμβάνει το δεύτερο αντίσωμα. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε με το αντιδραστήριο λουμινόλης (Luminata, MILLIPORE) για 3 λεπτά και ακολούθησε εμφάνιση στη συσκευή Unitec

Cambridge Chemiluminescence Imaging System. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Alliance Software (έκδοση 16.06).

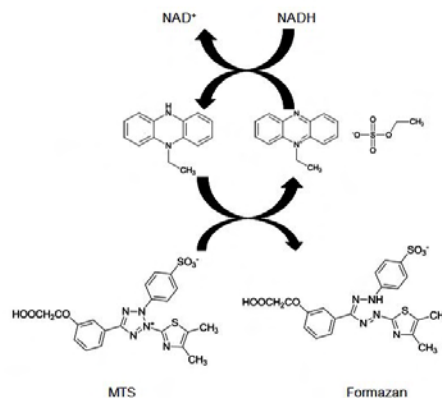


Εικόνα 31: Αναπαράσταση της ανοσοανίχνευσης με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Ανατύπωση από: <https://advansta.com/western-blot-detection-method-use/>

2.2.11 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού / επιβίωσης με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS

Η χρωματομετρική μέθοδος MTS (MTS colorimetric assay) βασίζεται στην οξείδωση των αλάτων τετραζολίου, MTS (3-(4,5-διμεθυλθιαζολ-2-υλ)- 5-(3-καρβοξυμεθοξυφαινυλ)- 2-(4- σουλφοφαινυλ)- 2H-τετραζολίου) σε παράγωγα φορμαζάνης (Εικόνα 32), στα μιτοχόνδρια και επομένως είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Η αντίδραση γίνεται εμφανής από τη μετατροπή του κίτρινου χρώματος του MTS σε μωβ το οποίο απορροφά στα 490nm (168).



Εικόνα 32: Αντίδραση μετατροπής MTS σε φορμαζάνη. Ανατύπωση από: <https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/BVN/K300.pdf>

Κατά την πειραματική διαδικασία, σε πιάτο 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 5000 κύτταρα σε 100μl κατάλληλου πλήρους θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε επώαση στον κλίβανο CO₂, στους 37°C για 24 ώρες και αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και εκ νέου προσθήκη θρεπτικού (100μl) μαζί με 20μl MTS/θέση. Τα δείγματα επώαστηκαν στον κλίβανο για 2 ώρες και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε φωτόμετρο ELISA plate reader (ELx800 BIO-TEK) στα 490nm.

2.2.12 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων E.Coli Top10 με πλασμιδιακό DNA έγινε με τη μέθοδο CaCl₂. Ο ακριβής μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η μέθοδος δεν είναι γνωστός όμως είναι πιθανό τα ιόντα ασβεστίου να λειτουργούν ως κατιονική γέφυρα που συνδέει το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική επιφάνεια. Εφόσον έχουν έρθει σε επαφή το DNA θα εισέλθει στο κύτταρο στη συνέχεια με την εφαρμογή θερμικού σοκ (169). Σε 100μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (PGL3-HRE), τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο και έπειτα μεταφέρθηκαν για 1 λεπτό στους 42°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500μl υγρού θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertani) (Πίνακας 9) και ύστερα από επώαση για 45 λεπτά στους 37°C έγινε επίστρωση των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό (LB Agar) (Πίνακας 10) και αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη). Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C προς ανάπτυξη αποικιών.

LB	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Bactotryptone	1%
Bacto-yeast extract	0,5%
NaCl	0,5%

Πίνακας 9: Σύσταση θρεπτικού υλικού LB.

LB Agar	
<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Συγκέντρωση</u>
Bactotryptone	1%
Bacto-yeast extract	0,5%
NaCl	0,5%
Agar	2%

Πίνακας 10: Σύσταση θρεπτικού υλικού LB Agar.

2.2.13 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini-preparation)

Η μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Nucleospin-Plasmid (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων Top10 εμβολιάστηκαν σε 5ml θρεπτικού μέσου (LB Agar) παρουσία αντιβιοτικού (αμπικιλίνη) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 170rpm.

Την επομένη μέρα έγινε συλλογή 3ml από κάθε καλλιέργεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13500rpm για 30sec και αφαίρεση του υπερκειμένου. Ακολούθησε επαναιώρηση του ιζήματος σε 250μl διαλύματος επαναιώρησης (A1), προσθήκη 250μl διαλύματος λύσης (A2) και ήπια ανακίνηση 6-8 φορές. Τα δείγματα επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 300μl διαλύματος εξουδετέρωσης (A3) και φυγοκεντρήθηκαν στις 13500rpm για 5 λεπτά.

Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρήθηκε στις 13500rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500μl διαλύματος πλύσης (AW) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13500rpm για 1 λεπτό. Έπειτα έγινε πλύση της στήλης και έκλουση του πλασμιδιακού DNA σε 50μl διαλύματος έκλουσης (AE) (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) και αποθήκευση στους -20°C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm με τη χρήση Nanodrop2000 (Thermo Scientific) .

2.2.14 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Η διαμόλυνση αφορά την εισαγωγή ξένου DNA σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο διαμόλυνσης πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Το PEI είναι ένα σταθερό κατιονικό πολυμερές το οποίο συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια και διευκολύνει τη δέσμευση τους πάνω στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική επιφάνεια. Το σύμπλοκο DNA-PEI ενδοκυτταρώνεται και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα.

Κύτταρα HEK293T WT και κύτταρα HEK293T KO CYLD επιστρώθηκαν σε πιάτα 24 θέσεων ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης κάλυπταν το 60-80% της επιφάνειας καλλιέργειας. Παρασκευάστηκε το μείγμα διαμόλυνσης το οποίο αποτελούνταν από 1μg από το πλασμίδιο PGL3-HRE το οποίο φέρει 5 αλληλουχίες HRE στον υποκινητή του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράση της πυγολαμπίδας, 0,05μg του πλασμιδίου αναφοράς λουσιφεράση Renilla, 50μl θρεπτικού υλικού χωρίς FBS και αντιβιοτικό και 2μl αντιδραστηρίου PEI για κάθε θέση. Ακολούθησε σύντομη περιδίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προστέθηκαν 160μl θρεπτικού μέσου με 5% FBS και έγινε έντονη ανάδευση. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό (DMEM , 10%FBS , αντιβιοτικά). Έγινε επώαση στους 37°C για 2 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 18 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂).

2.2.15 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας με τη χρήση του γονιδίου της λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς (Luciferase assay)

Η δράση του ενζύμου της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται ως μέτρο ένδειξης της ενεργότητας του υποκινητή, ο οποίος προηγείται του γονιδίου αναφοράς που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση οξειδωσης της λουσιφερίνης η οποία καταλύεται από το ένζυμο της λουσιφεράσης παρουσία ATP, O₂ και Mg²⁺ αποδίδοντας οξυλουσιφερίνη, πυροφοσφορικά, CO₂ και φωτεινή ακτινοβολία η οποία μετράται στα 420nm με τη βοήθεια ειδικού φωτομέτρου (λουμινόμετρο Turner TD-20/20).

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη εξαιτίας της απουσίας ενδογενούς δραστηριότητας στα κύτταρα θηλαστικών. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το γονίδιο της λουσιφεράσης της *Renilla* (*Renilla reniformis*).

Η μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Firefly & Renilla Luciferase Single Tube Assay Kit (Biotium), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά, ύστερα από επώαση σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και ακολούθησε έκπλυση με 300μl κρύο PBS. Τα κύτταρα λύθηκαν με την προσθήκη 60μl διαλύματος λύσης και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας με τη βοήθεια ενός tip, έγινε συλλογή του λύματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf και φυγοκέντρηση για 30sec. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο και τοποθετήθηκε στον πάγο.

Για τη μέτρηση της παραγωγής φωτός στο λουμινόμετρο 1μl από το κυτταρικό λύμα αραιώθηκε σε 20μl διαλύματος λύσης, προστέθηκαν 20μl αντιδραστηρίου λουσιφεράσης (Firefly working solution) και έγινε μέτρηση της εκπομπής φωτονίων σε λουμινόμετρο (Εικόνα 33). Κατόπιν προστέθηκαν, στο ίδιο σωληνάριο, 10μl από το αντιδραστήριο της Renilla (Renilla working solution), το οποίο κατέστειλε τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας και ενεργοποίησε τη λουσιφεράση της Renilla, και ακολούθησε μέτρηση στο λουμινόμετρο. Οι τιμές της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας κανονικοποιήθηκαν ως προς τις αντίστοιχες τιμές της λουσιφεράσης της Renilla.



Εικόνα 33: Αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας της μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου λουσιφεράσης (single tube luciferase assay). Ανατύπωση από: <https://biotium.com/product/firefly-renilla-luciferase-single-tube-assay-kit/>

2.2.16 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Nucleozol (Macherey-Nagel) το οποίο είναι διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από RNAάσες.

Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε κατάλληλος όγκος αντιδραστηρίου λύσης. Έγινε αποκόλληση των κυττάρων με χρήση ειδικής σπάτουλας (cell scraper) και μεταφορά του κυτταρικού λύματος σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρά σωληνάρια τύπου Eppendorf και προστέθηκε αποστειρωμένο νερό σε όγκο 1/3 του υπερκειμένου. Τα δείγματα ανακινήθηκαν γρήγορα για 15 δευτερόλεπτα και έπειτα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 11000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο (που περιείχε το RNA) μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf και προστέθηκε ισοπροπανόλη σε όγκο ίσο με τον όγκο του υπερκειμένου. Έγινε σύντομη ανάδευση, επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 11000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ακολούθησε πλύση του ιζήματος με 500μl διαλύματος 75% αιθανόλης. Έγινε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 9500rpm και επανάληψη του προηγούμενου βήματος (πλύση και φυγοκέντρωση). Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης, έγινε επαναιώρηση των δειγμάτων RNA σε 50μl αποστειρωμένου ύδατος και αποθήκευση στους -80°C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm με τη χρήση Nanodrop2000 (Thermo Scientific).

2.2.17 Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή

Κατά την αντίδραση σύνθεσης cDNA η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA (Εικόνα 34). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Primescript RT reagent Kit-Perfect Real Time (TAKARA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, κάθε αντίδραση περιείχε:

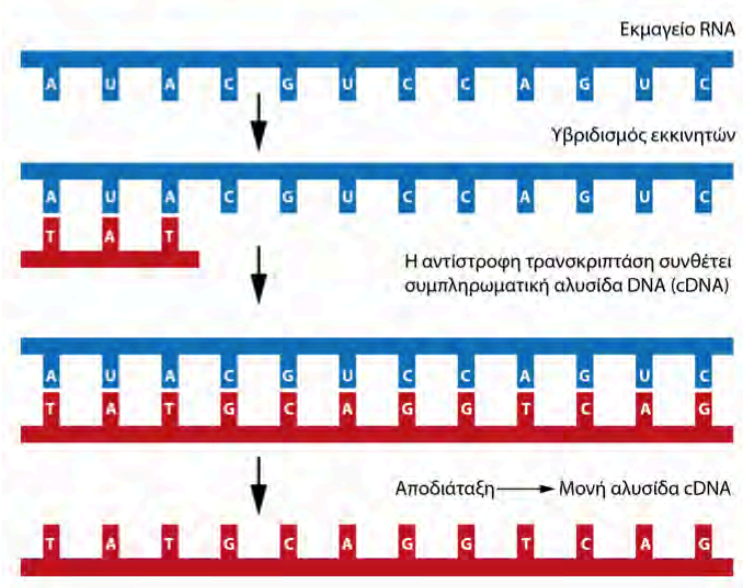
- 2μl 5X Prime Script Buffer
- 0,5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Prime Script RT Enzyme mix 1)
- 0,5μl εκκινήτων (Oligo dT primer)
- 0,5μl τυχαίων εξαμερών (Random 6mers)

- 0,5 μg ολικού RNA
- Αποστειρωμένο νερό έως τον τελικό όγκο (10μl)

Χρησιμοποιήθηκε δείγμα RNA χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης (NRT). Η επώαση των δειγμάτων έγινε σε θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

- 37°C για 15 λεπτά
- 85°C για 5 δευτερόλεπτα

Μετά το τέλος της αντίδρασης στα δείγματα προστέθηκαν 90 μl H₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.



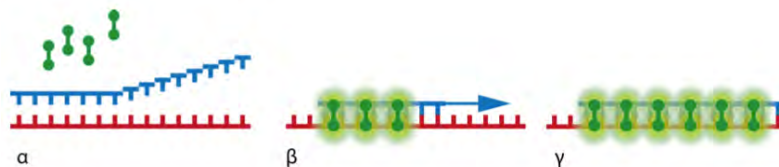
Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων σύνθεσης cDNA από RNA (αντίστροφη μεταγραφάση). Ανατύπωση από:

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/647/1/02_chapter_07.pdf

2.2.18 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Quantitative Real Time PCR - qRT-PCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχει τη δυνατότητα μέτρησης της ποσότητας του προϊόντος της PCR μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης σε αντίθεση με την κλασική PCR κατά την οποία η μέτρηση γίνεται στο τέλος της αντίδρασης. Τα προϊόντα της qRT-PCR μετρώνται καθώς παράγονται με τη βοήθεια μιας φθορίζουσας χρωστικής η οποία προσδένεται στα παραγόμενα δίκλιωνα μόρια DNA και οι τιμές φθορισμού καταγράφονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικόνα 35). Μεταξύ του σήματος φθορισμού και της συγκέντρωσης DNA η σχέση είναι γραμμική και έτσι η

αύξηση του σήματος φθορισμού αντιστοιχεί σε αύξηση της συγκέντρωσης DNA (Sigma). Σημαντική παράμετρος της διαδικασίας είναι η τιμή Ct που αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης όπου το σήμα φθορισμού των προϊόντων ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης (threshold) και χρησιμεύει στην ποσοτικοποίηση του δείγματος.



Εικόνα 35: Αναπαράσταση της πρόσδεσης της φθορίζουσας χρωστικής στο δίκλωνο DNA. Ανατύπωση από:

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/647/1/02_chapter_07.pdf

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση και προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του γονιδίου *LOX* με χρήση κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 11). Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η β ακτίνη. Οι αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή Mini Opticon (Biorad) με χρήση του αντιδραστηρίου SYBR Green. Σε κάθε αντίδραση (τελικού όγκου 10μl) προστέθηκαν:

- 5μl διαλύματος φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green)
- 0,5μl εμπρόσθιου εκκινητή (forward primer)
- 0,5μl ανάστροφου εκκινητή (reverse primer)
- 1,5 μl αποστειρωμένο νερό
- 2,5μl cDNA

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντίδραση cDNA χωρίς την αντίστροφη μεταγραφή (NRT) και αντίδραση χωρίς δείγμα cDNA (NTC). Ακολούθησε επώαση των αντιδράσεων ως εξής:

- Ενεργοποίηση του αντιδραστηρίου στους 50°C για 2 λεπτά
- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
- Αντίδραση PCR (40 κύκλοι)
 - ο Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - ο Επιμήκυνση στους 60°C για λεπτό
- Μέτρηση της απορρόφησης
- Καμπύλη τήξης: 60°C-90°C

Η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των mRNA έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt.

Γονίδιο	Εμπρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
hsLOX	CGACGACCCTTACAACCCCTAC	AAATCTGAGCAGCACCCCTGTG
hsβ-ακτίνη	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Πίνακας 11: Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων που αναλύθηκαν με RT-PCR

2.2.19 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο t-test. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

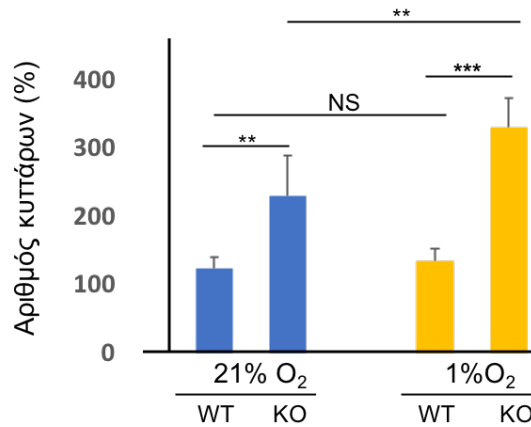
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό / επιβίωση κυττάρων HCC1937 και HEK293 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Δεδομένου ότι έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη *CYLD* ασκεί ογκοκατασταλτική δράση, αρχικά έγινε έλεγχος της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου της στον πολλαπλασιασμό / επιβίωση κυττάρων της κυτταρικής σειράς αδenoκαρκινώματος μαστού HCC1937 και της σειράς εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK293, σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.

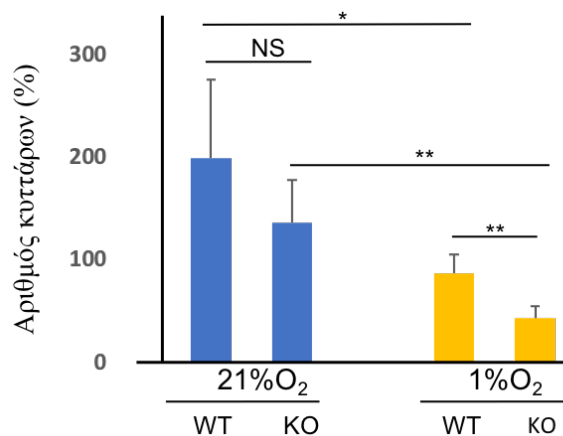
Κύτταρα HCC1937 ή HEK293 αγρίου τύπου (WT) και κύτταρα στα οποία έγινε απαλοιφή γονιδίου της πρωτεΐνης *CYLD* (KO *CYLD*) επιστρώθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων (5000 κύτταρα/θέση) και επώαστηκαν σε κλίβανο CO₂ στους 37°C προκειμένου να προσκολληθούν στο υπόστρωμα (0 hs). Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με νέο και τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂) για 24 ώρες (24 hs). Στο τέλος κάθε επώασης προστέθηκε στα τρυβλία το αντιδραστήριο MTS και έγινε η μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε σε σχέση με την απορρόφηση των κυττάρων στις 0hs.

Όπως φαίνεται από το γράφημα (Εικόνα 36), στα καρκινικά κύτταρα HCC1937 η απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* (KO *CYLD*) αύξησε την επιβίωση / πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου (WT), σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Επιπλέον, ενώ η επιβίωση / πολλαπλασιασμός των κυττάρων αγρίου (WT) τύπου δεν επηρεάστηκε από την επώαση σε χαμηλή συγκέντρωση O₂, η αποσιώπηση του γονιδίου της *CYLD* προκάλεσε αύξηση του πολλαπλασιασμού / επιβίωσης των κυττάρων στην υποξία σε σχέση με τη νορμοξία.



Εικόνα 36: Πολλαπλασιασμός / επιβίωση των κυττάρων HCC1937 (%) έπειτα από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ο αριθμός των κυττάρων (%) παρουσιάζεται σε σχέση τον αρχικό αριθμό των κυττάρων (0 hs). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, NS: Non Significant).

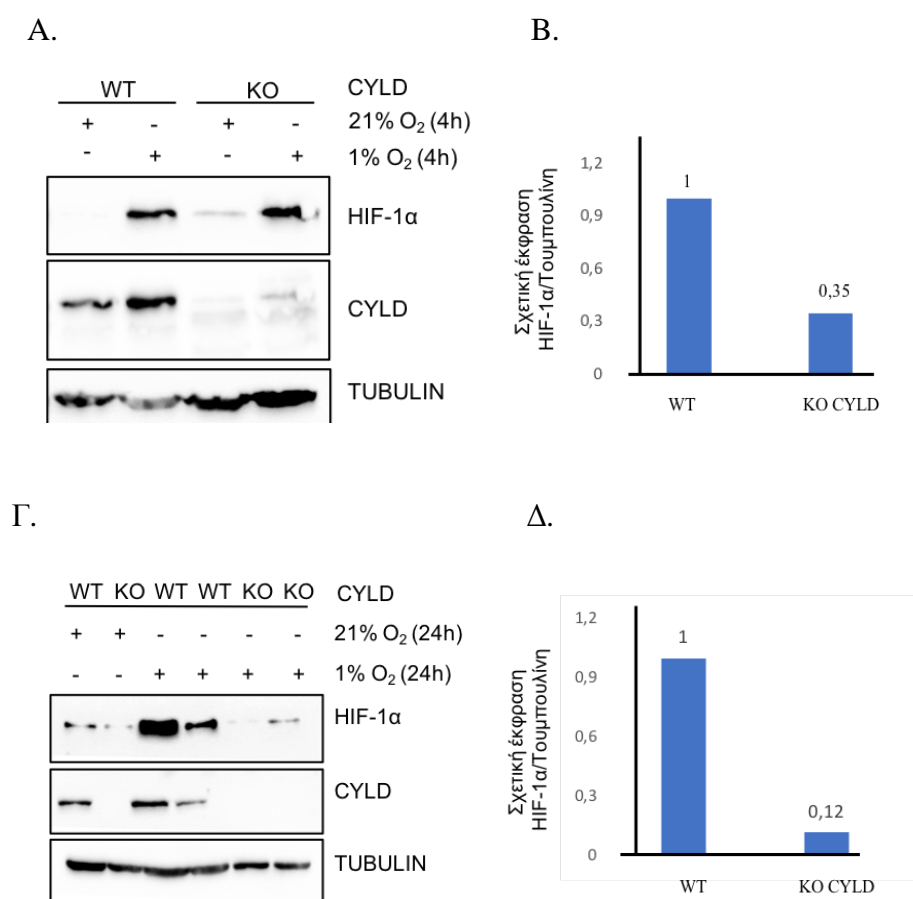
Στην περίπτωση των κυττάρων HEK293 (Εικόνα 37) παρατηρείται ότι η επώαση στην υποξία επηρεάζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό τόσο των κυττάρων αγρίου τύπου (WT), όσο και των κυττάρων στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* (KO *CYLD*). Επιπλέον, η απαλοιφή της *CYLD* προκαλεί μείωση πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου (WT), η οποία είναι στατιστικά σημαντική σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 37: Πολλαπλασιασμός-επιβίωση των κυττάρων HEK293 (%) έπειτα από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ο αριθμός των κυττάρων (%) παρουσιάζεται σε σχέση τον αρχικό αριθμό των κυττάρων (0 hs). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, NS: Non Significant)

3.2 Επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α κυττάρων HCC1937 και HEK293

Κύτταρα HCC1937 ή HEK293, WT και KO *CYLD*, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα και η έκφραση του HIF-1α αναλύθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Και στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* δεν παρατηρήθηκε έκφραση της (Εικόνα 38 & 39). Η επώαση σε συνθήκες υποξίας για 4 ή 24 ώρες, προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης HIF-1α τόσο σε κύτταρα HCC1937 WT όσο και σε κύτταρα HCC1937 KO (Εικόνα 38Α & 38Γ). Ωστόσο, από την ποσοτικοποίηση των ζωνών της πρωτεΐνης HIF-1α σε σχέση με τις ζώνες της τουμπουλίνης προκύπτει ότι η επαγωγή του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας είναι μικρότερη στα κύτταρα KO *CYLD* σε σύγκριση με τα κύτταρα WT (Εικόνα 38Β & 38Δ).



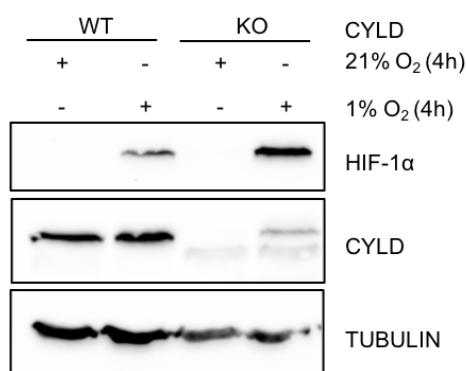
Εικόνα 38: Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α σε κύτταρα HCC1937.

Α & Γ. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western της έκφρασης του HIF-1α σε κύτταρα επώαστηκαν για 4 (Α) και 24 (Β) ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή

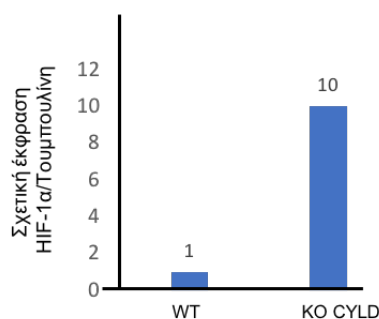
υποξίας (1% O₂). Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α και μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της CYLD και της τουμπουλίνης. B & Δ. Ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/τουμπουλίνη.

Όμοια στα κύτταρα HEK293 WT και KO CYLD τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α επάγονται σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 39A & 39Γ). Στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης δείχνουν ότι η απάλωψη της CYLD ενισχύει την επαγωγή του HIF-1α σε σχέση με τα κύτταρα WT (Εικόνα 39B & 39Δ).

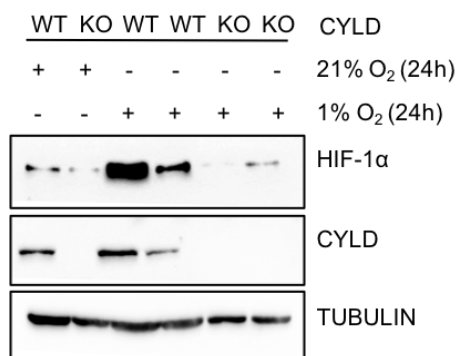
A.



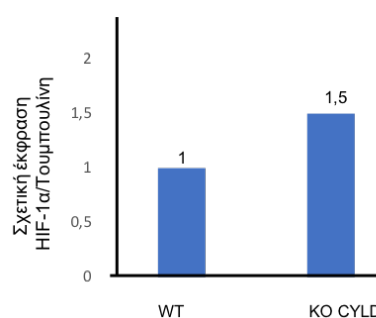
B.



Γ.



Δ.



Εικόνα 39: Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α σε κύτταρα HEK293.

A & Γ. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western της έκφρασης του HIF-1α σε κύτταρα επωάστηκαν για 4 (A) και 24 (B) ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂). Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α και μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της CYLD και της τουμπουλίνης.

B & Δ. Ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/τουμπουλίνη.

3.3 Έλεγχος της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 κυττάρων HEK293

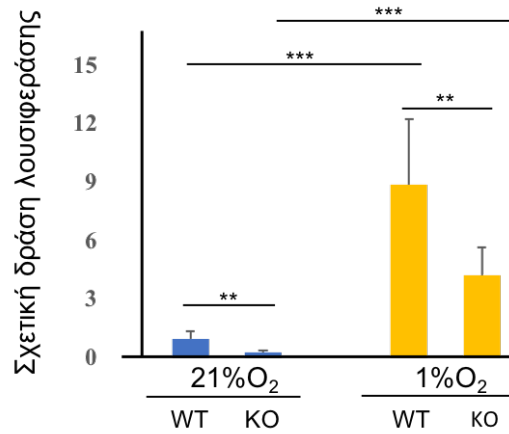
Αρχικά έγινε έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HEK293 WT και KO CYLD με τη δοκιμασία λουσιφεράσης.

Κύτταρα HEK293 WT και KO CYLD διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς PGL3-VEGF-5xHRE και pCI Renilla με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 18 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂), έγινε λύση και μέτρηση του σήματος της λουσιφεράσης. Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας κανονικοποιήθηκαν ως προς τις αντίστοιχες τιμές της λουσιφεράσης της Renilla. Η έκφραση των τιμών έγινε ως προς τη δράση της λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK293 WT σε συνθήκες νορμοξίας.

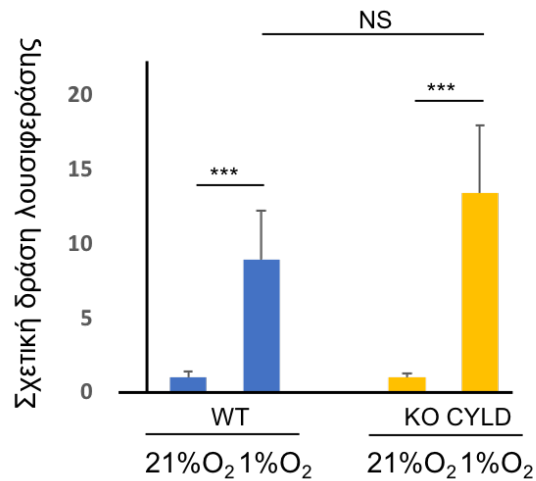
Σε συνθήκες υποξίας παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων λουσιφεράσης 9 φορές στα κύτταρα WT και περίπου 4 φορές στα κύτταρα KO CYLD (*Εικόνα 40A*).

Ύστερα από κανονικοποίηση των τιμών ως προς τις τιμές των κυττάρων της ίδιας σειράς σε συνθήκες νορμοξίας, παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας η αύξηση των επιπέδων λουσιφεράσης ήταν 9 φορές στα κύτταρα WT και περίπου 13 φορές στα κύτταρα KO CYLD (*Εικόνα 40B*).

A.



B.



Εικόνα 40: Προσδιορισμός της δράσης της λουσιφεράσης σε κύτταρα HEK293 WT και KO CYLD τα οποία διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα PGL3-HRE και το pCI Renilla και επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Οι τιμές εκφράζονται σε σχέση με τη δράση της λουσιφεράσης (A) στα κύτταρα WT σε συνθήκες νορμοξίας και (B) σε κύτταρα WT ή KO CYLD αντίστοιχα σε συνθήκες νορμοξίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση 3-4 μετρήσεων. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

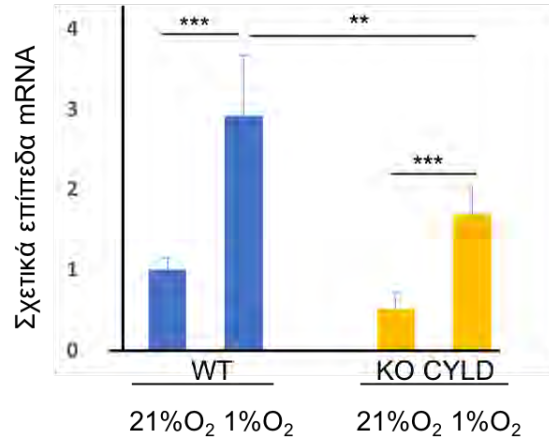
3.4 Επίδραση της υποξίας στα επίπεδα mRNA της *LOX* σε κύτταρα HCC1937 και HEK293

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στην έκφραση των επιπέδων mRNA ενός γονιδίου στόχου του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Για τον έλεγχο αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της λύσυλ-οξειδάσης (lysyl-oxidase, *LOX*) με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Για το σκοπό αυτό, καρκινικά κύτταρα HCC1937 (WT και KO *CYLD*) και κύτταρα HEK293 (WT και KO *CYLD*) επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂) για 24 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, ανάστροφη μεταγραφή και ανάλυση των επιπέδων mRNA της *LOX* με ποσοτική Real-Time PCR και χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA χρησιμοποιήθηκε η *β-ακτίνη*.

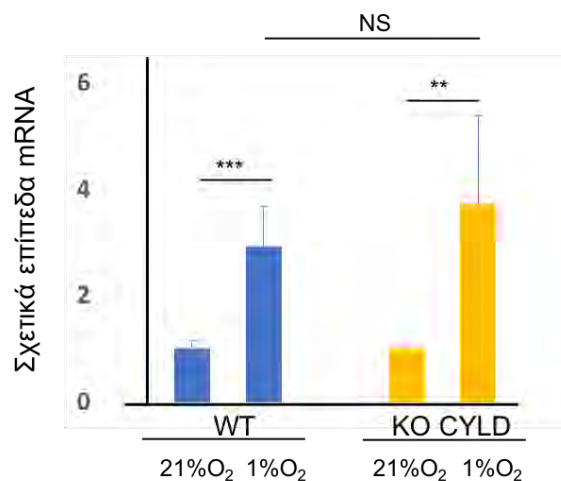
Τα επίπεδα mRNA της *LOX* σε κύτταρα HCC1937 WT και KO *CYLD* αυξάνονται στατιστικά σημαντικά σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 41A). Η αύξηση αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα κύτταρα WT σε σχέση με τα κύτταρα KO *CYLD*.

Ύστερα από κανονικοποίηση των τιμών ως προς τις αντίστοιχες τιμές των κυττάρων της κάθε σειράς (WT ή KO *CYLD*) σε συνθήκες νορμοξίας, παρατηρήθηκε σε συνθήκες υποξίας στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA η οποία, ωστόσο, δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα σε κύτταρα WT και κύτταρα KO *CYLD* (Εικόνα 41B).

A.



B.



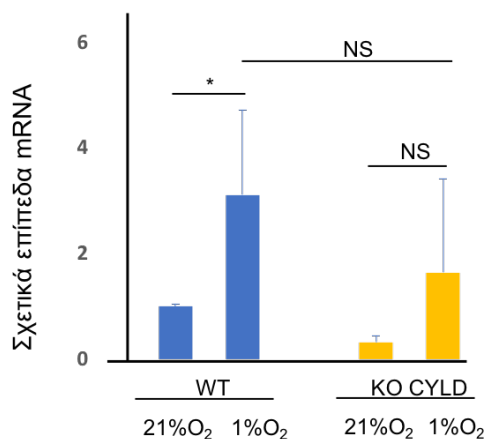
Εικόνα 41: Προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της *LOX* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου μετά από επώαση των κυττάρων *HCC1937 WT* και *KO CYLD* σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μεταβολή προς τα επίπεδα έκφρασης (A) σε κύτταρα *WT* σε συνθήκες νορμοξίας και (B) σε κύτταρα *WT* ή *KO CYLD* αντίστοιχα σε συνθήκες νορμοξίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων δειγμάτων, τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια στα κύτταρα *HEK293*, όπου σε συνθήκες υποξίας παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA της *LOX* τόσο σε κύτταρα *WT*

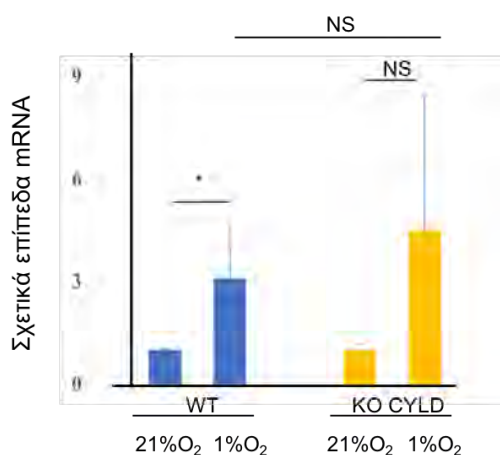
όσο και σε κύτταρα KO CYLD (Εικόνα 42A), η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στα κύτταρα WT.

Παρόμοια επαγωγή των επιπέδων mRNA της *LOX* παρατηρήθηκε και έπειτα από κανονικοποίηση των τιμών ως προς τις αντίστοιχες τιμές των κυττάρων της κάθε σειράς (WT ή KO CYLD) σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 42B).

A.



B.



Εικόνα 42: Προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της *LOX* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου μετά από επώαση των κυττάρων HEK293 WT και KO CYLD σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 24 ώρες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μεταβολή προς τα επίπεδα έκφρασης (A) σε κύτταρα WT σε συνθήκες νορμοξίας και (B) σε κύτταρα WT ή KO CYLD αντίστοιχα σε συνθήκες νορμοξίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων δειγμάτων, τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, NS: Non Significant).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της απαλοιφής του γονιδίου της αποουβικιτινάσης *CYLD*, η οποία έχει ογκοκατασταλτική δράση, στην κυτταρική απόκριση στην υποξία κυττάρων αδenoκαρκινώματος μαστού HCC1937 και εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK293.

Η υποξία (χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου O_2) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των συμπαγών όγκων (76). Τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται και επιβιώνουν κάτω από τις συνθήκες χαμηλής παροχής οξυγόνου. Βασικό ρόλο στη ρύθμιση αυτής της προσαρμογής έχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF (79). Τα επίπεδα των παραγόντων HIF καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση του συστήματος της ουβικιτίνης τόσο μέσω της άμεσης τροποποίησης τους, όσο και έμμεσα μέσω ουβικιτινίωσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του μονοπατιού των HIF (21).

Η αποουβικιτινάση *CYLD*, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη στην οικογενή κυλινδωμάτωση, συσχετίζεται και με την εμφάνιση πολλαπλών διαφορετικών μορφών καρκίνου (καρκίνος μαστού (74), παχέος εντέρου (170), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (171)). Η *CYLD* είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση K63 αλυσίδων ουβικιτίνης από τις πρωτεΐνες υποστρώματα και η δράση της επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό όπως αυτά των NF-κB, Wnt/β-catenin και Bcl-3 (38).

Η σχέση της *CYLD* με την υποξία και το σύστημα των μεταγραφικών παραγόντων HIF δεν έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό. Υπάρχουν ορισμένες μελέτες οι οποίες εξετάζουν κυρίως την επίδραση της υποξίας στα επίπεδα έκφρασης και δράσης της πρωτεΐνης *CYLD*.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* σε καρκινικά κύτταρα HCC1937 προκάλεσε αύξηση της επιβίωσης / πολλαπλασιασμού σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, ενώ τα κύτταρα WT δεν επηρεάστηκαν από την υποξία (Εικόνα 36). Όσον αφορά την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α ήταν μικρότερη στα κύτταρα KO *CYLD* παρόλο που ο μικρός αριθμός των πειραμάτων δεν επιτρέπει τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Εικόνα 38). Επιπλέον, ενώ τα επίπεδα mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1 *LOX* ήταν μικρότερα στα κύτταρα KO *CYLD* σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (Εικόνα

41A), δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη σχετική επαγωγή του γονιδίου μεταξύ κυττάρων WT και KO CYLD στην υποξία (Εικόνα 41B).

Η αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης / πολλαπλασιασμού κυττάρων HCC1937, που παρατηρείται σε συνθήκες νορμοξίας απουσία της CYLD, έρχεται σε συμφωνία με δεδομένα προηγούμενων μελετών, και επιβεβαιώνει την ογκοκατασταλτική της δράση. Συγκεκριμένα μελέτη σε καρκινικά κύτταρα ήπατος Huh7 και Hep3B έδειξε ότι η αποσιώπηση της CYLD προσφέρει ισχυρή αντίσταση έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης (172) ενώ παράλληλα η ανάπτυξη όγκου ηπατοκαρκινώματος ήταν σημαντικά ταχύτερη στην περίπτωση των ποντικών με μη λειτουργική CYLD (173). Επιπλέον, απώλεια της CYLD σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος (PANC-1 και EPP85) συσχετίστηκε με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του όγκου (174). Παρόμοια, σε κύτταρα κακοήθους μελανώματος η αποσιώπηση του γονιδίου της CYLD προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (175). Ο ρόλος της CYLD στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό θα μπορούσε να αποδοθεί στη ρυθμιστική δράση της στα μονοπάτια NF-κB και Wnt/ β -catenin (38). Η απουσία της CYLD αυξάνει την ενεργοποίηση και δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB ενισχύοντας την επιβίωση (30) ενώ στην περίπτωση του Wnt/ β -catenin επάγει τη δράση της β -κατενίνης επιδρώντας θετικά στον πολλαπλασιασμό (176).

Οι μελέτες που εξετάζουν την σχέση της CYLD με την κυτταρική επιβίωση σε συνθήκες υποξίας είναι περιορισμένες. Μελέτη σε λάρβες και ενήλικες μύγες (*Drosophila*) έδειξε ότι, απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης CYLD, η επιβίωση μειώνεται δραματικά σε συνθήκες υποξίας (177). Ακόμα, οι Feng et al (2017) μελέτησαν την έκφραση της CYLD σε φλοιϊκούς νευρώνες υπό συνθήκες αποστέρησης οξυγόνου και γλυκόζης, κατάσταση που προσομοιάζει την υποξία, και διαπίστωσαν ότι αυξάνεται μέσω της δράσης της p38 κινάσης οδηγώντας σε νεκρόπτωση (178). Γνωρίζοντας τη θετική επίδραση της υποξίας μέσω των παραγόντων HIF στην ανάπτυξη όγκων και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η απουσία της CYLD δρα συνεργικά με την υποξία ενισχύοντας το πλεονέκτημα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων.

Είναι πιθανό ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων KO CYLD στην υποξία να σχετίζεται με τη μικρότερη επαγωγή του HIF-1 α που παρατηρήθηκε στα κύτταρα αυτά συγκριτικά με κύτταρα WT. Έχει αναφερθεί ότι οι παράγοντες HIF είναι δυνατό να έχουν ανασταλτικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου προκαλώντας

τη διακοπή αυτού (179). Παρόλ'αυτά, για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση θα πρέπει να γίνουν πειράματα με αποσιώπηση του γονιδίου του *HIF-1A*.

Αν και, απ' όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν μελέτες που να ερευνούν την πιθανή αλληλεπίδραση της αποουβικιτινάσης *CYLD* με τους παράγοντες *HIF*, είναι γνωστό πως τα επίπεδα του *HIF-1α* εξαρτώνται άμεσα από το σύστημα της ουβικιτίνης, καθώς ουβικιτινώνεται από την πρωτεΐνη *VHL* και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, ενώ η σταθεροποίησή του προάγεται από αποουβικιτινάσες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι *USP20* (180), *USP7* (181), *USP8* (138), *USP28* (128), *UCHL1* (139), *MCPIP1* (182) και *Cezanne (OTUD7B)* (183). Η *CYLD*, η οποία ανήκει και αυτή στην οικογένεια των *USP* αποουβικιτινών, θα μπορούσε να δρα ρυθμίζοντας κάποιο ένζυμο του μονοπατιού των *HIF* όπως οι προλυλ-υδροξυλάσες, οι οποίες ουβικιτινώνονται από γνωστές *E3* λιγάσες όμως δεν έχουν αναγνωριστεί οι αντίστοιχες αποουβικιτινάσες (21). Ακόμα είναι δυνατόν η *CYLD* να επιδρά στον *HIF-1α* με τρόπο ανεξάρτητο από τις ενζυμικές της ιδιότητες. Παρόμοια επίδραση έχει αναφερθεί στην περίπτωση της αποουβικιτινάσης *USP19*, η οποία αλληλεπιδρά με την *bHLH* και *PAS* επικράτεια του αμινοτελικού άκρου του *HIF-1α* και τον σταθεροποιεί (184), και της αποουβικιτινάσης *USP52*, η οποία συμβάλλει στη σταθεροποίηση του mRNA του *HIF-1α* (185).

Η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του *HIF-1* σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας που παρατηρήθηκε στα κύτταρα *KO CYLD* σε σύγκριση με τα *WT* σε συνδυασμό με τα παρόμοια, μεταξύ των κυττάρων *WT* και *KO CYLD*, επίπεδα σχετικής επαγωγής του γονιδίου της *LOX* στην υποξία μας οδηγούν στην πιθανή εξήγηση ότι η αποουβικιτινάση *CYLD* είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της μεταγραφής χωρίς όμως να επηρεάζει ειδικά τη μεταγραφική δράση του παράγοντα *HIF-1*. Ανεξάρτητα από αυτά, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμος ο έλεγχος της επίδρασης της απαλοιφής του γονιδίου της *CYLD* στα επίπεδα mRNA επιπλέον γονιδίων στόχων του *HIF-1* και *HIF-2*, αλλά και των ίδιων των παραγόντων *HIF-1α* και *HIF-2α*.

Τα πειράματα σε ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα *HEK293* έδειξαν ότι, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα *HCC1937*, η απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα στην κυτταρική επιβίωση / πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε νορμοξία και υποξία (Εικόνα 37) και αυξάνει την έκφραση του *HIF-1α* (Εικόνα 39). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η απουσία της *CYLD* επιδρά διαφορετικά στις δύο κυτταρικές σειρές, ασκώντας πιθανώς προστατευτική δράση στα *HCC1937* και ανασταλτική δράση στα *HEK293*.

Αντίθετα έχει παρόμοια επίδραση, όπως και στα καρκινικά κύτταρα HCC1937, στα επίπεδα mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1 *LOX* (Εικόνα 42) και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 όπως φαίνεται επιπλέον από πειράματα δοκιμασίας λουσιφεράσης (Εικόνα 40).

Η επίδραση της υποξίας στη ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης CYLD έχει μελετηθεί και φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Επαγωγή της έκφρασής της παρατηρείται σε συνθήκες υποξίας ύστερα από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στη Δροσόφιλα (177) αλλά και σε φλοιϊκούς νευρώνες έπειτα από ενεργοποίηση της p38 κινάσης (178). Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού, όπου η υποξία καταστέλλει την έκφραση του miRNA-181b αυξάνοντας τα επίπεδα της CYLD (186). Αντίθετα, η υποξία καταστέλλει την έκφραση της CYLD σε καρκινικά κύτταρα κεφαλής, τραχήλου και τραχήλου της μήτρας τα οποία είχαν προσβληθεί από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV (55), αλλά και σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος (187).

Συμπερασματικά, η απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* φαίνεται να έχει διαφορετική επίδραση στην υποξία στις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, προκαλώντας αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα HCC1937, αλλά μείωση στα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα HEK293. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των καρκινικών και εμβρυϊκών κυτταρών αλλά και στην ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Όσον αφορά την επίδραση της απαλοιφής της *CYLD* στον HIF-1α τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι σε συνθήκες υποξίας, η απουσία της *CYLD* μειώνει την επαγωγή του στην καρκινική σειρά HCC1937, ενώ προκαλεί αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α στην κυτταρική σειρά των εμβρυϊκών κυττάρων HEK293, χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε αν τα αποτελέσματα αυτά είναι στατιστικά σημαντικά, λόγω του μικρού αριθμού των πειραμάτων. Τέλος και στις δύο κυτταρικές σειρές, η απαλοιφή του γονιδίου της *CYLD* οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε νορμοξία και υποξία, χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την ενεργοποίησή του σε συνθήκες υποξίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45.
2. Semenyuk P, Muronetz V. Protein Interaction with Charged Macromolecules: From Model Polymers to Unfolded Proteins and Post-Translational Modifications. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 12;20(5).
3. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. 2003 Mar;21(3):255–61.
4. Strategies for Post-Translational Modifications (PTMs) – Creative Proteomics Blog [Internet]. [cited 2019 Sep 16]. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/strategies-for-post-translational-modifications-ptms/>
5. Simpson CM, Zhang B, Hornbeck PV, Gnad F. Systematic analysis of the intersection of disease mutations with protein modifications. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2019 Jul 25 [cited 2019 Aug 3];12(Suppl 6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657027/>
6. Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:203–29.
7. Akutsu M, Dikic I, Bremm A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci*. 2016 Mar 1;129(5):875–80.
8. Jackson SE. Ubiquitin: a small protein folding paradigm. *Org Biomol Chem*. 2006 May 21;4(10):1845–53.
9. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 1987 Apr 5;194(3):531–44.
10. Lund PK, Moats-Staats BM, Simmons JG, Hoyt E, D’Ercole AJ, Martin F, et al. Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor. *J Biol Chem*. 1985 Jun 25;260(12):7609–13.
11. Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA, Vuust J. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J*. 1985 Mar;4(3):755–9.
12. Baker RT, Board PG. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res*. 1991 Mar 11;19(5):1035–40.
13. Redman KL, Rechsteiner M. Identification of the long ubiquitin extension as

- ribosomal protein S27a. *Nature*. 1989 Mar 30;338(6214):438–40.
14. Grou CP, Pinto MP, Mendes AV, Domingues P, Azevedo JE. The de novo synthesis of ubiquitin: identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2019 Aug 4];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4522658/>
 15. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425–79.
 16. Clague MJ, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol*. 2015 Jul;25(7):417–26.
 17. Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*. 2007 May 11;100(9):1276–91.
 18. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*. 2012 Feb 1;125(Pt 3):531–7.
 19. Wu Z-H, Shi Y. When ubiquitin meets NF- κ B: a trove for anti-cancer drug development. *Curr Pharm Des*. 2013;19(18):3263–75.
 20. pubmeddev, al WC et. Chemical strategies to understand the language of ubiquitin signaling. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Aug 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576160>
 21. The functional interplay between the HIF pathway and the ubiquitin system - more than a one-way road. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Sep 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+functional+interplay+between+the+HIF+pathway+and+the+ubiquitin+system+%E2%80%93+more+than+a+one-way+road>
 22. Kubaichuk K, Kietzmann T. Involvement of E3 Ligases and Deubiquitinases in the Control of HIF- α Subunit Abundance. *Cells*. 2019 15;8(6).
 23. Wickliffe KE, Williamson A, Meyer H-J, Kelly A, Rape M. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends Cell Biol*. 2011 Nov;21(11):656–63.
 24. Fulda S, Rajalingam K, Dikic I. Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *EMBO Mol Med*. 2012 Jul;4(7):545–56.
 25. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 29;1695(1–3):189–207.

26. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:363–97.
27. Ramakrishna S, Suresh B, Baek K-H. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011 Jan;68(1):15–26.
28. Mtango NR, Sutovsky M, Vandevoort CA, Latham KE, Sutovsky P. Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation. *J Cell Physiol.* 2012 May;227(5):2022–9.
29. Suresh B, Lee J, Kim K-S, Ramakrishna S. The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6705927.
30. Lork M, Verhelst K, Beyaert R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1172–83.
31. Zhou Y-F, Liao S-S, Luo Y-Y, Tang J-G, Wang J-L, Lei L-F, et al. SUMO-1 modification on K166 of polyQ-expanded ataxin-3 strengthens its stability and increases its cytotoxicity. *PloS One.* 2013;8(1):e54214.
32. Osaka H, Wang Y-L, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet.* 2003 Aug 15;12(16):1945–58.
33. Inui M, Manfrin A, Mamidi A, Martello G, Morsut L, Soligo S, et al. USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs. *Nat Cell Biol.* 2011 Sep 25;13(11):1368–75.
34. Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med.* 2014 Nov;20(11):1242–53.
35. Lü S, Wang J. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res.* 2013 Mar 1;1(1):13.
36. Colland F. The therapeutic potential of deubiquitinating enzyme inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 2010 Feb;38(Pt 1):137–43.
37. Lim K-H, Baek K-H. Deubiquitinating enzymes as therapeutic targets in cancer. *Curr Pharm Des.* 2013;19(22):4039–52.
38. Mathis BJ, Lai Y, Qu C, Janicki JS, Cui T. CYLD-mediated signaling and diseases. *Curr Drug Targets.* 2015;16(4):284–94.
39. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature.* 2003 Aug 14;424(6950):801–5.

40. Courtois G, Fauvarque M-O. The Many Roles of Ubiquitin in NF- κ B Signaling. *Biomedicines*. 2018 Apr 10;6(2).
41. Baker R, Lewis SM, Sasaki AT, Wilkerson EM, Locasale JW, Cantley LC, et al. Site-specific monoubiquitination activates Ras by impeding GTPase-activating protein function. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Jan;20(1):46–52.
42. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, et al. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):160–5.
43. Biggs PJ, Wooster R, Ford D, Chapman P, Mangion J, Quirk Y, et al. Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene. *Nat Genet*. 1995 Dec;11(4):441–3.
44. Komander D, Lord CJ, Scheel H, Swift S, Hofmann K, Ashworth A, et al. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol Cell*. 2008 Feb 29;29(4):451–64.
45. Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, et al. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Mar;22(3):222–9.
46. Wickström SA, Masoumi KC, Khochbin S, Fässler R, Massoumi R. CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *EMBO J*. 2010 Jan 6;29(1):131–44.
47. Saito K, Kigawa T, Koshiha S, Sato K, Matsuo Y, Sakamoto A, et al. The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKK γ . *Struct Lond Engl* 1993. 2004 Sep;12(9):1719–28.
48. Xie S, Chen M, Gao S, Zhong T, Zhou P, Li D, et al. The B-box module of CYLD is responsible for its intermolecular interaction and cytoplasmic localization. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(31):50889–95.
49. Massoumi R. Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work. *Trends Biochem Sci*. 2010 Jul;35(7):392–9.
50. Wang L, Baiocchi RA, Pal S, Mosialos G, Caligiuri M, Sif S. The BRG1- and hBRM-Associated Factor BAF57 Induces Apoptosis by Stimulating Expression of the Cylindromatosis Tumor Suppressor Gene. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(18):7953–65.
51. Jono H, Lim JH, Chen L-F, Xu H, Trompouki E, Pan ZK, et al. NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J Biol Chem*. 2004 Aug

27;279(35):36171–4.

52. Ghadami E, Nikbakhsh N, Fattahi S, Kosari-Monfared M, Ranaee M, Taheri H, et al. Epigenetic alterations of CYLD promoter modulate its expression in gastric adenocarcinoma: A footprint of infections. *J Cell Physiol*. 2019 Apr;234(4):4115–24.
53. Kotantaki P, Mosialos G. The expression of tumor suppressor gene Cyld is upregulated by histone deacetylase inhibitors in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cell Biochem Funct*. 2016;34(7):465–8.
54. Kobayashi T, Masoumi KC, Massoumi R. Deubiquitinating activity of CYLD is impaired by SUMOylation in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2015 Apr 23;34(17):2251–60.
55. An J, Mo D, Liu H, Veena MS, Srivatsan ES, Massoumi R, et al. Inactivation of the CYLD deubiquitinase by HPV E6 mediates hypoxia-induced NF-kappaB activation. *Cancer Cell*. 2008 Nov 4;14(5):394–407.
56. Gao J, Huo L, Sun X, Liu M, Li D, Dong J-T, et al. The Tumor Suppressor CYLD Regulates Microtubule Dynamics and Plays a Role in Cell Migration. *J Biol Chem*. 2008 Apr 4;283(14):8802–9.
57. Yang Y, Zhou J. CYLD - a deubiquitylase that acts to fine-tune microtubule properties and functions. *J Cell Sci*. 2016 15;129(12):2289–95.
58. Gao J, Sun L, Huo L, Liu M, Li D, Zhou J. CYLD regulates angiogenesis by mediating vascular endothelial cell migration. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4130–7.
59. Yang Y, Liu M, Li D, Ran J, Gao J, Suo S, et al. CYLD regulates spindle orientation by stabilizing astral microtubules and promoting dishevelled-NuMA-dynein/dynactin complex formation. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Feb 11;111(6):2158–63.
60. Tauriello DVF, Haegerbarth A, Kuper I, Edelmann MJ, Henraat M, Canninga-van Dijk MR, et al. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. *Mol Cell*. 2010 Mar 12;37(5):607–19.
61. Reiley W, Zhang M, Sun S-C. Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem*. 2004 Dec 31;279(53):55161–7.
62. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*. 2003 Aug 14;424(6950):793–6.
63. Sun S-C. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ*. 2010 Jan;17(1):25–34.

64. Jin W, Reiley WR, Lee AJ, Wright A, Wu X, Zhang M, et al. Deubiquitinating enzyme CYLD regulates the peripheral development and naive phenotype maintenance of B cells. *J Biol Chem*. 2007 May 25;282(21):15884–93.
65. Reiley WW, Jin W, Lee AJ, Wright A, Wu X, Tewalt EF, et al. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1475–85.
66. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):115–30.
67. Fukuda M, Hiroi M, Suzuki S, Ohmori Y, Sakashita H. Loss of CYLD might be associated with development of salivary gland tumors. *Oncol Rep*. 2008 Jun;19(6):1421–7.
68. Ströbel P, Zettl A, Ren Z, Starostik P, Riedmiller H, Störkel S, et al. Spiradenocylindroma of the kidney: clinical and genetic findings suggesting a role of somatic mutation of the CYLD1 gene in the oncogenesis of an unusual renal neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2002 Jan;26(1):119–24.
69. Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T, et al. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):221–32.
70. Hellerbrand C, Bumès E, Bataille F, Dietmaier W, Massoumi R, Bosserhoff AK. Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):21–7.
71. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, et al. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2008 Aug 1;123(3):552–60.
72. Zhong S, Fields CR, Su N, Pan Y-X, Robertson KD. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene*. 2007 Apr 19;26(18):2621–34.
73. Hutti JE, Shen RR, Abbott DW, Zhou AY, Sprott KM, Asara JM, et al. Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol Cell*. 2009 May 14;34(4):461–72.
74. Orfanidou T, Xanthopoulos K, Dafou D, Pseftogas A, Hadweh P, Psyllaki C, et

- al. Down-regulation of the Tumor Suppressor CYLD Enhances the Transformed Phenotype of Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2017;37(7):3493–503.
75. Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell.* 2009 Dec;17(6):755–73.
76. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47–71.
77. Ratcliffe PJ. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol.* 2013;591(8):2027–42.
78. 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 Jun 6;92(12):5510–4.
79. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014 Feb;49(1):1–15.
80. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294–309.
81. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012 May 30;31(11):2448–60.
82. 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 Nov 12;93(23):12969–73.
83. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 2005 Oct 18;2005(306):re12.
84. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Feb 15;310(4):C260-269.
85. Ravenna L, Salvatori L, Russo MA. HIF3 α : the little we know. *FEBS J.* 2016 Mar 1;283(6):993–1003.
86. Chee NT, Lohse I, Brothers SP. mRNA-to-protein translation in hypoxia. *Mol Cancer.* 2019 Mar 30;18(1):49.
87. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Sep 12];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2016.00011/full>
88. Yang J, Zhang L, Erbel PJA, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, et al. Functions

of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36047–54.

89. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):7987–92.

90. O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):2060–71.

91. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*. 1998;7(3):205–13.

92. Lendahl U, Lee KL, Yang H, Poellinger L. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet*. 2009 Dec;10(12):821–32.

93. Hu C-J, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell*. 2007 Nov;18(11):4528–42.

94. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 15;12(1):9–22.

95. Ivan M, Kaelin WG. The EGLN-HIF O₂-Sensing System: Multiple Inputs and Feedbacks. *Mol Cell*. 2017 Jun 15;66(6):772–9.

96. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiol Bethesda Md*. 2009 Apr;24:97–106.

97. Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jul 25;1755(2):107–20.

98. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2675–86.

99. Chen C, Lou T. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):46691–703.

100. Chang H, Shyu K-G, Wang B-W, Kuan P. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by cyclical mechanical stretch in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2003 Oct;105(4):447–56.

101. Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*.

2002 Dec 13;277(50):48403–9.

102. Blouin CC, Pagé EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):1124–30.

103. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1363–71.

104. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Apr;27(4):755–61.

105. Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, et al. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int*. 2010 Jul;78(1):48–59.

106. Kim J, Shao Y, Kim SY, Kim S, Song HK, Jeon JH, et al. Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1 α expression through a Rac1-dependent NF- κ B pathway. *Mol Biol Cell*. 2008 Feb;19(2):433–44.

107. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J*. 2008 Jun 15;412(Pt 3):477–84.

108. Tzapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatidou R, Koukoulis GK, et al. TNF α induces expression of HIF-1 α mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1745–53.

109. Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4441–5.

110. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2007;20(6):995–1006.

111. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2007 Jan 26;25(2):207–17.

112. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett*. 1999

Oct 29;460(2):251–6.

113. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, et al. MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1833(6):1378–87.
114. Bhattacharya S, Michels CL, Leung M-K, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):64–75.
115. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002 Nov 27;111(5):709–20.
116. Suzuki N, Gradin K, Poellinger L, Yamamoto M. Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Exp Cell Res*. 2017 15;356(2):182–6.
117. Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, et al. HDAC4 protein regulates HIF1 α protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2011 Nov 4;286(44):38095–102.
118. Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E, Park J-W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell*. 2010 Jun 25;38(6):864–78.
119. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*. 2003 Apr;9(4):160–8.
120. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, et al. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*. 2007 Apr 13;26(1):63–74.
121. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004 Nov 1;383(Pt. 3):429–37.
122. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*. 2006 Nov 3;281(44):33095–106.
123. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem*. 2008 Oct 10;283(41):27620–7.
124. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic

conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):509–20.

125. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci Signal*. 2016 31;9(430):ra56.

126. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle Georget Tex*. 2013 Dec 1;12(23):3689–701.

127. 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 Sep 1;123(17):2976–86.

128. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007 May;27(9):3253–65.

129. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J Biol Chem*. 2010 Dec 10;285(50):38944–50.

130. Bae S-H, Jeong J-W, Park JA, Kim S-H, Bae M-K, Choi S-J, et al. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 5;324(1):394–400.

131. 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 Oct 19;131(2):309–23.

132. 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 Oct;29(41):5568–78.

133. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouysségur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 31;360(3):646–52.

134. Yeh ETH. SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with Life's Processes. *J Biol Chem*. 2009 Mar 27;284(13):8223–7.

135. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ETH. SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia. *Cell*. 2007 Nov

2;131(3):584–95.

136. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α . *EMBO Rep.* 2005 Apr;6(4):373–8.

137. Ligeza J, Marona P, Gach N, Lipert B, Miekus K, Wilk W, et al. MCPIP1 contributes to clear cell renal cell carcinomas development. *Angiogenesis.* 2017 Aug;20(3):325–40.

138. Troilo A, Alexander I, Muehl S, Jaramillo D, Knobloch K-P, Krek W. HIF1 α deubiquitination by USP8 is essential for ciliogenesis in normoxia. *EMBO Rep.* 2014 Jan;15(1):77–85.

139. Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, et al. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun.* 2015 Jan 23;6:6153.

140. Zhang C, Peng Z, Zhu M, Wang P, Du X, Li X, et al. USP9X destabilizes pVHL and promotes cell proliferation. *Oncotarget.* 2016 Sep 13;7(37):60519–34.

141. Nakayama K, Ronai Z. Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle Georget Tex.* 2004 Nov;3(11):1345–7.

142. Fukuba H, Takahashi T, Jin HG, Kohriyama T, Matsumoto M. Abundance of aspargynyl-hydroxylase FIH is regulated by Siah-1 under normoxic conditions. *Neurosci Lett.* 2008 Mar 15;433(3):209–14.

143. Zhang L, Peng S, Dai X, Gan W, Nie X, Wei W, et al. Tumor suppressor SPOP ubiquitinates and degrades EglN2 to compromise growth of prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2017 01;390:11–20.

144. Yang S, Wang B, Humphries F, Hogan AE, O’Shea D, Moynagh PN. The E3 ubiquitin ligase Pellino3 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Immunity.* 2014 Dec 18;41(6):973–87.

145. Cassavaugh JM, Hale SA, Wellman TL, Howe AK, Wong C, Lounsbury KM. Negative regulation of HIF-1 α by an FBW7-mediated degradation pathway during hypoxia. *J Cell Biochem.* 2011 Dec;112(12):3882–90.

146. Samanta D, Prabhakar NR, Semenza GL. Systems Biology of Oxygen Homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* [Internet]. 2017 Jul [cited 2019 Aug 28];9(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606335/>

147. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for

- transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992 Dec;12(12):5447–54.
148. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):236–42.
149. Semenza GL. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:347–53.
150. Kim J, 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 Mar;3(3):177–85.
151. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008 Apr 18;283(16):10892–903.
152. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*. 2019 03;8(3).
153. Triantafyllou E-A, 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.
154. 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 Jul 15;125(Pt 14):3485–93.
155. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007 Mar 22;446(7134):444–8.
156. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):399–408.
157. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:39–56.
158. Yoon D, Ponka P, Prchal JT. Hypoxia. 5. Hypoxia and hematopoiesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Jun;300(6):C1215–1222.
159. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*. 2009 Feb;19(1):12–6.
160. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016;2(12):758–70.

161. Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:145–73.
162. Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1 α , through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3767–75.
163. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, Whitchelo N, Bishop PW, Ebert MP, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer.* 2007 Jan 9;96(1):95.
164. Griffiths EA, Pritchard SA, McGrath SM, Valentine HR, Price PM, Welch IM, et al. Hypoxia-associated markers in gastric carcinogenesis and HIF-2 α in gastric and gastro-oesophageal cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2008 Mar 11;98(5):965–73.
165. Rankin EB, Nam J-M, Giaccia AJ. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends Cancer.* 2016;2(6):295–304.
166. Semenza GL. Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019 Jan 6;59(1):379–403.
167. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection-Biorad.https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf.
168. celltiter-96-aqueous-non-radioactive-cell-proliferation-systems-protocol.Promega.<https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-mts-reagent-powder/?catNum=G1111>.
169. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp.* 2007 Aug 1;(6):253.
170. Karatzas DN, Xanthopoulos K, Kotantaki P, Pseftogas A, Teliouis K, Hatzivassiliou EG, et al. Inactivation of CYLD in intestinal epithelial cells exacerbates colitis-associated colorectal carcinogenesis - a short report. *Cell Oncol Dordr.* 2016 Jun;39(3):287–93.
171. Welte S, Urbanik T, Elßner C, Kautz N, Koehler BC, Waldburger N, et al. Nuclear expression of the deubiquitinase CYLD is associated with improved survival in human hepatocellular carcinoma. *PloS One.* 2014;9(10):e110591.
172. Urbanik T, Köhler BC, Boger RJ, Wörns MA, Heeger S, Otto G, et al. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF- κ B activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2011 Jan;38(1):121–31.

173. Urbanik T, Boger RJ, Longerich T, Becker K, Ehrenberg KR, Hövelmeyer N, et al. Liver specific deletion of CYLDexon7/8 induces severe biliary damage, fibrosis and increases hepatocarcinogenesis in mice. *J Hepatol.* 2012 Nov;57(5):995–1003.
174. Xie S, Wu Y, Hao H, Li J, Guo S, Xie W, et al. CYLD deficiency promotes pancreatic cancer development by causing mitotic defects. *J Cell Physiol.* 2019 Jun;234(6):9723–32.
175. Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibasaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, et al. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41(1):53–60.
176. van Andel H, Kocemba KA, Spaargaren M, Pals ST. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia.* 2019;33(5):1063–75.
177. Bandarra D, Biddlestone J, Mudie S, Muller HA, Rocha S. Hypoxia activates IKK-NF- κ B and the immune response in *Drosophila melanogaster*. *Biosci Rep.* 2014 Jul 29;34(4).
178. Feng T, Chen W, Zhang C, Xiang J, Ding H, Wu L, et al. The p38/CYLD Pathway is Involved in Necroptosis Induced by Oxygen-glucose Deprivation Combined with ZVAD in Primary Cortical Neurons. *Neurochem Res.* 2017 Aug;42(8):2294–304.
179. Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2015 Dec 15;309(12):C775.
180. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α . *EMBO Rep.* 2005 Apr;6(4):373–8.
181. Wu H-T, Kuo Y-C, Hung J-J, Huang C-H, Chen W-Y, Chou T-Y, et al. K63-polyubiquitinated HAUSP deubiquitinates HIF-1 α and dictates H3K56 acetylation promoting hypoxia-induced tumour progression. *Nat Commun.* 2016 Dec 9;7(1):1–17.
182. Roy A, Zhang M, Saad Y, Kolattukudy PE. Antidicer RNase activity of monocyte chemotactic protein-induced protein-1 is critical for inducing angiogenesis. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2013 Nov 15;305(10):C1021–32.
183. Bremm A, Moniz S, Mader J, Rocha S, Komander D. Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1 α homeostasis in a proteasome-independent manner. *EMBO Rep.* 2014 Dec;15(12):1268–77.

184. Altun M, Zhao B, Velasco K, Liu H, Hassink G, Paschke J, et al. Ubiquitin-specific protease 19 (USP19) regulates hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) during hypoxia. *J Biol Chem*. 2012 Jan 13;287(3):1962–9.
185. Quesada V, Díaz-Perales A, Gutiérrez-Fernández A, Garabaya C, Cal S, López-Otín C. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 30;314(1):54–62.
186. Zhang H, Zhong K, Lu M, Mei Y, Tan E, Sun X, et al. Neuroprotective effects of isosteviol sodium through increasing CYLD by the downregulation of miRNA-181b. *Brain Res Bull*. 2018;140:392–401.
187. Guo J, Shinriki S, Su Y, Nakamura T, Hayashi M, Tsuda Y, et al. Hypoxia suppresses cylindromatosis (CYLD) expression to promote inflammation in glioblastoma: possible link to acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget*. 2014 Aug 15;5(15):6353–64.