



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της σουμυλίωσης κατά την υποξία: Ο ρόλος της πρωτεΐνης Exosc10»

Φιλιππούλου Χρύσα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Επιβλέπουσα
- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής 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 Βιοχημεία

Λάρισα, Σεπτέμβριος, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
“Investigation of sumoylated proteins under hypoxia: the role of Exosc10”

Filippopoulou Chrysa

Advisory Thesis Committee:

- Georgia Chachami, Lecturer of Cellular Biochemistry, Supervisor
- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry
- Matthaios 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 Biochemistry

Larissa, September, 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέπουσα την Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας κα. Γεωργία Χαχάμη, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου από καρδιάς στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κυρία Χαχάμη Γεωργία για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου. Η βοήθεια και η καθοδήγησή της για την επίλυση διάφορων θεμάτων ήταν πολύτιμη, ενώ η στήριξη και η συνεργασία μαζί της με βοήθησε να εξελιχθώ και να βελτιώσω τις ικανότητές μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής: τον κ. Μυλωνή Ηλία, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας και τον κ. Σπελέτα Ματθαίο, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας και υπεύθυνο του Π.Μ.Σ για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας μου, και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ και κυρίως τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας κ.Γεώργιο Σίμο για όλες τις συμβουλές, τις επισημάνσεις και τις πολύτιμες γνώσεις τους που συνέβαλαν πραγματικά στον τρόπο σκέψης και εργασίας μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας: Αγγελική Καραγιώτα, Κρέων Κουκουλά, Άγγελο Υφαντή, Χρύσα Ταζέ, Κατερίνα Δισερή, Ιωάννα Γκοντινάκου, Μπεφάνη Χριστίνα για την άψογη συνεργασία και αμέριστη βοήθεια, καθώς και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και αγαπημένη μου φίλη Χριστίνα Αρσένη για την συντροφιά, την στήριξη και την βοήθειά της στη κοινή μας μέχρι τώρα πορεία τόσο στο προπτυχιακό όσο και στο μεταπτυχιακό επίπεδο.

Τέλος, οφείλω να αναφέρω και να ευχαριστήσω θερμά από καρδιάς τα μέλη της οικογένειάς μου, τους γονείς μου, Νικόλαο Φιλιππόπουλο και Θεοδώρα Σκυλλάκου και τα αδέρφια μου, Εύη Φιλιππούλου και Φώτη Φιλιππόπουλο για την ηθική, ψυχολογική και οικονομική στήριξη όλων αυτό τον καιρό, καθώς η απεριόριστη εμπιστοσύνη, η πίστη στις ικανότητές μου και η συνεχής προσπάθεια που καταβάλλουν όλα αυτά τα χρόνια είναι ανεκτίμητη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Η Σουμοϋλίωση ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση	11
1.1.1 Οι πρωτεΐνες SUMO	11
1.1.2 Μηχανισμός σύζευξης των SUMO πρωτεϊνών στις πρωτεΐνες στόχους	13
1.1.3 Η σημασία της σουμοϋλίωσης	16
1.1.4 Στόχοι και συνέπειες της σουμοϋλίωσης	17
1.1.5 Ο ρόλος της Σουμοϋλίωσης σε διάφορες ασθένειες	18
1.1.6 Σουμοϋλίωση και απόκριση σε στρες	21
1.2 Σουμοϋλίωση και υποξία	22
1.2.1 Υποξία	22
1.2.2 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF	23
1.2.3 Η ρύθμιση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF	25
1.2.4 Γονίδια στόχοι των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF	28
1.2.5 Η επίδραση της υποξίας στην σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών	29
1.3 Η πρωτεΐνη Exosome component 10 (Exosc10) (RRP6)	31
1.3.1 Το εξώσωμα	31
1.3.2 Δομή και μορφές του εξωσώματος	32
1.3.3 Το εξώσωμα και η συσχέτιση του με ασθένειες	34
1.3.4 Η καταλυτική υπομονάδα Exosome component 10 (Exosc10) (RRP6) και η πυρηνική μορφή εξωσώματος (EXO-11)	36
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	38
3. ΥΛΙΚΑ	39

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς	39
3.2 Εκκινητές και Small Interference RNA (siRNA)	41
3.3 Βακτηριακά στελέχη.....	42
3.4 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες	42
3.5 Κυτταρικές σειρές	42
3.6 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων	42
3.7 Αντιβιοτικά	43
3.8 Ένζυμα.....	43
3.9 Αντισώματα	43
3.10 Χημικά.....	44
3.11 Διαλύματα.....	44
3.12 Αντιδραστήρια.....	47
3.13 Σφαιρίδια σεφαρόζης.....	48
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	48
4.1 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	48
4.1.1 Δημιουργία πλασμιδιακών φορέων με τις επιθυμητές μεταλλάξεις.....	48
4.1.1.α Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω νουκλεοτιδίου.....	48
4.1.2 Πολλαπλασιασμός πλασμιδιακών φορέων σε βακτηριακές καλλιέργειες	50
4.1.2.α Δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E.coli	50
4.1.2.β Μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli με θερμικό σοκ με τους πλασμιδιακούς φορείς.....	51
4.1.3 Έλεγχος ύπαρξης των πλασμιδιακών φορέων pCDNA 3.1-HA-Exosc10 <i>K168R</i> , pCDNA 3.1-HA-Exosc10 <i>K201R</i> , pCDNA 3.1-HA-Exosc10 <i>K168R-K583R</i> , pCDNA 3.1-HA-Exosc10 <i>K201R-K583R</i> με τις επιθυμητές μεταλλάξεις	52
4.1.3.α Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	52
4.1.3.β Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα	52
4.1.3.γ Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	53

4.1.4 Έλεγχος ύπαρξης των επιθυμητών μεταλλάξεων	54
4.1.4.α Αλληλούχιση δειγμάτων πλασμιδιακού DNA.....	54
4.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	54
4.2.1 Συντήρηση κυτταροκαλλιιεργειών	54
4.2.1.α Διατήρηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών μέσω τρυψινοποίησης	54
4.2.1.β Μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων – πάγωμα κυττάρων.....	54
4.2.1.γ Ξεπάγωμα κυττάρων	55
4.2.1.δ Μέτρηση κυττάρων.....	55
4.2.2 Διαμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.....	55
4.2.2.α Διαμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση του μη λιπιδικού πολυμερούς PEI	55
4.2.2.β Διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με τη χρήση λιποφεκταμίνης.....	56
4.2.3 Επώαση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa σε συνθήκες υποξίας.....	58
4.3 Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών	58
4.3.1 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες	58
4.3.1.α Προετοιμασία κυτταρικών λυμάτων.....	59
4.3.1.β Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	60
4.3.1.γ Προετοιμασία σφαιριδίων, δέσμευση και τελική έκλυση των πρωτεϊνών	60
4.3.4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	61
4.3.4.α Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση	62
4.3.4.β Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου	62
4.3.4.γ Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	62
4.3.4.δ Ανοσοανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών	63
4.3.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	63
4.3.6 Μέτρηση δραστηκότητας λουσιφεράσης	65

4.3.7 Απομόνωση πυρηνίσκων από κυτταρικά λύματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa	67
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
5.1 Μελέτη της ενδογενούς Exosc10 σε συνθήκες υποξίας.....	69
5.1.1 Μελέτη της έκφρασης της Exosc10 σε συνθήκες υποξίας.....	69
5.1.2 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της Exosc10 σε συνθήκες υποξίας.....	70
5.1.3 Ανάλυση της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 μετά από κλασμάτωση πυρηνίσκων καρκινικών κυττάρων HeLa	73
5.1.2 Μελέτη της επίδρασης της Exosc10 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας.....	78
5.2 Μελέτη της σουμυλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10.....	80
5.2.1 Εύρεση των θέσεων σουμυλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10 και δημιουργία μη σουμυλιωμένων μορφών της	80
5.2.3 Μελέτη της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 σε κύτταρα HeLa με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	84
5.2.3 Μελέτη της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 σε κύτταρα HeLa με ανοσοφθορισμό.....	85
5.2.4 Ανοσοκατακρήμιση των χμαιρικών HA-Exosc10 πρωτεϊνών για τον έλεγχο της σουμυλίωσης σε νορμοξία και υποξία.....	92
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

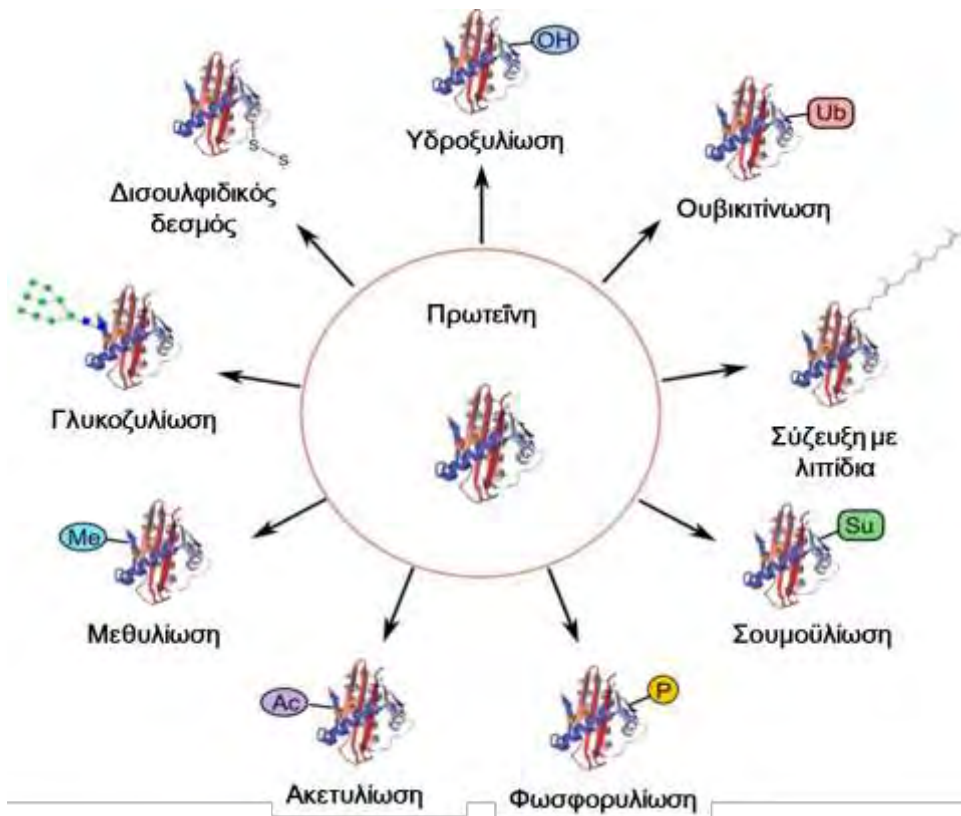
Η σουμοϋλίωση είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία πραγματοποιείται σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) σε κατάλοιπα λυσίνης πρωτεϊνών-στόχων. Αλλαγές στα επίπεδα σουμοϋλίωσης έχουν συσχετιστεί κατά καιρούς με την απόκριση των κυττάρων σε διάφορα είδη στρες όπως το θερμικό σοκ, το οξειδωτικό στρες και την ισχαιμία. Ένας μικρός αριθμός μελετών αναφέρουν την εμπλοκή της σουμοϋλίωσης στο μηχανισμό απόκρισης των κυττάρων κατά την υποξία. Ως υποξία ορίζεται η μειωμένη διαθεσιμότητα O₂ στα κύτταρα, τους ιστούς ή και σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αποτελέσματα πειραμάτων ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών που έγιναν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (SILAC) (Chachami et al,2019) έδειξαν την ύπαρξη μιας ομάδας πρωτεϊνών που παρουσίαζαν αλλαγές στην σουμοϋλίωσή τους κατά την υποξία, χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης τους. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η Exosc10 (Exosome Component 10), η οποία αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα της πυρηνικής μορφής του εξωσώματος και της μορφής του εξωσώματος στον πυρηνίσκο. Η παρούσα εργασία αποτελεί προκαταρκτική μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10 και του γενικότερου ρόλου της στην κυτταρική απόκριση στην υποξία. Συγκεκριμένα δείχθηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ανοσοφθορισμού και κλασμάτωσης πως παρότι η έκφραση της ενδογενούς Exosc10 δεν αλλάζει στην υποξία, παρατηρείται μια μετατόπιση κλάσματος της πρωτεΐνης από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα. Επιπλέον δείχθηκε πως η αποσιώπηση της Exosc10 δεν επιδρά στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, του κύριου μεταγραφικού παράγοντα της υποξίας. Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω το ρόλο της Exosc10 στην υποξία αλλά και την σημασία της σουμοϋλίωσης σε αυτήν, δημιουργήσαμε χιμαιρικές πρωτεΐνες HA-Exosc10 στις οποίες έχουν μεταλλαχθεί πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης (*K168R*, *K201R*, *K583R*, *K168R-K583R*, *K201R-K583R*). Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δείχθηκε πως η Lys583 είναι πιθανά η κύρια θέση σουμοϋλίωσης. Η/Οι κατασκευές οι οποίες παράγουν μορφές της Exosc10 που στερούνται την ικανότητα σουμοϋλίωσης θα χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα με στόχο την διασαφήνιση του ρόλου της σουμοϋλίωσης στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης Exosc10 και στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.

ABSTRACT

SUMOylation is a post-translational modification in which SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) proteins are covalently attached to lysine residues of the target proteins. Changes in the global SUMOylation levels have been correlated at times with the cellular response under different kinds of stress such as heat shock, oxidative stress and ischemia. A small number of studies refer to the implication of SUMOylation in the adapted response mechanisms of cells under hypoxia. Hypoxia is defined by the low abundance of O₂ in cells, tissues or even in whole organisms. Quantitative proteomic analysis experiments of SUMOylated proteins performed under normoxic and hypoxic conditions (SILAC) [135] revealed a group of proteins whose SUMOylation status changed without concomitant change in abundance under hypoxia. Exosome component 10 (Exosc10), which constitutes the catalytic subunit of the nuclear and nucleolar exosome, is one of these proteins. This work is a preliminary study of Exosc10 SUMOylation and its general role in cellular adaptation under hypoxia. In particular, Western blot analysis, immunofluorescence and cellular fractionation experiments showed that, despite the fact that the expression levels of Exosc10 do not change under hypoxic conditions, a fraction of Exosc10 shifts from nucleoli to nucleoplasm. Furthermore, silencing of Exosc10 shows no effect on the transcriptional activity of HIF-1, the master regulator of the hypoxic response. Aiming to study the role of Exosc10 and its SUMOylation in hypoxia, we created chimeric HA-Exosc10 proteins carrying mutations in possible SUMO sites (*K168R*, *K201R*, *K583R*, *K168R-K583R*, *K201R-K583R*). Immunoprecipitation revealed Lys583 as a major possible SUMO site. The identification of the construct/s coding the form of Exosc10 that lacks SUMOylation will set the basis for further experiments aiming to shed light on the role of SUMOylation in Exosc10 and in general in hypoxic response.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, ανεξαρτήτου τύπου και προέλευσης προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους διαθέτουν βασικούς μηχανισμούς ρύθμισης των πρωτεϊνών τους. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς ρύθμισης είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (Post-Translational Modifications, PTMs). Ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση ορίζεται η ομοιοπολικής φύσης επεξεργασία των πρωτεϊνών που συμβαίνει μετά τη μετάφραση, η οποία αλλάζει τις ιδιότητες αυτών είτε μέσω πρωτεόλυσης είτε μέσω προσθήκης μίας ειδικής ομάδας (π.χ φωσφορική ομάδα) σε ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα. Οι τροποποιήσεις αυτές καθορίζουν ιδιότητες των πρωτεϊνών όπως τη δραστηριότητα, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες [1]. Υπάρχει μια τεράστια γκάμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με τον αριθμό αυτών να ξεπερνά τις 450, ενώ συνεχώς ανακαλύπτονται καινούργιες [2]. Οι πιο συχνές από αυτές απεικονίζονται στην Εικόνα 1. Μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σουμοϋλίωση (SUMOylation) πρωτεϊνών.



Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα με τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Πηγή: Creative Proteomics Blog

1.1 Η Σουμοϋλίωση ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση

Η σουμοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία συναντάται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ απουσιάζει από τα βακτήρια και τα αρχαία. Κατά την τροποποίηση αυτήν λαμβάνει χώρα η αντιστρεπτή, ομοιοπολική σύνδεση των SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) πρωτεϊνών σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων [3]. Ορισμένες SUMO πρωτεΐνες λειτουργούν οι ίδιες ως στόχοι για σουμοϋλίωση, προκύπτοντας έτσι αλυσίδες SUMO (πολύ-σουμοϋλίωση) [4]. Η ενεργοποιητική πρωτεΐνη της Ran GTPάσης RanGAP1 ήταν η πρώτη πρωτεΐνη η οποία ανακαλύφθηκε να σουμοϋλιώνεται και μάλιστα η τροποποίηση αυτή συνεισφέρει στον εντοπισμό της πρωτεΐνης στους πυρηνικούς πόρους και στην αλληλεπίδρασή της με την νουκλεοπορίνη RanBP2 (γνωστή και ως NUP358) [5].

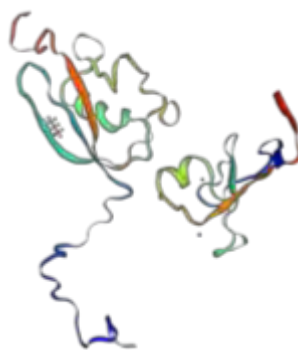
1.1.1 Οι πρωτεΐνες SUMO

Οι πρωτεΐνες SUMO έχουν μέγεθος ~10kDa και ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών που ομοιάζουν στην ουβικιτίνη (ubiquitin-like proteins, Ubls) [6]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την κλασική αναδίπλωση της ουβικιτίνης η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, και περιλαμβάνει την δομή β-grasp fold αποτελούμενη από ένα πενταμερές β-πτυχωτό φύλλο γύρω από μία κεντρική α-έλικα [7]. Διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο το οποίο αποκαλύπτεται ύστερα από μία διαδικασία πρωτεολυτικής «ωρίμανσης» της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνο για την σύζευξη με την πρωτεΐνη στόχο.



Εικόνα 2: Τρισδιάστατο μοντέλο απεικόνισης της ουβικιτίνης (UBQ). Διακρίνεται η β-grasp πτύχωση. Πηγή: RCSB PDB

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των SUMO πρωτεϊνών, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3, η οποία παρουσιάζει την τρισδιάστατη δομή μίας ισομορφής SUMO, είναι το αμινοτελικό τους άκρο, 20 περίπου αμινοξέων, το οποίο φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στην δημιουργία των SUMO αλυσίδων [8].



Εικόνα 3: Τρισδιάστατο μοντέλο απεικόνισης της ισομορφής SUMO1. Με μπλε διακρίνεται το αμινοτελικό άκρο, απαραίτητο για το σχηματισμό SUMO αλυσίδων. Πηγή: SWISS-MODEL

Στο σύνολο των ευκαρυωτικών οργανισμών έχει βρεθεί η ύπαρξη τουλάχιστον μίας πρωτεΐνης SUMO. Οργανισμοί όπως οι ζύμες, ο *Caenorhabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster* διαθέτουν ένα μόνο γονίδιο SUMO, ενώ ανώτεροι οργανισμοί όπως τα φυτά και τα σπονδυλωτά διαθέτουν πολλαπλά γονίδια SUMO. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 4 διακριτές SUMO πρωτεΐνες, οι SUMO1, SUMO2, SUMO3 και SUMO4 [9]. Οι ώριμες SUMO2 και SUMO3 πρωτεΐνες αποτελούνται από 92 και 93 αμινοξέα αντίστοιχα και παρουσιάζουν 97% ομοιότητα, γι' αυτό τον λόγο συχνά αναφέρονται ως μία κοινή οικογένεια SUMO πρωτεϊνών, την SUMO2/3. Η SUMO1 πρωτεΐνη διαφέρει αρκετά παρουσιάζοντας 47% ομοιότητα με τις SUMO2/3, ενώ ο ρόλος της SUMO4 παραμένει αδιευκρίνιστος ως προς την ικανότητα «ωρίμανσης» και άρα σύνδεσης της σε υποστρώματα-στόχους [10].

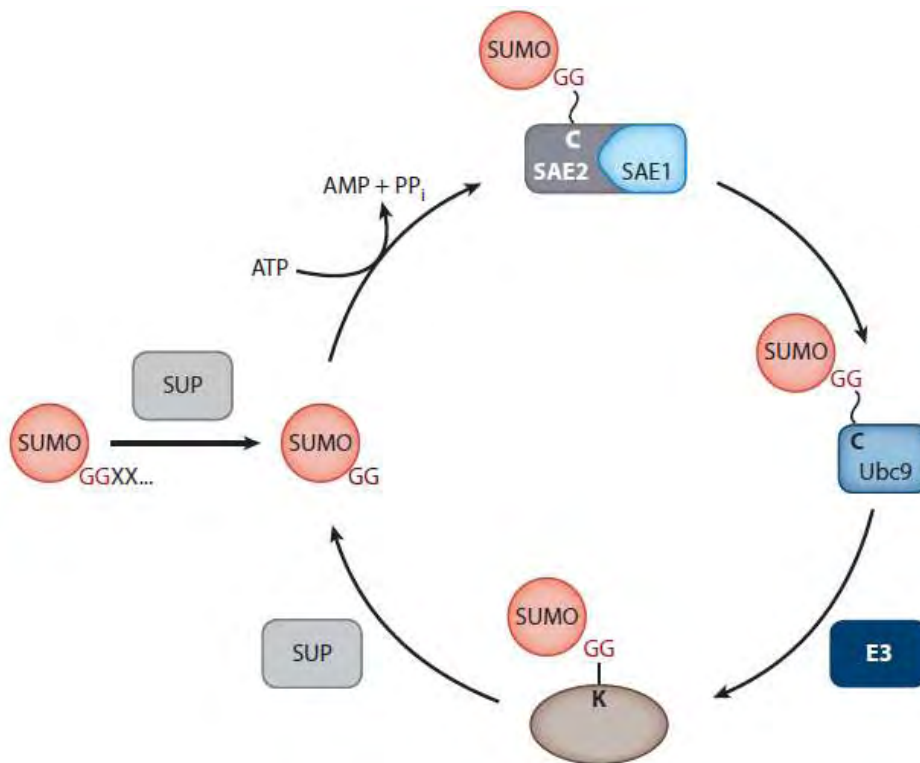
Οι πρωτεΐνες SUMO1 και SUMO2/3 παρότι μοιράζονται τους ίδιους μηχανισμούς (τα ίδια ένζυμα) σύζευξης διαφέρουν μεταξύ τους σε αρκετά σημεία, όπως για παράδειγμα στην ευαισθησία τους σε ισοπεπτιδάσες, στην ικανότητά τους (SUMO2/3) ή ανικανότητά τους (SUMO1) να διαμορφώνουν SUMO αλυσίδες [11], στην επιλογή των πρωτεϊνών-στόχων και κατά συνέπεια στον καθορισμό των λειτουργιών τους [12]. Οι SUMO πρωτεΐνες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια με τα επίπεδα έκφρασης της SUMO1 να είναι πολύ χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά των SUMO2/3 [13]. Εξάιρεση αποτελεί η SUMO4 η οποία φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στα νεφρά, τον σπλήνα και τους λεμφαδένες, ενώ πρόσφατα διαπιστώθηκε η έκφρασή της στα κύτταρα του ανθρώπινου πλακούντα [14].

Ένα άλλο σημείο διαφοράς των SUMO πρωτεϊνών είναι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός τους. Οι SUMO2/3 συναντώνται κυρίως στο πυρηνόπλασμα και τα πυρηνικά σωμάτια, ενώ η SUMO1 δείχθηκε ότι εστιάζεται πέραν του πυρηνόπλασματος, στην πυρηνική μεμβράνη και στους πυρηνίσκους [15]. Τα τελευταία χρόνια, πέραν του μεγάλου αριθμού σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται σε διαδικασίες εντός του πυρήνα όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η

επιδιόρθωση του DNA και η μεταγραφή, έχει διατυπωθεί και ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο κυτταρόπλασμα, όπως αναλύεται παρακάτω (βλ. 1.1.4 Στόχοι και συνέπειες της σουμοϋλίωσης).

1.1.2 Μηχανισμός σύζευξης των SUMO πρωτεϊνών στις πρωτεΐνες στόχους

Η σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες στόχους επιτυγχάνεται μέσω SUMO-ειδικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) δρουν με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της ουβικιτίνωσης [16]. Τα στάδια του μηχανισμού σύζευξης αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω και παρουσιάζονται στην Εικόνα 4:



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης. (1) Δράση των SUMO-ισοπεπτιδασών και πρωτεολυτική ωρίμανση της SUMO, (2) αποκάλυψη του μοτίβου γλυκίνης-γλυκίνης και (3) ενεργοποίηση της SUMO από το ετεροδιμερές SAE1-SAE2. (4) σύζευξη με τη λυσίνη στόχο μέσω του ενζύμου E3 και (5) αντιστροφή της τροποποίησης με τη δράση των SUMO-ισοπεπτιδασών. Πηγή:[4]

Ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες SUMO εκφράζονται, αρχικά, στην «ανώριμη» μορφή τους. Ακολουθεί μία πρωτεόλυση στο καρβοξυ-τελικό άκρο των SUMO από ειδικές πρωτεάσες της οικογένειας SENP (sentrin/SUMO-specific protease), ώστε να «αποκαλυφθεί» το χαρακτηριστικό μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης στο καρβόξυ-τελικό άκρο των SUMO πρωτεϊνών, προκειμένου μέσω αυτού να συζευχθούν με κατάλοιπα λυσινών των πρωτεϊνών στόχων.

Ενεργοποίηση των SUMO πρωτεϊνών

Η ενεργοποίηση των «ώριμων» SUMO πρωτεϊνών πραγματοποιείται από το «ενεργοποιητικό» E1 ένζυμο, ένα ετεροδιμερές το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες τις SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1, Aos1) και SAE2 (SUMO-activating enzyme subunit 2, Uba2) [17]. Μέσω της κατανάλωσης ενέργειας από την υδρόλυση του ATP, δημιουργείται ένας θειοεστερικός δεσμός μεταξύ της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της υπομονάδας SAE2 του ενζύμου E1 και του τελικού καταλοίπου γλυκίνης του καρβόξυ-τελικού άκρου της SUMO. Στην συνέχεια, η ενεργοποιημένη SUMO μέσω της δημιουργίας ενός νέου θειοεστερικού δεσμού μεταφέρεται στο υπεύθυνο για την τελική σύζευξη ένζυμο E2 Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9).

Σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες στόχους

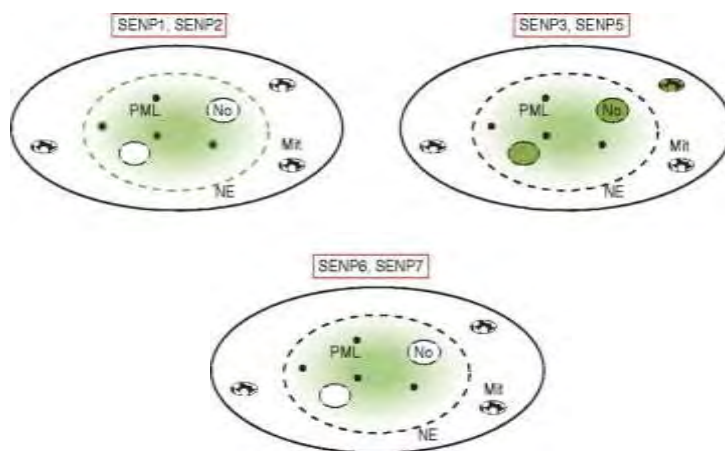
Το ένζυμο Ubc9 έχει την ικανότητα, της οποίας στερούνται τα κλασικά ειδικά για την ουβικιτίνη ένζυμα E2, να επιλέγει και να προσδένεται απευθείας στις πρωτεΐνες στόχους αναγνωρίζοντας ένα ειδικό μοτίβο (consensus motif) ψ KxD/E, όπου ψ αντιστοιχεί σε ένα μεγάλο υδρόφοβο αμινοξικό κατάλοιπο, το K είναι η κύρια λυσίνη στόχος [18], ακολουθούμενη από ένα οποιοδήποτε αμινοξύ και στη συνέχεια από κατάλοιπο ασπαραγινικού ή γλουταμινικού. Το τυπικό αυτό μοτίβο (ψ KxD/E) εμπεριέχεται σε περίπου το 75% των γνωστών έως τώρα πρωτεϊνών στόχων, ενώ σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται και σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών σε λυσίνες εκτός του τυπικού προτύπου [19]. Παρά την ικανότητα του Ubc9 να αναγνωρίζει και να προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων για την επίτευξη της σύζευξης απαιτείται η συνεργασία του με ειδικές SUMO E3 λιγασές. Οι E3 λιγασές καταλύουν την μεταφορά της ουβικιτίνης ή των πρωτεϊνών Ubl, στην συγκεκριμένη περίπτωση των SUMO, από το ένζυμο E2 σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου [20]. Ο αριθμός των E3 λιγασών οι οποίες έχουν βρεθεί έως τώρα να εμπλέκονται στο μηχανισμό σουμουλίωσης είναι μικρός σε σύγκριση με τον αριθμό αυτών του συστήματος της ουβικιτίνης, όπου ανέρχονται στις εκατοντάδες [21], και μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η μεγαλύτερη οικογένεια των χαρακτηρισμένων έως τώρα SUMO E3 λιγασών είναι αυτή των Siz/PIAS RING E3 λιγασών. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί έξι μέλη, οι ανασταλτικές πρωτεΐνες των ενεργοποιημένων STAT (Protein Inhibitor of Activated STAT, PIAS), PIAS1, οι ισομορφές PIAS α και PIAS β , η PIAS3, PIASy και η Nse2/Mms21 [22]. Η ύπαρξη της συντηρημένης SP-RING περιοχής σε αυτή την κατηγορία E3 λιγασών πιστεύεται ότι βοηθάει στην στρατολόγηση του ενζύμου E2, που φέρει την πρωτεΐνη SUMO σε γειτνίαση με τις πρωτεΐνες στόχους [23]. Μια δεύτερη κατηγορία ειδικών για τη SUMO E3 λιγασών αποτελεί η νουκλεοπορίνη RanBP2/Nup358, η οποία δεν έρχεται σε άμεση επαφή με την πρωτεΐνη στόχο αλλά οδηγεί σε

κατάλληλο προσανατολισμό το σύμπλοκο E2-SUMO με τον στόχο, διευκολύνοντας την κατάλυση και αλληλεπίδραση του ενεργού κέντρου του ενζύμου E2 με αυτόν [24]. Κάποιες άλλες πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αναφερθεί να έχουν δράση E3 λιγασών είναι η μικρή G πρωτεΐνη Rhes [25], η απακετυλάση των ιστονών 4 (HDAC4) [26], η πρωτεΐνη TOPORS (topoisomerase I-binding RING finger protein) [27] και η ανθρώπινη polycomb 2 (PC2) [28].

Από-σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών

Η αντιστρεπτή φύση της σουμοϋλίωσης στηρίζεται στην δράση των ίδιων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών, των ενζύμων SENP. Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 6 ένζυμα της οικογένειας SENP οι SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 και SENP7 τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό, την προτίμηση στις SUMO πρωτεΐνες, αλλά και ως προς την προτίμησή τους στην ωρίμανση ή την από-σουμοϋλίωση [29]. Ανάλογα με τις παραπάνω ιδιότητες και διαφορές μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τις SENP1 και SENP2 οι οποίες δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη προτίμηση ως προς την SUMO1 ή SUMO2/3 και συμμετέχουν τόσο στην ωρίμανση όσο και στην από-σουμοϋλίωση [3031]. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τις SENP3 και SENP5, οι οποίες παρουσιάζουν προτίμηση ως προς τις SUMO2/3 [32], και μια τρίτη κατηγορία η οποία περιλαμβάνει τις SENP6 και SENP7. Οι δύο αυτές πρωτεάσες παρουσιάζουν ομοίως προτίμηση ως προς τις SUMO2/3 και η κύρια συμμετοχή τους αφορά την επεξεργασία ή αποσύζευξη SUMO2/3 αλυσίδων [3334].

Οι SUMO ισοπεπτιδάσες έχουν χαρακτηριστικό εντοπισμό εντός των κυττάρων (Εικόνα 5). Αποτέλεσμα αυτού είναι ο περιορισμός της δράσης τους σε συγκεκριμένους στόχους [29]. Πιο συγκεκριμένα, οι SENP1 και SENP2 εντοπίζονται κυρίως στον πυρηνικό φάκελο λόγω των αλληλεπιδράσεων τους με πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων και στα πυρηνικά σωμάτια [35]. Κατά την μίτωση, τα ένζυμα αυτά από τους πυρηνικούς φακέλους διανέμονται στον κινητοχώρο [36], ενώ η SENP2 έχει την ικανότητα να μετακινείται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος [37]. Τα ένζυμα SENP3 και SENP5 εντοπίζονται κυρίως στους πυρηνίσκους όπου εμπλέκονται στην ωρίμανση των ριβοσωμάτων [38], αλλά ένα μικρό τους ποσοστό συναντάται στο πυρηνόπλασμα και στο κυτταρόπλασμα. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι το ένζυμο SENP5 κατά την μετάβαση από την φάση G2 στην φάση M, πριν την κατάρρευση του πυρηνικού φακέλου, μετατοπίζεται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων [39]. Τέλος, τα ένζυμα SENP6 και SENP7 εντοπίζονται κυρίως στο πυρηνόπλασμα.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυτταρικής κατανομής των SUMO ισοπεπτιδασών της οικογένειας SENP στα θηλαστικά. Η κύρια κατανομή της κάθε ισομορφής SENP σημειώνεται με πράσινο. Συντομογραφίες: Mit, μιτοχόνδρια; NE, πυρηνικός φάκελος; No, πυρηνίσκος; PML, πυρηνικά σωμάτια. Πηγή:[29] Τροποποιημένη.

1.1.3 Η σημασία της σουμοϋλίωσης

Η μεγάλη σημασία της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της σουμοϋλίωσης αναδείχθηκε μέσω πειραμάτων αποσιώπησης του ενζύμου Ubc9. Η απενεργοποίηση του γονιδίου του Ubc9 έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αποτροπή της σουμοϋλίωσης καθώς είναι το μόνο ένζυμο E2 υπεύθυνο για τη σύζευξη της SUMO με τις πρωτεΐνες στόχους [22]. Έμβρυα ποντικών στα οποία έγινε απενεργοποίηση του γονιδίου της Ubc9 ήταν μη βιώσιμα από τα πρωταρχικά κιόλας στάδια μετά την εμφύτευση, ενώ βλαστοκύστες που φέρουν μεταλλαγμένη μορφή του Ubc9 είναι βιώσιμες, όμως μετά το πέρας 2 ημερών αδυνατούν να επεκταθούν και οδηγούνται σε απόπτωση. Επίσης, κύτταρα στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο Ubc9 παρουσιάζουν σοβαρές βλάβες στην οργάνωση του πυρήνα, όπως δυσμορφίες στην δομή του πυρηνικού φακέλου και ρήξη των πυρηνίσκων και τον πυρηνικών σωμάτων [40]. Την σημασία της σουμοϋλίωσης τονίζουν, επίσης, *in vivo* πειράματα αποσιώπησης των πρωτεϊνών SUMO. *In vivo* μελέτη σε ποντίκια knockout για την ισομορφή SUMO-1 έδειξε ότι η έλλειψη αυτής μπορεί να αντικατασταθεί από τις ισομορφές SUMO-2 και SUMO-3, ενώ τα ζώα ήταν βιώσιμα [41],[42]. Παρόλα αυτά μία μεταγενέστερη αντίστοιχη μελέτη έδειξε ότι ετερόζυγα και ομόζυγα ποντίκια SUMO-1/knockout παρουσίασαν σοβαρά καρδιακά προβλήματα και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας [43]. Ομοίως, ποντίκια knockout για την ισομορφή SUMO-2 εμφάνισαν σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα και θνησιμότητα με αποτέλεσμα να χαρακτηριστούν ως μη βιώσιμα, ενώ αντίστοιχα ποντίκια knockout για την SUMO-3 δεν παρουσίασαν αλλαγές στον φαινότυπο [44].

Πέραν της σημασίας της ύπαρξης της σουμοϋλίωσης, εξίσου σημαντική είναι και η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της σουμοϋλίωσης και από-σουμοϋλίωσης προκειμένου να εξασφαλιστεί η

φυσιολογική κυτταρική ομοίωση. Έχει δείξει με μελέτες σε ποντίκια όπου έχουν απενεργοποιηθεί τα υπεύθυνα γονίδια για τα ένζυμα SENP1 και SENP2, ότι η επικείμενη αύξηση της σουμοϋλίωσης οδηγεί σε θνησιμότητα των εμβρύων [45],[46]. Επίσης, αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των SENP φαίνεται να διαταράσσουν την SUMO ομοιοστασία και να οδηγούν στην εκδήλωση καρκίνου. Συγκεκριμένα, η ισομορφή SENP1 υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και αυτή η αύξηση φαίνεται να συμβάλλει στην μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων του επιθηλίου του προστάτη σε δυσπλαστικά [47]. Αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του προστάτη εμφανίζει και η ισομορφή SENP3, ενώ πειράματα υπερέκφρασης της ισομορφής αυτής σε καρκινικά κύτταρα HeLa έδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων SENP3 οδηγεί στην εκδήλωση πιο επιθετικών όγκων [48]. Στον καρκίνο του μαστού, από την άλλη πλευρά, βρέθηκε μείωση των επιπέδων της ισομορφής SENP6 σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του μαστού υποδηλώνοντας την αύξηση των επιπέδων σουμοϋλίωσης σε αυτά και τον πιθανό ρόλο της στην εκδήλωση του καρκίνου [49].

1.1.4 Στόχοι και συνέπειες της σουμοϋλίωσης

Πρωτεομικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 2% του συνολικού πρωτεώματος των θηλαστικών σουμοϋλιώνεται [50], ενώ οι πρωτεΐνες στόχοι της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης ποικίλουν και αφορούν κυρίως μεταγραφικούς παράγοντες, μεμβρανικούς υποδοχείς και ένζυμα. Η σουμοϋλίωση έχει κυρίως συσχετιστεί με διαδικασίες όπως το μονοπάτι της αποικοδόμησης μέσω του πρωτεασώματος [51], την ενδοκυτταρική μεταφορά και συσσώρευση πρωτεϊνών [52], την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [53] και τη ρύθμιση της μεταγραφής [54].

Το πιο κοινό παράδειγμα πρωτεΐνης στόχου, της οποίας η σουμοϋλίωση παίζει βασικό ρόλο στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της και στην αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες, αποτελεί η RanGap1. Η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης αυτής συνεισφέρει στον εστιασμένο εντοπισμό της στους πυρηνικούς πόρους και στην αλληλεπίδρασή της με την νουκλεοπορίνη RanBP2, ενώ απουσία αυτής παύει να είναι λειτουργική [5],[55].

Ένα άλλο παράδειγμα, που αφορά την συμμετοχή της σουμοϋλίωσης στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αποτελεί το ένζυμο p300 το οποίο δρα ως ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Η σουμοϋλίωση αυτού δείχθηκε να καταστέλλει την ενεργότητά του και να διευκολύνει την αλληλεπίδρασή του με το ένζυμο απακετυλάση των ιστονών HDAC6 [56].

Οι SUMO πρωτεΐνες πέρα από την σημαντική συμμετοχή τους στη ρύθμιση μεγάλου αριθμού πυρηνικών πρωτεϊνών στοχεύει επίσης και μία ευρεία γκάμα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών [57].

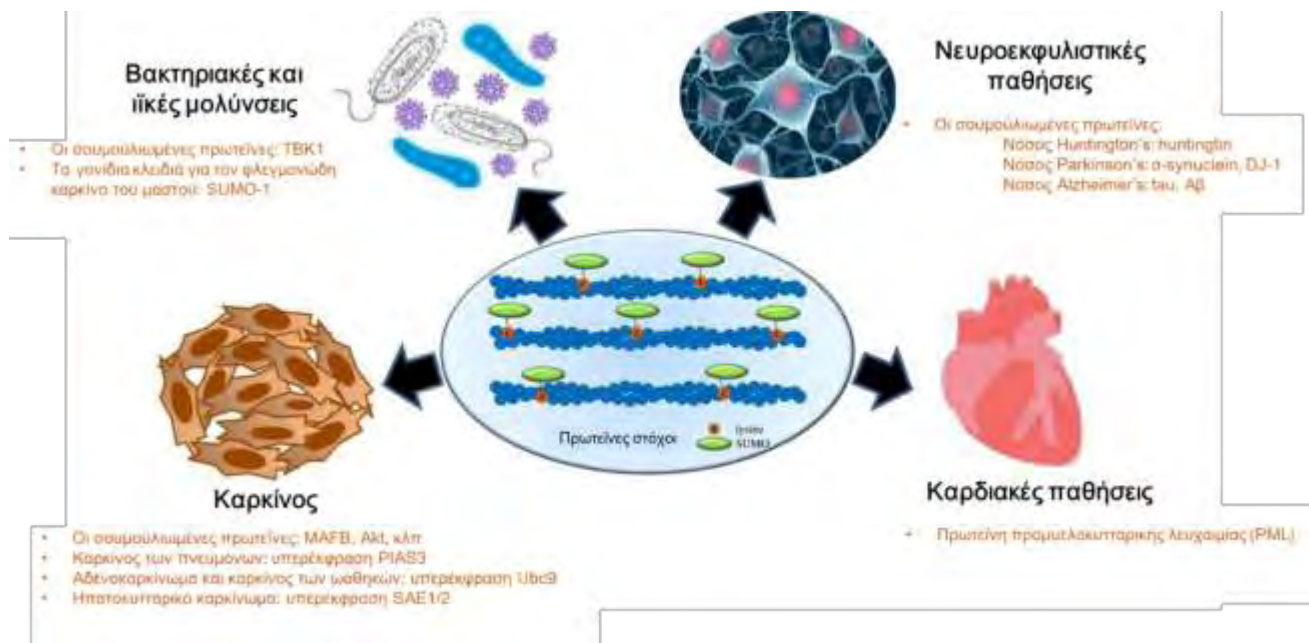
Οι στόχοι σουμοϋλίωσης εκτός του πυρήνα που ανακαλύπτονται τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν και αφορούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, διαλύτες ιόντων, g-πρωτεΐνες, μιτοχondριακές πρωτεΐνες καθώς και πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια όπως η αυτοφαγία και η εξωκύτωση (Εικόνα 6) [58].



Εικόνα 6: Η συμμετοχή σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών εκτός του πυρήνα. Πηγή:[58] Τροποποιημένη.

1.1.5 Ο ρόλος της Σουμοϋλίωσης σε διάφορες ασθένειες

Παρά την μεγάλη σημασία της σουμοϋλίωσης στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και κατά συνέπεια των οργανισμών, τα τελευταία χρόνια η τροποποίηση αυτή συσχετίζεται όλο και περισσότερο και με παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σύνοψη των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η σουμοϋλίωση. Πηγή:[59] Τροποποιημένη.

Μία από αυτές είναι και ο καρκίνος. Η αυξημένη έκφραση των ενεργοποιητικών SUMO E1 ενζύμων, των υπεύθυνων για την σύζευξη με την πρωτεΐνη στόχο SUMO E2 ενζύμων (Ubc9), των SUMO E3 λιγασών, καθώς και των SUMO πρωτεασών έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου [59]. Η βασική αυτή παρατήρηση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης των ενζύμων σουμούλιωσης αλλά και από-σουμούλιωσης, υποδεικνύει την σημασία της αύξησης των ρυθμών και επιπέδων σουμούλιωσης και από-σουμούλιωσης κατά τον καρκίνο [60]. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο καρκίνος του προστάτη, κατά τον οποίον έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης τόσο των Ubc9 και PIAS1 (E3 SUMO λιγάση) όσο και των SUMO πρωτεασών SENP1 και SENP3 όπως έχει ήδη αναφερθεί [48], ενώ γενικότερα αυξημένα επίπεδα του Ubc9 έχουν βρεθεί επίσης στο αδενοκαρκίνωμα και στον καρκίνο των ωοθηκών. Ομοίως, αυξημένα επίπεδα του ενζύμου PIAS3 έχουν ανιχνευθεί στον καρκίνο των πνευμόνων, του μαστού και του παχέος εντέρου [60]. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι αλλαγές στην έκφραση κύριων πρωτεϊνών του μηχανισμού σουμούλιωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες του μηχανισμού σουμούλιωσης και η απορρύθμισή τους στους διάφορους τύπους καρκίνου. Πηγή:[61]

Deregulated protein	Type of deregulation	Tumor type/disease	References
SUMO1	Upregulation	Anaplastic large-cell lymphoma	Villalva et al. (2002)
SUMO2, UBA2	Upregulation	Hepatocellular carcinoma	Lee and Thorgeirsson (2004)
UBC9	Upregulation	Ovarian tumor	Mo et al. (2005)
		PA-1, OVCAR-8	Mo et al. (2005)
		Human lung adenocarcinomas	McDoniels-Silvers et al. (2002)
		AML with mutations in Cebpa gene	Geletu et al. (2007)
		Metastatic cancer cell line, LNCaP	Kim et al. (2006)
PIAS3	Upregulation	Lung, breast, prostate, colon, rectum and brain tumour	Wang and Banerjee (2004)
PIASy	Downregulation	Myelodysplastic syndrome	Ueda et al. (2003)
SENP1	Upregulation	Thyroid oncocytic adenoma	Jacques et al. (2005)
	Upregulation	Human prostate cancer specimens	Cheng et al. (2006)
	Downregulation	Metastatic cancer cell line, LNCaP	Kim et al. (2006)
	Transgenic expression	Early neoplastic lesions in the prostate	Tagawa et al. (2002)
SENP1-MESDC2	Chromosomal translocation	Infantile teratoma	Veltman et al. (2005)
SENP6-TCBA1	Chromosomal translocation	Human T cell lymphoblastic lymphoma cell line HT-1	Tagawa et al. (2002), Takahashi et al. (2003)
PML-RAR α	Chromosomal translocation	APL	Takahashi et al. (2003), Wood et al. (2003)
TEL	Chromosomal translocation	Pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia	Wood et al. (2003)
RB	Mutation	Retinoblastoma tumor	Ledl et al. (2005)
p14 ^{ARF}	Mutation	Melanoma	Rizos et al. (2005)

Πέραν των πρωτεϊνών του μηχανισμού σουμυλίωσης, με την εκδήλωση καρκίνου έχουν συσχετιστεί και οι σουμυλιωμένες μορφές πρωτεϊνών στόχων. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του σουμυλιωμένου μεταγραφικού παράγοντα MAFB (v-maf avian musculoaroneurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) προωθεί την εκδήλωση καρκίνου του παχέος εντέρου και όρθου [62], ενώ η σουμυλίωση του πρωτο-ογκογονιδίου Akt οδηγεί στην ενεργοποίησή του προωθώντας την κυτταρική αύξηση και ογκογένεση [63].

Πέραν όμως, του καρκίνου η σουμυλίωση έχει μελετηθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Κατά καιρούς έχει τονισθεί, η σημασία της σουμυλίωσης στην φυσιολογική καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία [64]. Σημαντικότερη παρατήρηση αποτελούν τα σοβαρά, τόσο λειτουργικά όσο και αναπτυξιακά, καρδιακά προβλήματα σε ποντίκια knockout των ισομορφών SUMO-1 και SUMO-2 [43]. Η απορρύθμιση της ισορροπίας σουμυλίωσης από-σουμυλίωσης βρέθηκε να παίζει ρόλο στην καρδιακή ίνωση και καρδιακή ανεπάρκεια, υποδεικνύοντας έτσι ότι η στόχευση του εμπλεκόμενου SUMO μονοπατιού θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση [65].

Μία επιπλέον κατηγορία ασθενειών στις οποίες όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια μελετάται ο ρόλος της σουμυλίωσης είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Στη νόσο Huntington's, η σουμυλίωση μίας παθολογικής μορφής της υπεύθυνης για την ασθένεια πρωτεΐνης huntingtin αυξάνει τον νευροεκφυλισμό σε ποντίκια-μοντέλα της νόσου [66], ενώ στη νόσο Alzheimer's η σουμυλίωση της πρωτεΐνης tau, η οποία συγκεντρώνεται σε ινίδια και σχηματίζει τις χαρακτηριστικές εμπλοκές μέσα στους νευρώνες ασθενών, πιστεύεται ότι ανταγωνίζεται την ουβικιτίνωση και κατά συνέπεια την αποικοδόμηση της συμβάλλοντας στην εκδήλωση της νόσου [67]. Η α-συνουκλείνη, η οποία υπερεκφράζεται στον εγκέφαλο και σχετίζεται με την νόσο Parkinson's έχει βρεθεί ότι σουμυλιώνεται από την SUMO-1 κυρίως. Ενώ έχει δειχθεί ότι η σουμυλιωμένη DJ-1 συμμετέχει στην μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που έχουν να κάνουν με την κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες και πιθανόν να έχει κάποιο ρόλο στην εκδήλωση της νόσου [68].

Τέλος, η σουμυλίωση σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των ιών, τροποποιώντας είτε απευθείας τις ιικές πρωτεΐνες, είτε τις ενδογενείς πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αντι-ϊική άμυνα [59]. Για παράδειγμα, η κινάση TBK1 (TANK-binding kinase 1), η οποία είναι γνωστή για τον ρόλο της στην απόκριση έναντι ιών ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η αυτοφαγία, προκειμένου να δράσει αμυντικά απαιτεί πρώτα την σουμυλίωσή της [69].

1.1.6 Σουμοϋλίωση και απόκριση σε στρες

Οι συνέπειες της SUMO τροποποίησης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 1.1.4 Στόχοι και συνέπειες της σουμοϋλίωσης) για τις πρωτεΐνες στόχους ποικίλλουν και αφορούν κυρίως στην ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, στην δραστηριότητα ενζύμων και υποδοχέων, στο μονοπάτι της αποικοδόμησης κυρίως μέσω του πρωτεασώματος, στην ενδοκυτταρική μεταφορά και συσσώρευση πρωτεϊνών, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Η σουμοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία χρησιμοποιείται από τα κύτταρα και ως ένας τρόπος προσαρμογής στις τυχόν αλλαγές του περιβάλλοντος τους. Μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν δείξει τη σημασία της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική απόκριση και προσαρμογή υπό συνθήκες στρες όπως για παράδειγμα το θερμικό στρες, το οξειδωτικό στρες και την ισχαιμία. Ο μηχανισμός ρύθμισης αυτός ως απόκριση των κυττάρων συμβαίνει είτε στο επίπεδο της πρωτεΐνης στόχου είτε στο ευρύτερο επίπεδο αλλαγών του συνολικού προτύπου σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών [70].

Σουμοϋλίωση και θερμικό στρες

Σε συνθήκες θερμικού στρες έχει παρατηρηθεί μια μαζική αύξηση της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών μέσω της σύζευξης των SUMO2/3 ισομορφών, η οποία δεν παρατηρείται όμως για την ισομορφή SUMO1 [71]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης Heat shock factor 1 (HSF1), ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος ρυθμίζει την επαγόμενη από το θερμικό στρες μεταγραφή, των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) [72] αυξάνεται δραματικά σε συνθήκες θερμικού στρες αυξάνοντας παράλληλα τη δράση του [73]. Μια ακόμη μελέτη έδειξε ότι το θερμικό στρες επάγει την ταχύτατη και μαζική αλλαγή στην σουμοϋλίωση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη.

Σουμοϋλίωση και οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις κυρίως στις φλεγμονώδεις διαδικασίες όπου υπάρχει ανισορροπία ανάμεσα στην υπέρμετρη παραγωγή ROS (O_2^- , HO^\bullet , H_2O_2) και στην περιορισμένη ικανότητα των κυττάρων να τις εξουδετερώσουν. Οι αλλαγές στα επίπεδα σουμοϋλίωσης παρουσία οξειδωτικών εξαρτώνται από την διάρκεια και την ένταση του στρες [70]. Σε συνθήκες ήπιου στρες (συγκέντρωση H_2O_2 <1mM), παρατηρείται αναστολή της σουμοϋλίωσης λόγω του σχηματισμού αντιστρεπτών διθειοϋλφιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο των ενζύμων E1 και E2 [75]. Όσο η ένταση του στρες αυξάνεται (συγκέντρωση H_2O_2 100 mM), παρατηρείται αύξηση των επιπέδων σουμοϋλίωσης μέσω των ισομορφών SUMO-

2/3, λόγω της απενεργοποίησης των SENP ισοπεπτιδασών και την, κατά συνέπεια, απενεργοποίηση του μηχανισμού από-σουμοϋλίωσης [76]. Παράδειγμα πρωτεΐνης της οποίας η σουμοϋλίωση παίζει σημαντικό ρόλο κατά το οξειδωτικό στρες αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας SMAD4, ένας κύριος επαγωγέας των σηματοδοτικών μονοπατιών της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP) και του αυξητικού παράγοντα TGF-β, ο οποίος ρυθμίζει μιτοχονδριακές και αποπτωτικές λειτουργίες [77]. Δείχθηκε ότι ο SMAD4 αναστέλλει την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση κυττάρων οστεοβλάστη hFOB1 και αυτή του η δράση έχει άμεση σχέση με τη σουμοϋλίωσή του από τις SUMO2/3 [78].

1.2 Σουμοϋλίωση και υποξία

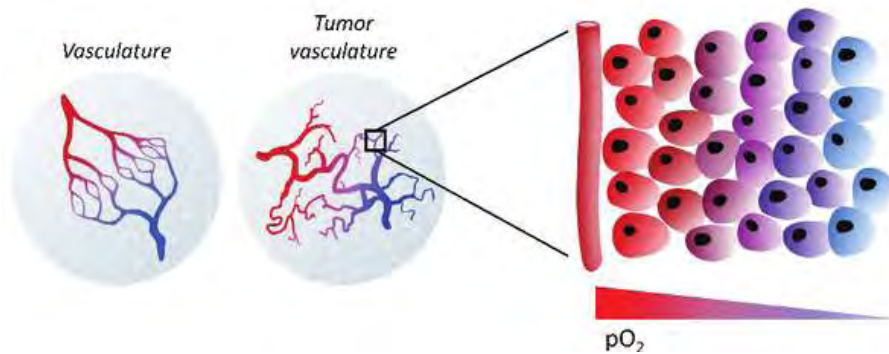
Η παρούσα διπλωματική εργασία σχετίζεται με την μελέτη της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στην υποξία, γι' αυτό το λόγο αναλύεται παρακάτω λεπτομερώς η υποξία καθώς και τα μονοπάτια και οι μηχανισμοί απόκρισης των κυττάρων στην υποξία και τέλος η σχέση σουμοϋλίωσης και υποξίας.

1.2.1 Υποξία

Ως υποξία ορίζεται η μειωμένη διαθεσιμότητα O₂ στα κύτταρα, τους ιστούς ή και σε ολόκληρο τον οργανισμό. Η υποξία έχει κατά καιρούς συσχετιστεί τόσο με φυσιολογικές όσο και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται αλλαγές στα επίπεδα οξυγόνου στο περιβάλλον τους. Έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να αποκρίνονται κατάλληλα στην υποξία είτε αυτή είναι οξεία (διάρκεια από δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά), είτε χρόνια (διάρκεια από λεπτά έως ώρες). Κατά την οξεία υποξία, συμβαίνουν γρήγορες αλλά παροδικές αλλαγές κυρίως μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ήδη υπάρχουσες πρωτεΐνες, ενώ κατά την χρόνια υποξία παρατηρούνται αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και στη πρωτεϊνσύνθεση [79].

Υποξία σε φυσιολογικές καταστάσεις, παρατηρείται κατά την έκθεση των οργανισμών σε υψηλό υψόμετρο [80] ή κατά την έντονη άσκηση [81], ενώ η ύπαρξή της έχει κριθεί απαραίτητη σε βιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυογένεση και η ομαλή λειτουργία των βλαστοκυττάρων [82]. Έχειδειχθεί ότι τα έμβρυα των θηλαστικών αναπτύσσονται σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου και είναι απαραίτητη η δράση των HIF για τον φυσιολογικό σχηματισμό του πλακούντα, της καρδιάς και των χόνδρων [83]. Όσον αφορά τα βλαστικά κύτταρα, βρέθηκε ότι η υποξία και οι HIF βοηθούν στην συντήρηση των καλλιιεργειών εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, στην παραγωγή επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων και στην σωστή λειτουργία των αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων [84].

Από την άλλη πλευρά, η υποξία έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Οι στερεοί κακοήθεις όγκοι, πολύ συχνά, εμφανίζουν υποξικές περιοχές [85]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, η ανώμαλη αγγειογένεση και ο αυξημένος σχηματισμός μη λειτουργικών αιμοφόρων αγγείων σε ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους αποτελεί την βασική αιτία της ανάπτυξης των υποξικών αυτών περιοχών [86].



Εικόνα 8: Το μικροπεριβάλλον του όγκου και οι υποξικές περιοχές του. Οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης των όγκων αναστέλλουν την ομαλή αγγειογένεση αυτού, προκαλώντας την μειωμένη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο και την εμφάνιση υποξικών περιοχών. Πηγή:[87]

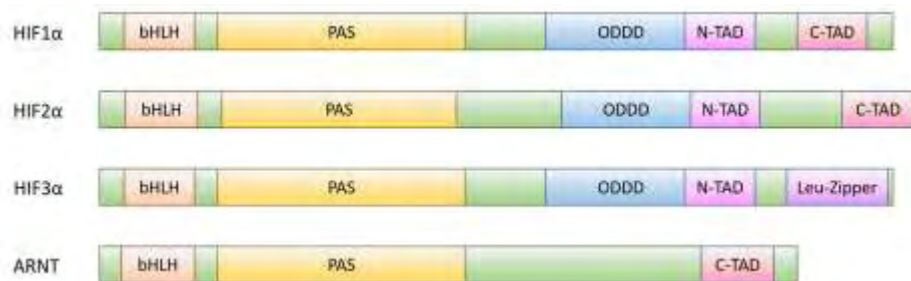
Η υποξία όχι μόνο παρατηρείται στους στερεούς όγκους αλλά και έχει δειχθεί ότι βοηθάει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και στην εξάπλωση των όγκων [88]. Ρυθμίζοντας τον αγγειογενετικό παράγοντα Vascular endothelial growth factor (VEGF) [89], διαταράσσει την ισορροπία στην παραγωγή των προ- και αντι- αγγειογενετικών παραγόντων προωθώντας την ταχύτατη και ανώμαλη ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων [90]. Έχει δειχθεί επίσης ότι αυξάνει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για μετανάστευση (migration) και διείσδυση (invasion) μέσω της εμπλοκή της στη διαδικασία EMT (epithelial-mesenchymal transition) [91]. Τέλος, η υποξία προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα έναντι στις κλασσικές αντικαρκινικές θεραπείες (χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία), αναστέλλοντας την απόπτωση και την γήρανση των κυττάρων και ελέγχοντας την αυτοφαγία και την λειτουργία των μιτοχονδρίων [92]. Τα χαμηλά, επίσης, επίπεδα οξυγόνου επηρεάζουν την μεταφορά και είσοδο των φαρμάκων στα καρκινικά κύτταρα και αναστέλλουν την κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [93].

1.2.2 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που είναι γνωστοί ως επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIFs είναι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA της μορφής έλικα-θηλειά-έλικα (helix-loop-helix, bHLH) και λειτουργούν ως ετεροδιμερή αποτελούμενα από μία οξυγόνο-ρυθμιζόμενη άλφα υπομονάδα και μία σταθερή βήτα υπομονάδα [94],[95].

Στα θηλαστικά υπάρχουν 3 ισομορφές της ρυθμιζόμενης από το οξυγόνο HIFα υπομονάδας: οι HIF-1α, HIF-2α (γνωστή και ως EPAS1) και HIF-3α (ή IPAS). Οι δύο πρώτες ισομορφές είναι οι πιο καλά χαρακτηρισμένες, ενώ η ισομορφή HIF3α συναντάται ως πολλαπλές μορφές εναλλακτικού ματίσματος, κάποιες από τις οποίες έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δράση των HIF-1α και HIF-2α [96]. Η σταθερή HIFβ υπομονάδα, η οποία αναφέρεται και ως ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) κωδικοποιείται από δύο γονίδια τα ARNT1 και ARNT2 [97].

Ο HIF-1α εκφράζεται καθολικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ οι HIF2α και HIF3α παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση. Οι HIF εντοπίζονται σε τύπους κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα, τα επιφανειακά επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, τα ενδιάμεσα νεφρικά κύτταρα και τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα [86]. Οι HIF-1α και HIF-2α εμφανίζουν 48% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξικών καταλοίπων τους καθώς και παρόμοια δομή [98]. Οι λειτουργικές περιοχές των διαφόρων ισομορφών της HIF-α και HIF-β υπομονάδας παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9 : Δομικές περιοχές των HIF-α και HIF-1β. Τα ποσοστά αναφέρονται στην ομολογία των αμινοξέων με την ισομορφή HIF-1α. Πηγή: [99]

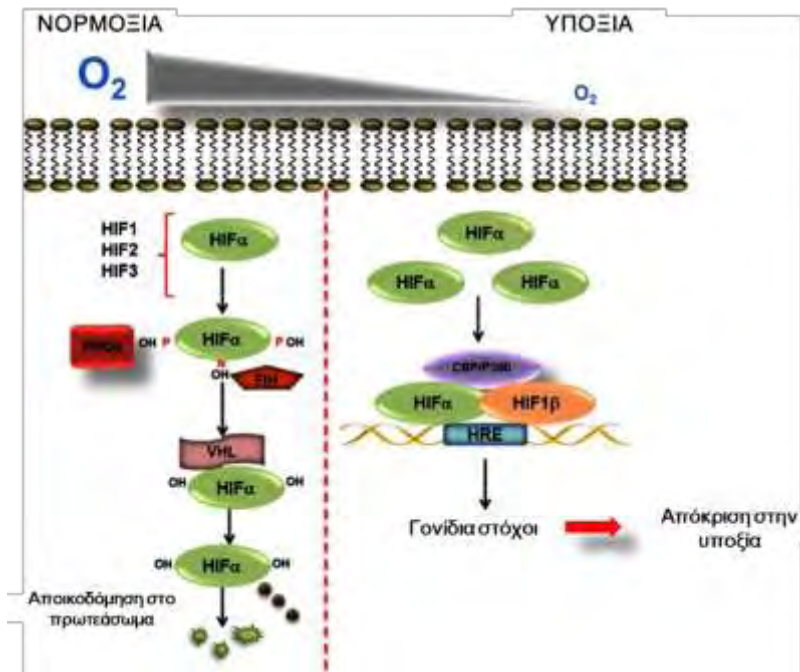
Τα ετεροδιμερή HIF αναγνωρίζουν και προσδένονται πάνω στο γονιδίωμα στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs). Η αμινοτελική επικράτεια bHLH (basic helix-loop-helix) είναι υπεύθυνη για την ειδική σύνδεση στον πυρήνα αυτών των HREs (50 -RCGTG-30 , όπου R → A ή G), ενώ οι δύο επικράτειες PAS (Per-ARNT-Sim A/B) συμμετέχουν στον ετεροδιμερισμό των δύο υπομονάδων του ετεροδιμερούς [100]. Στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α έχει αναγνωριστεί η περιοχή ρύθμισης της πρωτεΐνης από το οξυγόνο, η επικράτεια ODD (oxygen-dependent degradation domain) καθώς και δύο συν-ενεργοποιητικές περιοχές, οι N-TAD και C-TAD. Η περιοχή C-TAD αλληλεπιδρά με τους συν-ενεργοποιητές της ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT) CBP/p300, SRC-2 ή TIF-2 (συν-ενεργοποιητής των στεροϊδών-υποδοχέων) και επάγει την μεταγραφή. Ομοίως, οι ισομορφές HIF2α και HIF3α ετεροδιμερίζονται με τον ARNT και προσδένονται στα στοιχεία HREs μέσω των επικρατειών bHLH και PAS αντίστοιχα, παρόλα αυτά ο HIF3α δεν διαθέτει την περιοχή C-TAD. Η απουσία αυτής της επικράτειας στον HIF3α οδηγεί στην

υπόθεση του ρόλου του αρνητικού ρυθμιστή του HIF3α ο οποίος δρα σχηματίζοντας μη λειτουργικά ετεροδιμερή [101]. Η σταθερή υπομονάδα ARNT διαθέτει με τη σειρά της κι αυτή τις αντίστοιχες περιοχές bHLH, PAS και C-TAD. Όλες οι ισομορφές των HIFα και HIFβ διαθέτουν, επίσης, μία περιοχή εντοπισμού στον πυρήνα (NLS).

1.2.3 Η ρύθμιση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIFα

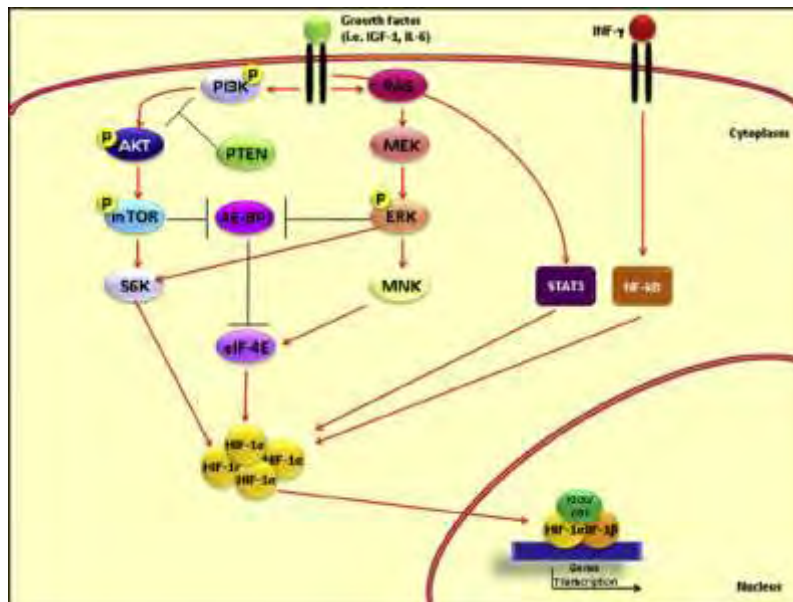
Παρουσία άφθονου οξυγόνου (νορμοξία), η υπομονάδα HIFα υδροξυλιώνεται σε συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης και ασπαραγίνης μέσω της δράσης των ενζύμων PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain). Η δράση των ενζύμων αυτών ρυθμίζεται από το διαθέσιμο οξυγόνο [102]. Η υδροξυλίωση του HIFα αναγνωρίζεται και επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau (pVHL), μέρος του συμπλέγματος E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η στρατολόγηση του συμπλόκου αυτού οδηγεί στην ουβικιτίνωση της HIFα υπομονάδας και στη τελική αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες υποξίας, η δράση των υδροξυλασών αναστέλλεται. Οι υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών και για την δράση τους απαιτούν την παρουσία οξυγόνου [103]. Δρουν διασπώντας το μοριακό οξυγόνο σε δύο άτομα εισάγοντας το ένα από αυτά στα κατάλοιπα προλίνης-στόχους. Λόγω της απενεργοποίησης των ενζύμων αυτών, η HIFα υπομονάδα σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου ετεροδιμερίζεται με την HIFβ υπομονάδα. Το ετεροδιμερές έχει έτσι την ικανότητα να προσδένεται στο DNA, να αλληλεπιδρά με διάφορους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες και να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του [104]. Πέραν των υδροξυλασών PHD οι οποίες δρουν σε κατάλοιπα προλίνης, οι HIF-1α και HIF2α έχουν βρεθεί να υδροξυλιώνονται και σε κατάλοιπα ασπαραγίνης από το ένζυμο παράγοντας αναστολής του HIF (Factor Inhibiting HIF,FIH) [105]. Η δράση του ενζύμου αυτού σε κατάλοιπα ασπαραγίνης δεν επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης HIFα, αλλά παρεμποδίζει την πρόσδεση του συμπαραγόντα CBP/p300 απενεργοποιώντας τον. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10) παρουσιάζεται το μονοπάτι των HIF σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.



Εικόνα 10: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF σε νορμοξία και υποξία. Κατά την νορμοξία, ο HIFα υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης και ασπαραγίνης από τα ένζυμα PHDs και FIH και μέσω της δράσης της VHL ουβικιτινώνεται και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Σε συνθήκες υποξίας, οι υδροξυλάσες απενεργοποιούνται και ο HIFα σταθεροποιείται, εισάγεται στο πυρήνα, δημιουργείται το λειτουργικό ετεροδιμερές και δρα. Πηγή: [106] Τροποποιημένη.

Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIFα

Η κύρια και κοινή ρύθμιση των HIF γίνεται μέσω του οξυγόνου αλλά δεν είναι η μόνη. Οι HIF ρυθμίζονται επίσης μη οξυγόνο-εξαρτώμενα τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ρυθμίζουν την έκφραση των HIF-α αναστέλλοντας τις PHD υδροξυλάσες και κατά συνέπεια την αποικοδόμησή τους [107]. Αυξημένα επίπεδα του mRNA του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας έχουν παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα στην απόκριση των κυττάρων σε αυξητικούς παράγοντες, θρομβίνη, LPS (Lipopolysaccharide), αγγειοτενσίνη II, κυτοκίνες, TNF-α και ινσουλίνη (Εικόνα 11). Σημαντικότερος ρυθμιστής των επιπέδων mRNA του HIF-1α είναι ο NF-κB, ο οποίος ενεργοποιείται από τον παράγοντα TNFα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (ROS) και αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου σε συνθήκες νορμοξίας [108],[109]. Τα μονοπάτια PI3K/AKT/mTOR και ERK [110] σε συνθήκες νορμοξίας επάγουν την δράση παραγόντων έναρξης της μετάφρασης (π.χ. η φωσφορυλίωση του παράγοντα δέσμευσης 4E-BPI οδηγεί στην αποδέσμευση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-4E) αυξάνοντας το ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης και άρα τα επίπεδα του HIF-1α. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η μεταγραφή του HIF-2α ελέγχεται από τη σηματοδότηση του IGF1R (Insulin like Growth Factor 1 Receptor) και τη δράση της PI3K (phosphoinositide 3-kinase) και του συμπλέγματος mTORC2 (mTOR Complex 2) [111].

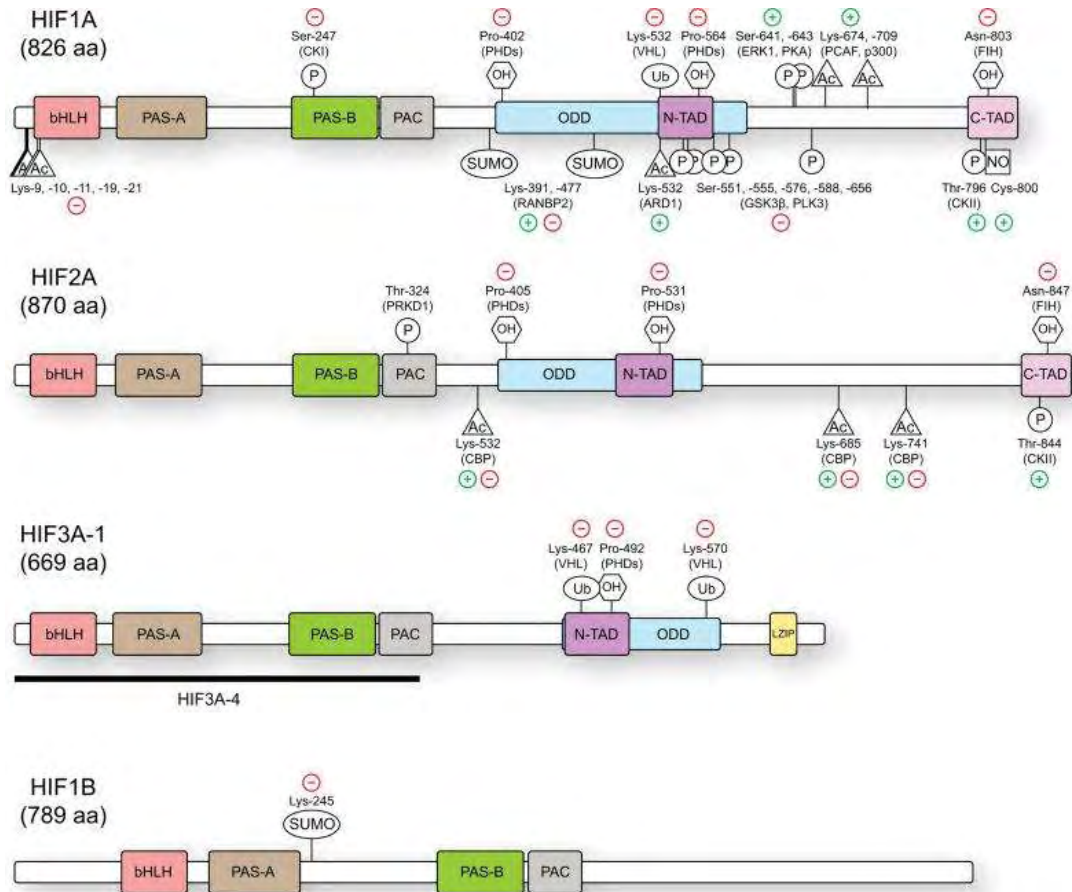


Εικόνα 11: Μη οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων σε υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη ο οποίος ως τελικό αποτέλεσμα έχει την επαγωγή της μεταγραφής του HIF-1α. Πηγή: [112]

Ένα επιπλέον σημείο ρύθμισης των HIF είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μερικές από τις οποίες φαίνονται στην Εικόνα 12. Οι HIFα πέραν της υδροξυλίωσης και ουβικιτίνωσης υπόκεινται και σε άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, S-νιτροζυλίωση και νεντυλίωση [113]. Το αποτέλεσμα της κάθε τροποποίησης διαφέρει, μπορεί να είναι είτε ενεργοποιητικό, είτε ανασταλτικό ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο στο οποίο δρουν. Για παράδειγμα στον HIF-1α, η προσθήκη ακετυλομάδας στα κατάλοιπα λυσίνης K9,-10,-19,-21 μειώνει την σταθερότητα της πρωτεΐνης και τη μεταγραφική της ενεργότητα, αντιθέτως η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης K674,-709 παρεμποδίζει την αποικοδόμησή τους και ενισχύει έτσι τα πρωτεϊνικά του επίπεδα.

Ο HIF-1α έχει βρεθεί, επίσης, ότι σουμοϋλιώνεται στα κατάλοιπα K391 και K477, αλλά η επίπτωση αυτών των σουμοϋλιώσεων είναι αμφιλεγόμενη. Συγκεκριμένα, οι σουμοϋλιώσεις στις λυσίνες K391 και K477 του HIF-1α φάνηκε να αυξάνουν την σταθερότητά του και κατά συνέπεια την μεταγραφική του ενεργότητα [114],[115], ενώ παράλληλες μελέτες της σουμοϋλίωσης του HIF-1α έδειξαν *in vitro* πως η σουμοϋλίωση κοντά και εντός της ODD περιοχής γίνεται μέσω της E3 λιγάσης RanBP2/Nup538 και το αποτέλεσμά της *in vivo* ήταν η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α [116]. Επίσης, στην υποξία, η E3 λιγάση PIASy παρατηρήθηκε να αυξάνει τη σουμοϋλίωση του HIF-1α και να ρυθμίζει αρνητικά την σταθερότητα και την μεταγραφική του ενεργότητα [117]. Πέραν της υπομονάδας HIF-1α και η σταθερή υπομονάδα ARNT έχει βρεθεί να

σουμοϋλιώνεται στο κατάλοιπο K245 που βρίσκεται κοντά στην περιοχή ετεροδιμερισμού PAS και η σουμοϋλίωση αυτή φαίνεται να εμποδίζει την αλληλεπίδραση της με την HIF-α υπομονάδα [118].



Εικόνα 12: Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των HIF. Πηγή: [119]

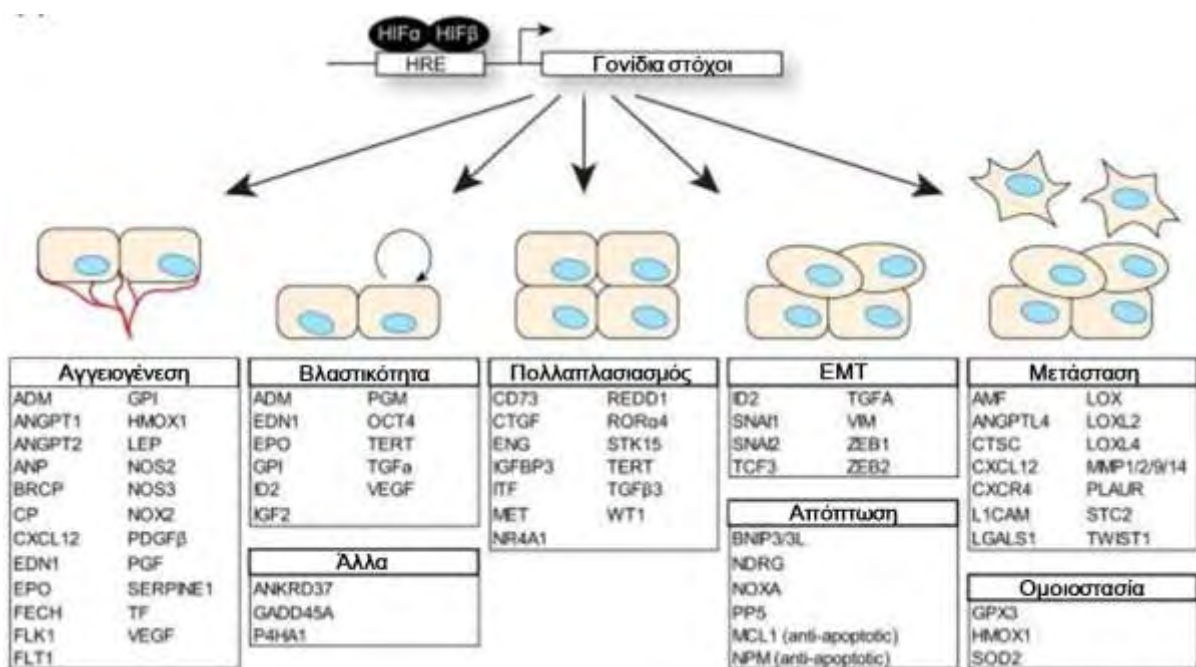
Επίσης και άλλοι συμπαράγοντες του μονοπατιού της υποξίας όπως οι CBP/p300 και pVHL υφίστανται σουμοϋλίωση. Η σουμοϋλίωση των συμπαράγοντων CBP/p300 μειώνει την δράση τους ως συνενεργοποιητές [56],[120], ενώ η από-σουμοϋλίωσή τους από την SENP3 αυξάνει την ικανότητα σύνδεσής τους με την υπομονάδα HIF-1α [121].

Τέλος, η σουμοϋλίωση του παράγοντα pVHL στο κατάλοιπο K171 καταστέλλει την δράση του ως E3 λιγάση της ουβικιτίνης, εμποδίζοντας την αποικοδόμηση των HIF και προωθεί τον πυρηνικό εντοπισμό του παράγοντα αυτού [122].

1.2.4 Γονίδια στόχοι των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι HIF επάγουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την προσαρμογή και επιβίωση των κυττάρων στην υποξία, όπως για παράδειγμα την προώθηση της ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων γύρω από τον υποξικό ιστό [119], την παραγωγή ερυθροκυττάρων για την αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου και την ρύθμιση του μεταβολισμού. Γενικότερα, οι HIF-1α και HIF2α ρυθμίζουν την έκφραση τόσο μίας κοινής ομάδας γονιδίων, όσο και διακριτών γονιδίων. Τα κύρια

γονίδια στόχοι των HIF παρουσιάζονται στην Εικόνα 13. Κύριοι στόχοι των HIF είναι γονίδια που κωδικοποιούν γλυκολυτικά ένζυμα, μειώνοντας την δράση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αυξάνοντας την γλυκόλυση, αλλά και στόχοι οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την κατανομή του διαθέσιμου οξυγόνου όπως η ερυθροποιητίνη, ο VEGF και οι υποδοχείς του FLT1 και FLK1 [123], πρωτεΐνες που επάγουν την αγγειογένεση και την ερυθροποίηση. Πέραν των στόχων που αφορούν άμεσα την ομοίωση του οξυγόνου [124], στους στόχους των HIF υπάρχουν γονίδια που εμπλέκονται στην αυτοφαγία, την απόπτωση, την φλεγμονή, την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων και την μετάσταση [125],[126].



Εικόνα 13: Τα κύρια γονίδια στόχοι των HIF. Πηγή:[119] Τροποποιημένη.

1.2.5 Η επίδραση της υποξίας στην σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών

Ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης έχει μελετηθεί εκτενώς στο ισχαιμικό στρες. Συγκεκριμένα, κατά την ισχαιμία, η παρεμπόδιση της φυσιολογικής ροής του αίματος στον εκάστοτε ιστό έχει ως συνέπεια την μείωση των θρεπτικών αλλά κυρίως την έλλειψη οξυγόνου προσομοιάζοντας υποξικές συνθήκες στο σημείο αυτό [127]. Η έκθεση των κυττάρων, των ιστών αλλά και ολόκληρου του οργανισμού σε ισχυρά υποξικές ή ισχαιμικές συνθήκες αυξάνουν την ανθεκτικότητά τους σε αυτά τα είδη στρες, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται Υποξική ή Ισχαιμική προδιάθεση [128].

Η ισχαιμία συναντάται σε φυσιολογικές καταστάσεις σε ήπια μορφή κατά την χειμερία νάρκη, ενώ συσχετίζεται με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως το ισχαιμικό εγκεφαλικό και καρδιακά επεισόδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα σουμοϋλίωσης είναι σημαντικά αυξημένα

μετά το πέρας ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου νωρίς στην περίοδο ανάκαμψης, όπου ο μεταβολισμός αρχίζει να αποκαθίσταται [129]. Λαμβάνοντας υπόψιν την αύξηση αυτή και την παρατήρηση ότι κατά το ισχαιμικό εγκεφαλικό πραγματοποιείται μαζική αύξηση των επιπέδων και του πυρηνικού εντοπισμού πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [130], μπορεί να ειπωθεί ο πιθανός «νευρο-προστατευτικός» ρόλος της σουμοϋλίωσης [129].

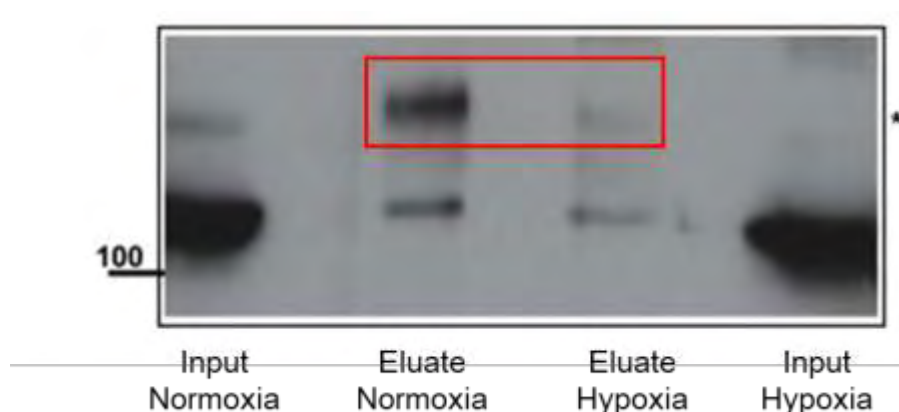
Η χειμερία νάρκη είναι ένα σημαντικό φυσικό παράδειγμα μηχανισμών ανοχής των οργανισμών στην ισχαιμία. Η μελέτη σε σκίουρους υπό χειμερία νάρκη έδειξε την αρχική παρατήρηση της μαζικής αύξησης των επιπέδων σουμοϋλίωσης τόσο από την SUMO-1 όσο και από τις SUMO-2/3 στους εγκεφάλους των ζώων [131]. Αυτή η μαζική αύξηση της SUMO-σύζευξης στα διάφορα όργανα θεωρήθηκε ότι έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για την μετατροπή σε κατάσταση χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας κατά την νάρκη και την προστασία των πυρηνικών αυτών πρωτεϊνών από αποικοδόμηση κατά το «ξύπνημα» των ζώων.

Παρά την εκτενή μελέτη της σουμοϋλίωσης σε μοντέλα ισχαιμίας, ο ακριβής ρόλος της στην υποξία δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Τόσο σε πειράματα *in vitro* [132] όσο και *in vivo* σε υποξικούς ιστούς εγκεφάλων ποντικών [133], έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα σύζευξης των πρωτεϊνών SUMO. Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης RSUME, (RWD-containing sumoylation enhancer), της οποίας η έκφραση αυξάνεται κατά την υποξία και πιστεύεται πως αλληλεπιδρώντας με την Ubc9 ενισχύει τα επίπεδα σύζευξης των SUMO πρωτεϊνών, πιθανώς εξηγεί την παρατήρηση αυτή της γενικότερης αύξησης των επιπέδων της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών κατά την υποξία (Cardia-Nagashima et al, 2007). Παρότι υπάρχουν αναφορές για μαζική επαγωγή της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στην ισχαιμία, στην υποξία μελέτες εντοπίζουν στοχευμένες αλλαγές στη σουμοϋλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών υποστρωμάτων παρά μια γενική μαζική αλλαγή στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης [134], [135].

Προκειμένου να διασαφηνιστεί η σχέση μεταξύ της σουμοϋλίωσης και της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία ένα μέλος του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας (Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας) στα πλαίσια της μεταδιδακτορικής της έρευνας μελέτησε και συνέκρινε με ποσοτική πρωτεομική ανάλυση τις σουμουλιωμένες πρωτεΐνες καρκινικών κυττάρων του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας (SILAC) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας [135] (Center for Molecular Biology, Group leader: F. Melchior, Heidelberg, Germany). Γενικότερα, δεν παρατηρήθηκε μαζική αλλαγή στη σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών κατά την υποξία,

αλλά παρατηρήθηκαν μεταβολές στην σουμοϋλίωση διαφόρων πρωτεϊνών . Κάποιες από αυτές τις μεταβολές συνοδεύονταν από παράλληλες μεταβολές και στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών (κυριώς ενζύμων της γλυκόλυσης και στόχων του HIF-1) , ενώ μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα κατηγορία αποτέλεσαν οι πρωτεΐνες που παρουσίασαν μεταβολές στα επίπεδα σουμοϋλίωσής τους κατά την υποξία διατηρώντας όμως τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα σταθερά. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται να ρυθμίζονται μετα μεταφραστικά για πιθανά να έχουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό απόκρισης των κυττάρων στην υποξία και για το λόγο αυτό θα είχε ιδιαίτερη σημασία η περαιτέρω μελέτη τους.

Ένας από τους στόχους που προέκυψαν του οποίου τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μειώνονται στην υποξία (Εικόνα 14) είναι η πρωτεΐνη Exosc10. Η Exosc10 είναι μία καταλυτική υπομονάδα του εξώσωματος, ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου υπεύθυνου για την επεξεργασία και αποικοδόμηση διαφόρων ειδών RNA.



Εικόνα 14: Μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10 σε νορμοξία και υποξία μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Έλεγχος της πρωτεΐνης Exosc10 στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (input) καρκινικών κυττάρων HeLa σε νορμοξία και υποξία, και στα εκλούσματα (eluates) με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν έναντι της Exosc10. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η σουμοϋλιωμένη μορφή της Exosc10. Πηγή: [135]

Η σουμοϋλίωση της Exosc10 και ο πιθανός της ρόλος στο μονοπάτι της υποξίας αποτελεί αντικείμενο έρευνας στο Εργαστήριο Βιοχημείας και αποτελεί το κύριο θέμα της παρούσας εργασίας.

1.3 Η πρωτεΐνη Exosome component 10 (Exosc10) (RRP6)

1.3.1 Το εξώσωμα

Το εξώσωμα είναι ένα συντηρημένο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο με δράση ενδοριβονουκλεάσης και 3'→5' εξοριβονουκλεάσης, το οποίο επεξεργάζεται και αποικοδομεί μία μεγάλη γκάμα RNAs [136]. Ο πρώτος οργανισμός στον οποίο ανακαλύφθηκε ήταν η ζύμη *S. Cerevisiae* [137]. Ανάλογα

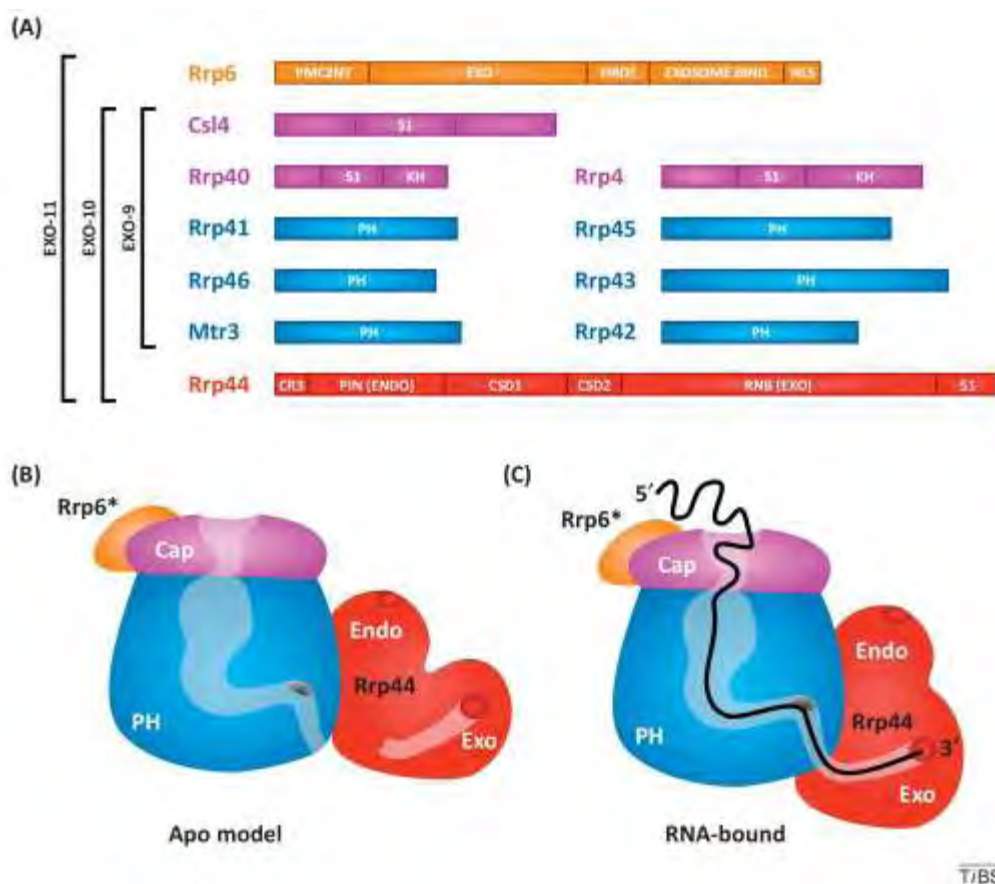
τον οργανισμό, το εξώσωμα αποικοδομεί υποστρώματα RNA όπως ενδιάμεσα των rRNA [138], ελαττωματικά mRNA και tRNA [139] και συμβάλλει στην ωρίμανση και επεξεργασία των rRNA, snoRNA και snRNA [140].

1.3.2 Δομή και μορφές του εξωσώματος

Το εξώσωμα αποτελείται τόσο από δομικές όσο και από καταλυτικές υπομονάδες, οι οποίες μπορούν να εναλλάσσονται ανάλογα τον τύπο RNA και το κυτταρικό διαμέρισμα. Στον άνθρωπο οι υπομονάδες του εξωσώματος ονομάζονται Exosome Components (Exosc). Οι δομικές υπομονάδες του ευκαρυωτικού εξωσώματος σχηματίζουν μία δομή δακτυλίου [141] ή αλλιώς τον κεντρικό πυρήνα (Exo9), ο οποίος στερείται καταλυτικής ιδιότητας και σε αυτόν προσδένονται οι καταλυτικές υπομονάδες Rrp44 (ή Dis3) και Rrp6 (ή Exosc10).

Ο κεντρικός πυρήνας αποτελείται από 9 μικρές υπομονάδες των 20-50 kDa. Έξι από αυτές διαθέτουν περιοχές ομολογίας με την βακτηριακή RNAση PH και συνδέονται μεταξύ τους με 3 ετεροδιμερικούς δεσμούς (Rrp41–Rrp45, Rrp46–Rrp43 και Mtr3– Rrp42) δημιουργώντας έναν δακτύλιο. Ο δακτύλιος αυτός σχηματίζει το κεντρικό κανάλι του εξωσώματος με διάμετρο τόση ώστε να διέρχονται μόνο μονόκλωνα μόρια RNA. Οι υπόλοιπες 3 υπομονάδες (Rrp4, Rrp40 και Csl4) διαθέτουν τις περιοχές σύνδεσης με το RNA, S1 και KH, και συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μία δομή «καλύπτρας» πάνω από τον εξαμερή δακτύλιο [142].

Στην Εικόνα 15 απεικονίζεται η δομή του εξωσώματος με τον κεντρικό πυρήνα και τις καταλυτικές υπομονάδες καθώς και οι λειτουργικές περιοχές αυτών. Στην εικόνα αυτή φαίνεται επίσης, ένα προτεινόμενο μοντέλο για τον τρόπο δράσης του εξωσώματος, με το μόριο RNA να εισέρχεται μέσω του κεντρικού πυρήνα στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και στη συνέχεια να αποικοδομείται από τις προσδεδεμένες καταλυτικές υπομονάδες [143]. Πρέπει να τονισθεί όμως ότι αυτός ο τρόπος δράσης δεν είναι ο μοναδικός και πιθανόν υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι αποικοδόμησης από τις καταλυτικές υπομονάδες χωρίς να διαμεσολαβεί η είσοδος του RNA στον κεντρικό πυρήνα.



Εικόνα 15: (A) Οι λειτουργικές περιοχές των υπομονάδων του ευκαρυωτικού εξωσώματος και οι σύσταση των μορφών EXO-9, EXO-10 και EXO-11. Οι λειτουργικές περιοχές που διακρίνονται είναι οι εξής: EXO, περιοχή δραστηριότητας εξονουκλεάσης; ENDO, περιοχή δραστηριότητας ενδονουκλεάσης; HRDC, helicase and RNase D C-terminal domain, παίζει ρόλο στην σύνδεση με το RNA; Exosome Bind, περιοχή στην Rrp6 η οποία αλληλεπιδρά με το EXO-10; PMC2NT, περιοχή στο N-τελικό άκρο των εξονουκλεασών με περιοχές HRDC; NLS, σήμα εντοπισμού στον πυρήνα; S1, περιοχή σύνδεσης με το RNA; KH, περιοχή σύνδεσης με το RNA (K-homology); PH, περιοχή με ομολογία με την βακτηριακή RNase PH; CR3, πρωτεϊνικό μοτίβο που περιέχει 3 κατάλοιπα Cys; CSD, cold-shock RNA-binding domain. (B) Η μορφή apo (ελεύθερη από RNA) του ευκαρυωτικού εξωσώματος (C) Αναπαράσταση της εισόδου του RNA στο κεντρικό πυρήνα του εξωσώματος. Πηγή: [143]

Το ευκαρυωτικό εξώσωμα διαθέτει τρεις βασικές μορφές οι οποίες φαίνονται στην Εικόνα 16:

- την κυτταροπλασματική, η οποία περιλαμβάνει τον κεντρικό πυρήνα και την καταλυτική υπομονάδα Rrp44,
- την πυρηνική, η οποία διαθέτει τον κεντρικό πυρήνα και τις δύο καταλυτικές υπομονάδες Rrp44 και Rrp6 και
- την μορφή στους πυρηνίσκους, η οποία διαθέτει τον κεντρικό πυρήνα και την καταλυτική υπομονάδα Rrp6.

Κάθε μία από αυτές τις μορφές αλληλεπιδρά με διαφορετικούς συμπαράγοντες και αποκτά έτσι την εξειδίκευση ως προς τα RNA υποστρώματά του [144].



Εικόνα 16: Οι 3 μορφές του εξωσώματος: κυτταροπλασματική, πυρηνική και πυρηνισκική. Αποτελούνται από τον κεντρικό πυρήνα και τις αντίστοιχες καταλυτικές υπομονάδες. Σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα αλληλεπιδρούν με μία πληθώρα διαφορετικών συμπαραγόντων αποκτώντας έτσι εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματά τους. Πηγή:[142]τροποποιημένη.

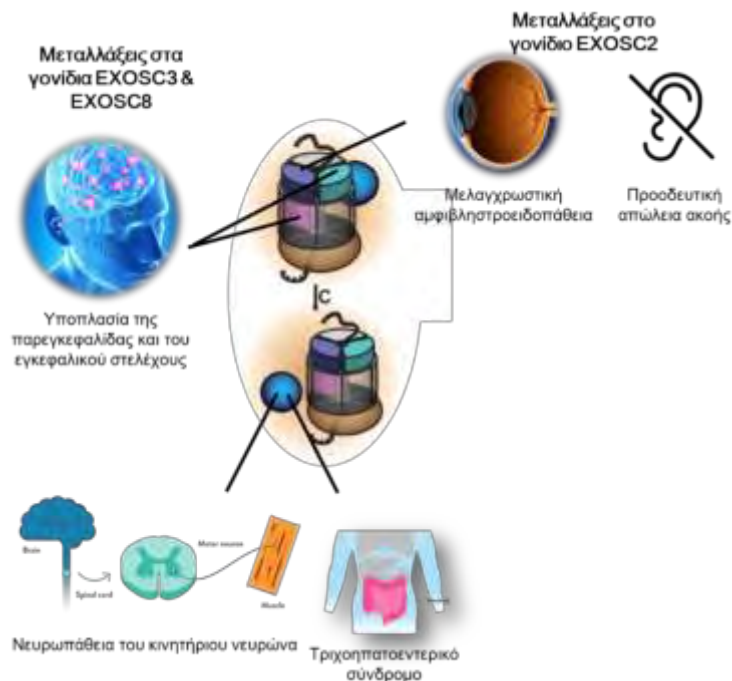
1.3.3 Το εξώσωμα και η συσχέτιση του με ασθένειες

Το εξώσωμα είναι το υπεύθυνο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο για ένα μεγάλο ποσοστό των, προς επεξεργασία και αποικοδόμηση, μορίων RNA τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα, οι στόχοι του είναι η επεξεργασία πληθώρας μη-κωδικοποιητικών RNA (non-coding RNAs) και η αποικοδόμηση ελαττωματικών RNA, ενώ στο κυτταρόπλασμα ελέγχει τα επίπεδα και το χρόνο ημιζωής των mRNA και συμμετέχει στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου των RNA του κυτταροπλάσματος.

Κατά καιρούς, μελέτες σε διάφορους οργανισμούς έχουν δείξει την σημασία του εξωσώματος για την κυτταρική επιβίωση. Στην ζύμη *S. Cerevisiae*, όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του εξωσώματος με εξαίρεση αυτό της Rrp6 έχουν κριθεί απαραίτητα για την ζωτικότητα των κυττάρων [137]. Μελέτη του γονιδίου DIS3 καθώς και ολική γενωμική ανάλυση (genome-wide deletion analysis) στον μύκητα *S. Pombe* έδειξαν ομοίως την αναγκαιότητα ύπαρξης τόσο της Dis3 όσο και των υπομονάδων του κεντρικού πυρήνα του εξωσώματος για την επιβίωση του μύκητα [145]. Στην *Drosophila*, μελέτη των γονιδίων των πρωτεϊνών Dis3, Mtr3, Rrp6, Rrp41, Rrp42 επέδειξε τον ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στην φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού αυτού [146] ενώ, μόνο μία παρόμοια μελέτη στο ποντίκι για το γονίδιο EXOSC3 επιβεβαιώνει τα παραπάνω αποτελέσματα [147]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν τον πολύ σημαντικό ρόλο του

εξωσώματος για τη φυσιολογική λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων από τους κατώτερους οργανισμού όπως οι ζύμες έως ανώτερους οργανισμούς όπως τα ποντίκια.

Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις κυρίως τόσο στις δομικές υπομονάδες του εξωσώματος όσο και στους συμπαραγόντες που αλληλεπιδρούν με αυτό έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 17). Για παράδειγμα, όσον αφορά τις δομικές υπομονάδες, μεταλλάξεις στα γονίδια *EXOSC3* και *EXOSC8* τα οποία κωδικοποιούν τις υπομονάδες Rgr40 και Rgr43 αντίστοιχα έχουν συσχετιστεί με υποπλασία της παρεγκεφαλίδας και του εγκεφαλικού στελέχους [148],[149] ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου *EXOSC2* το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα της «καλύπτρας» Rgr4 έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση ενός συνδρόμου το οποίο επηρεάζει διάφορους ιστούς και παρουσιάζει συμπτώματα όπως προοδευτική απώλεια ακοής, πρόωρη γήρανση, ήπια νοητικά προβλήματα και μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια [150]. Με παθολογικές καταστάσεις έχουν συσχετιστεί και μεταλλάξεις 3 γονιδίων που κωδικοποιούν συμπαραγόντες του εξωσώματος. Πιο συγκεκριμένα, μετάλλαξη στο γονίδιο του RBM7 μέρος του πυρηνοπλασματικού συμπλόκου NEXT έχει συσχετιστεί με νευροπάθεια του κινητήριου νευρώνα του νωτιαίου μυελού, ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια *SKIV2L* and *TTC37* που κωδικοποιούν την ελικάση Mtr4 και τον παράγοντα Ski3 του κυτταροπλασματικού συμπλόκου Ski έχουν συσχετιστεί με το τριχοηπατοεντερικό σύνδρομο [151],[152]. Παρόλα αυτά τα δεδομένα για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας που προκαλούν οι μεταλλάξεις αυτές είναι ελάχιστα [153].



Εικόνα 17: Σύνοψη μεταλλάξεων σε γονίδια υπομονάδων και συμπαραγόντων του εξωσώματος και συσχέτιση με παθολογικές καταστάσεις. Πηγή: [153] τροποποιημένη.

1.3.4 Η καταλυτική υπομονάδα Exosome component 10 (Exosc10) (RRP6) και η πυρηνική μορφή εξωσώματος (EXO-11)

Η καταλυτική υπομονάδα Exosome component 10 (Exosc10) συχνά αναφέρεται ως RRP6 λόγω της ομόλογης πρωτεΐνης στην ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία είναι περισσότερο μελετημένη, και αποτελεί μέρος του πυρηνικού εξωσώματος. Το γονίδιο EXOSC10 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1p36.22) και διαθέτει 24 εξώνια. Αποτελείται από 33257 bp και από αυτό προκύπτουν 2 ισομορφές της πρωτεΐνης Exosc10, οι οποίες είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Η ισομορφή 1 αποτελείται από 885 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 100.8kDa και είναι η κυριότερη ισομορφή. Η ισομορφή 2 αποτελείται από 860 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 98.09 kDa.

Η καταλυτική υπομονάδα Rrp6 (Exosc10) έχει δράση 3'→5' εξοριβονουκλεάσης και διαθέτει τις εξής λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 18):

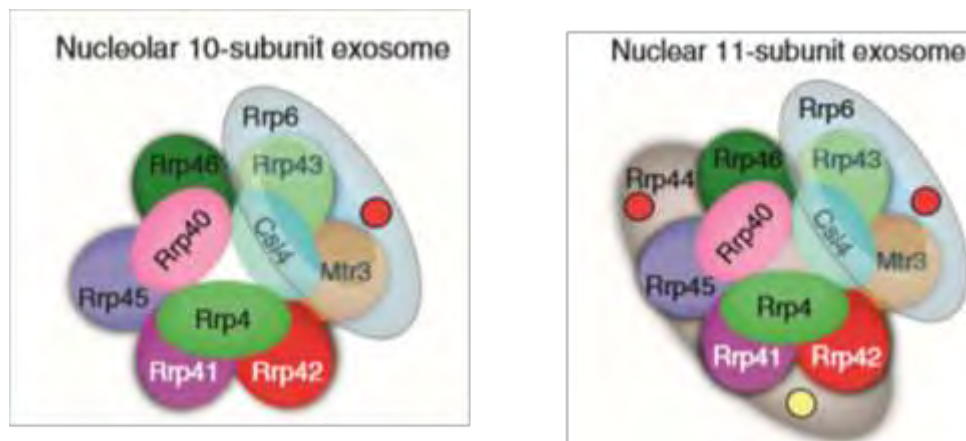
- Μία N-τελική περιοχή PMC2NT, η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον κεντρικό πυρήνα του εξωσώματος και άλλους συμπαράγοντες,
- μία περιοχή EXO, η οποία προσδίδει την δραστικότητα 3'→5' εξοριβονουκλεάσης,
- μία περιοχή HRDC (helicase and RNase D carboxy terminal domain) η δράση της οποίας δεν είναι πλήρως γνωστή αλλά πιστεύεται ότι συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τον κεντρικό πυρήνα και μία περιοχή σήματος πυρηνικού εντοπισμού NLS [154].

Η Rrp6 δεν έχει κριθεί απαραίτητη για την βιωσιμότητα της ζύμης παρόλα αυτά, στελέχη που στερούνται της Rrp6 παρουσιάζουν αργά αναπτυσσόμενο φαινότυπο, ευαισθησία στις υψηλές θερμοκρασίες και δυσλειτουργίες στην επεξεργασία των RNA [155],[156].



Εικόνα 18: Οι λειτουργικές περιοχές της Exosc10. Πηγή: [154], τροποποιημένη.

Η πρωτεΐνη Exosc10 εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα, και εμπλέκεται κυρίως στην επεξεργασία των snoRNA και rRNA [157]. Μικρά επίπεδά της ανιχνεύονται και στο κυτταρόπλασμα σε ανθρώπινα κύτταρα. Υπάρχει μία μορφή του εξωσώματος η οποία εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και αφορά τον κεντρικό πυρήνα του εξωσώματος σε σύνδεση μόνο με την υπομονάδα Rrp6, παρόλα αυτά ελάχιστα είναι γνωστά για αυτήν την μορφή. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται οι δύο μορφές του εξωσώματος, η πυρηνική και η μορφή στους πυρηνίσκους (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Η πυρηνική και πυρηνισκική μορφή του εξωσώματος. Πηγή: [142]

Η Rrp6 υπομονάδα όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, συνδέεται με τον κεντρικό πυρήνα EXO9 και την καταλυτική υπομονάδα Rrp44 (EXO10), ενώ η σύνδεση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με τον παράγοντα Rrp47 (C1D). Η παρουσία του Rrp47 δεν είναι απαραίτητη για την έκφραση της Rrp6 ή την αλληλεπίδραση της με τον εξώσωμα, αλλά ο ρόλος της είναι σημαντικός για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργία της Rrp6, όπως για παράδειγμα για την ωρίμανση του 3' άκρου του 5.8S rRNA [158]. Με τη σύνδεση της Rrp6 στο EXO10 σχηματίζεται το πλήρες πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο των έντεκα υπομονάδων το οποίο εντοπίζεται στον πυρήνα [142]. Η πρόσδεση της Rrp6 στο EXO10 φαίνεται να προκαλεί το άνοιγμα του κεντρικού καναλιού και να επάγει αλλοστερικά την δραστικότητα της Rrp44 (Dis3) [159].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί προκαταρκτική μελέτη της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10 και του γενικότερου ρόλου της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Μελέτη των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας [135] έδειξε ότι η πρωτεΐνη Exosc10 παρόλο που διατηρεί τα πρωτεϊνικά της επίπεδα σταθερά στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία, παρουσιάζει έντονη μείωση στη σουμοϋλίωσή της κατά την υποξία. Η παρατήρηση αυτή καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα την μελέτη της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης αυτής και της λειτουργίας της κατά την υποξία.

Στόχος της πρώτης ενότητας της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 σε κύτταρα HeLa κατά την υποξία. Ειδικότερα, ένας βασικός στόχος ήταν η μελέτη της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης Exosc10 κατά την υποξία, με αφορμή προκαταρκτικά πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας της κα. Χαχάμη (Λέκτορας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αδημοσίευτα αποτελέσματα) τα οποία υποδείκνυαν πιθανή αλλαγή στον εντοπισμό της πρωτεΐνης Exosc10 από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα κατά την υποξία. Επιπλέον, ένα βασικό μέρος της κατανόησης του ρόλου της Exosc10 κατά την υποξία ήταν η μελέτη της επίδρασης της Exosc10 στην μεταγραφική ενεργότητα του κύριου ρυθμιστή του μονοπατιού της υποξίας, του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α μέσω πειραμάτων αποσιώπησης με ειδικά siRNA έναντι του mRNA της Exosc10.

Ο στόχος της δεύτερης ενότητας της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορούσε στην μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10. Για το λόγο αυτό απαραίτητη ήταν η δημιουργία μεταλλάγματων της Exosc10 (μεταλλάξεις (K→R) σε 3 πιθανές λυσίνες στόχους και η ταυτοποίηση των λυσινών στόχων σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10 με τη βοήθεια πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης.

Η αναγνώριση των θέσεων σουμοϋλίωσης και οι μορφές της Exosc10 οι οποίες στερούνται την ικανότητα σουμοϋλίωσης θα δώσει τις βάσεις και τα εργαλεία για μελλοντικά πειράματα που θα έχουν ως στόχο να διασαφηνίσουν τον ρόλο της τροποποίησης αυτής στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης Exosc10 και γενικά στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς

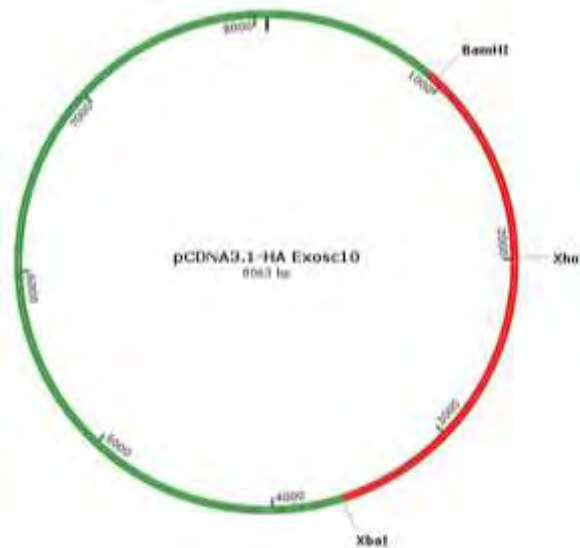
Οι πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι οι εξής:

pCDNA 3.1-HA

Ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA3.1 χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση πρωτεϊνών σε διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών, καθώς περιέχει τον υποκινητή CMV (Human cytomegalovirus immediate-early) υπό τον έλεγχο του οποίου υπερεκφράζεται το εισαχθέν κάθε φορά γονίδιο. Ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA 3.1-HA παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της F.Melchior (ZMBH, University of Heidelberg, Germany). Ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για ένα πεπτίδιο (YPYDVPDYA) της πρωτεΐνης HA (Human influenza HemAgglutinin) κλωνοποιημένο στο N τελικό άκρο του ενθέματος, το οποίο χρησιμοποιείται ως «επίτοπος» για την διάκριση των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών από τις ενδογενείς. Το πλασμίδιο φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

pCDNA 3.1-HA-Exosc10 WT

Ο φορέας pCDNA 3.1-HA-Exosc10 WT (Εικόνα 20) φέρει κλωνοποιημένο το πλήρες cDNA της Exosc10 (το cDNA αποκτήθηκε από την τράπεζα Gateway Full ORF clones του DKFZ, Χαϊδελβέργη, Γερμανία) με άκρα BamHI-XbaI (Γ.Χαχάμη, αδημοσίευτα αποτελέσματα).



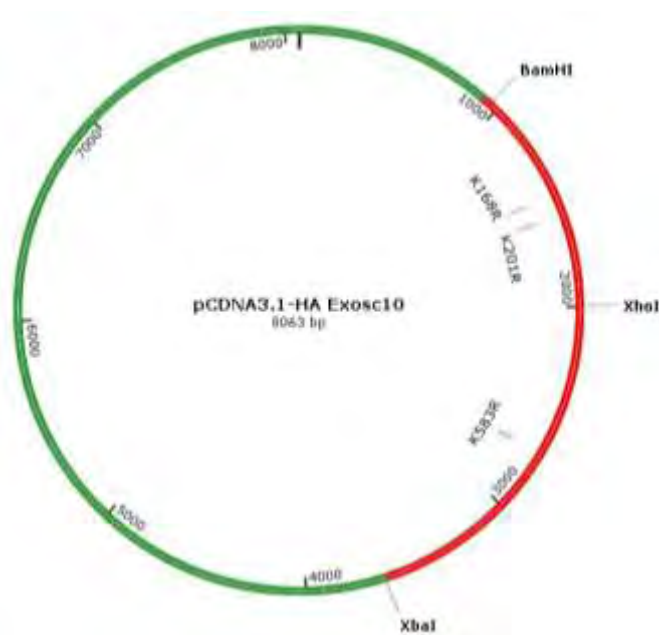
Εικόνα 20: Χάρτης ανασυνδασμένου πλασμιδίου pCDNA3.1-HA Exosc10. Με κόκκινο σημειώνεται το τμήμα του cDNA της Exosc10, ενώ με πράσινο το υπόλοιπο τμήμα του φορέα. Σημειώνονται, επίσης, τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XbaI.

XbaI που αποτελούν τα άκρα του ενθέματος και το περιοριστικό ένζυμο *XhoI* το οποίο κόβει αποκλειστικά εντός του ενθέματος.

pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K583R

Ο φορέας *pCDNA 3.1-HA Exosc10 K583R* προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και φέρει την μετάλλαξη *K583R* (Γ.Χαχάμη, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Οι πλασμιδιακοί φορείς *pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K168R*, *pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K201R* που φέρουν τις μεταλλάξεις *K168R* και *K201R* και οι *pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K168R-K583R*, *pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K201R-K583R* που φέρουν τις διπλές μεταλλάξεις *K168R/ K583R* και *K201R/ K583R* αντίστοιχα (Εικόνα 21), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* και *in vivo* πειράματα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου (βλ. 4.1.1.α Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω νουκλεοτιδίου) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές οι οποίοι συνοψίζονται στον Πίνακα 2.



Εικόνα 21: Χάρτης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pCDNA3.1-HA Exosc10*. Με κόκκινο σημειώνεται το τμήμα του *cDNA* της *Exosc10*, ενώ με πράσινο το υπόλοιπο τμήμα του φορέα. Σημειώνονται τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *XbaI* που αποτελούν τα άκρα του ενθέματος και το περιοριστικό ένζυμο *XhoI* το οποίο κόβει αποκλειστικά εντός του ενθέματος. Υποδεικνύονται, επίσης, οι θέσεις των μεταλλάξεων *K168R*, *K201R*, *K583R*.

pGL3-VEGF-5HRE

Ο πλασμιδιακός φορέας *pGL3-VEGF-5HRE* φέρει τον υποκινητή του ιού SV40 και περιέχει 5 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements, HREs) του γονιδίου VEGF, στις αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BglII* και *KpnI* εντός της MCS και πριν από την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση της

πυγολαμπίδας. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α και παρήχθη από τον Dr. Giaccia (Department of Medicine, University of Stanford).

pCI-Renilla

Το πλασμίδιο αυτό εκφράζει την λουσιφεράση της Renilla κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του ιού SV40, χρησιμοποιείται στα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης ως δείκτης της απόδοσης της διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων και για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

pCDNA-His-SUMO1

Το πλασμίδιο αυτό περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA που κωδικοποιεί για τη SUMO 1 πρωτεΐνη και φέρει τον επίτοπο His ο οποίος αποτελείται από 6 ιστιδίνες (6x His) και δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης με χρήση κατάλληλου anti-His αντισώματος. Παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της F.Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης Γερμανία) και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη.

3.2 Εκκινητές και Small Interference RNA (siRNA)

Οι εκκινητές παραλήφθηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Ανάλογα με την ποσότητά τους σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας παραγωγής προστέθηκε ddH₂O ώστε να επιτευχθεί διάλυμα συγκέντρωσης 100 pmol/μl. Για τις αντιδράσεις PCR το αρχικό διάλυμα αραιώθηκε σε 10 pmol/μl σε ddH₂O.

Πίνακας 2: Πίνακας πλασμιδίων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του καθενός από αυτά

Ονομασίες πλασμιδίων	Εκκινητές
pCDNA-HA K168R	PrimerExosc10 168KR :5'-TGGCAAAAAAGCAAGATCTGAAACTTTCCG-3' PrimerExosc10 168KR compl :5'-CGGAAAGTTTCAGATCTTGCTTTTTTGCCA -3'
pCDNA-HA K201R	PrimerExosc10 201KR : 5'-CACCATTTCTTCCTAGAAATCTTCATCAAACC-3' PrimerExosc10 201KR compl : 5'-GGTTTGATGAAGATTCTAGGAAGAAATGGTG -3'
pCDNA-HA K168R-K583R	PrimerExosc10 168KR : 5'-TGGCAAAAAAGCAAGATCTGAAACTTTCCG-3' PrimerExosc10 168KR compl : 5'-CGGAAAGTTTCAGATCTTGCTTTTTTGCCA -3'
pCDNA-HA K201R-K583R	PrimerExosc10 201KR : 5'-CACCATTTCTTCCTAGAAATCTTCATCAAACC-3' PrimerExosc10 201KR compl : 5'-GGTTTGATGAAGATTCTAGGAAGAAATGGTG -3'

Για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Exosc10 στα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το siRNA για περιοχή του mRNA της Exosc10 (sense sequence-GCAGGGAAGAUGAAAGUUAUU) και για τα δείγματα αναφοράς (control) το All stars Negative Control siRNA (Qiagen)-(ntRNA).

3.3 Βακτηριακά στελέχη

Τα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση πλασμιδίων περιλαμβάνουν βακτήρια E.Coli TOP10 (Invitrogen) τα οποία διαθέτουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.

3.4 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες

Η σύσταση των θρεπτικών μέσων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E.coli όσο και για την καλλιέργεια των βακτηρίων Top10 ήταν η εξής:

- ΤΥΜ θρεπτικό μέσο: 2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.1M NaCl, 10mM MgSO₄
- Υγρό θρεπτικό LB (Luria-Bertani broth): 10gr Bacto-Tryptone Pepton, 5gr Bacto Yeast Extract, 5gr NaCl, ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 500ml.
- Στερεό θρεπτικό LB: 10gr Bacto-Tryptone Pepton, 5gr Bacto Yeast Extract , 5gr NaCl, 20gr άγαρ, ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 500ml. Προσθήκη 500μl του αντιβιοτικού αμπικιλίνης μετά την αποστείρωση του θρεπτικού, επίστρωση σε τρυβλία petri.

3.5 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa, η οποία χαρακτηρίζεται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.

3.6 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

- Πλήρες θρεπτικό DMEM: Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) της εταιρείας BioSera το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) και 1000U/l αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Το θρεπτικό μέσο DMEM διαθέτει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, πυροσταφυλικό νάτριο και L-γλουταμίνη και ενδείκνυται για την καλλιέργεια των περισσότερων καρκινικών κυτταρικών σειρών.
- DMEM -FBS/- antibiotics (BioSera)

- DMEM +5%FBS. Το διάλυμα αυτό προκύπτει μετά την προσθήκη FBS 100% σε DMEM - FBS/- antibiotics με κατάλληλη αραιώση ώστε η τελική συγκέντρωση του ορού στο διάλυμα να είναι 5%.

3.7 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Αμπικιλίνη (1000U/ml)
- Πενικιλίνη (1000U/ml)
- Στρεπτομυκίνη (1000U/ml)

3.8 Ένζυμα

Για τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα της εταιρείας Agilent:

- Pfu (2500 U/ml) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα που έφερε το kit της εταιρείας (buffer Pfu 5x)
- DpnI (10000 U/ml)

Για την πραγματοποίηση των διαγνωστικών πέψεων του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα αντιδραστήρια της εταιρείας New England Biolabs :

- BamHI-HF (20.000 U/ml)
- Xho (20.000 U/ml)
- CutSmart[®] buffer 1x

3.9 Αντισώματα

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται αναλυτικά όλα τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Πίνακας 3: Αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο οργανισμός από τον οποίον προήλθαν, η αραιώση στην οποία χρησιμοποιήθηκαν, ο τύπος τους και η προέλευσή τους.

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραιώση	Τύπος	Προέλευση
Anti-HIF-1α	Κουνέλι	1:2000, 1:1000	Πολυκλωνικό	(Lyberopoulou et al, 2017)
Anti-Exosc10	Κουνέλι	1:2000,1:500	Πολυκλωνικό	abcam [®]
Anti-HA	Ποντίκι	1:5000, 1:1000	Μονοκλωνικό	Covance
Anti-HA	Κουνέλι	1:5000	Πολυκλωνικό	Cell Signaling

Anti-tubulin	Ποντίκι	1:10000	Μονοκλωνικό	Cell Signalling Biotechnology
Anti-Ubf	Ποντίκι	1:5000, 1:500	Μονοκλωνικό	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NMP1	Ποντίκι	1:2000	Μονοκλωνικό	Millipore
Anti-histone H3	Ποντίκι	1:5000	Πολυκλωνικό	Abcam

Στην μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού τα δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με φθοροχρώματα έναντι των IgG αλυσίδων κουνελιού και ποντικιού αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000, παρήχθησαν από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology και ήταν τα εξής: **Anti-rabbit Alexa 488 (πράσινο)** και **Anti-mouse Alexa 594 (κόκκινο)**.

Στην μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western τα δεύτερα αντισώματα έναντι των IgG αλυσίδων κουνελιού και ποντικιού είναι συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση του αγριορέπανου (χρένου) (HRP). Χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000, παρήχθησαν από τις εταιρείες Santa Cruz Biotechnology και Cell Signaling και ήταν τα εξής: **Anti-Rabbit IgG secondary antibody [HRP]** και **Anti-Mouse IgG secondary antibody [HRP]**.

3.10 Χημικά

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών:

- SigmaAldrich (USA)
- AppliChem (USA)

3.11 Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)** κατά τη μεταλλαξιγένεση ήταν τα εξής:

- dNTPs 10mM
- Buffer Pfu 5x
- DMSO

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον **καθαρισμό των προϊόντων της PCR** είναι τα εξής:

- Αιθανόλη 100%
- CH₃COOK 1M
- Γλυκογόνο

- Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70%

Η σύσταση των διαλυμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την **δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E.coli** ήταν η εξής:

- TFB-I: 30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 7.
- TFB-II: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 20% γλυκερόλη

Τα διαλύματα αυτά αφού παρασκευάστηκαν φιλτραρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα falcon των 50ml.

Τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την **ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης** ήταν τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 50x: 242 g Tris-base, 57,1 ml υγρού οξικού οξέος, 100 ml EDTA 0,5 M, pH = 8, ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 1 L. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ηλεκτροφόρηση το διάλυμα αυτό αραιώθηκε σε 1X με την προσθήκη ddH₂O.
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, 6X): 0.2% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.2% κυανό του ξυλενίου, 60% γλυκερόλη, 60mM EDTA. Το διάλυμα φόρτωσης στα δείγματα αραιώνεται έως το 1X.
- Μάρτυρας : Fermentas GeneRuler 1kb DNA ladder
- Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: 10mg/ml

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις **κυτταροκαλλιέργειες** ήταν τα εξής:

- Βόειος εμβρυικός ορός (FBS): Ο βόειος εμβρυικός ορός παρέχει στα καλλιεργούμενα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες που απαιτούνται για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Πριν από τη χρήση του, ο ορός υφίσταται μια διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης σε υδατόλουτρο, όπου θερμαίνεται στους 56°C για 30 λεπτά. Ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα τρυψίνης 0.2%
- PBS 10x: 40gr NaCl, 1gr KCl, 8gr Na₂HPO₄/2H₂O, 1.2gr KH₂HPO₄, ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 500ml.
- DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) της εταιρείας Appllichem. Χρησιμοποιείται στο διάλυμα παγώματος (freezing medium), σε τελική συγκέντρωση 10% (όγκο κατ' όγκο).
- Διάλυμα παγώματος (*Freezing medium*): 10 % DMSO σε θρεπτικό DMEM

Τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα **ανοσοκατακρήμνισης** ήταν τα εξής:

- RIPA buffer: 20mM Na-phosphate buffer pH: 7.4, 150mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate
- Υδατικό διάλυμα SDS 20%.
- DTT 100mM.
- Αναστολείς πρωτεασών σερίνης, κυστεΐνης και ασπαρτικού οξέος: Leupeptin (1mg/ml), Pepstatin (1mg/ml), PMSF (100mM).
- Αναστολέας SUMO-ισοπεπτιδασών: N-Ethylmaleimide (NEM) 1M.
- EDTA 0.5M pH:8. Χειλικός παράγοντας ο οποίος δεσμεύει μεταλλικό ιόντα όπως το Ca^{2+} και το Mg^{2+} , προκαλώντας την αναστολή ενζύμων, όπως DNAσες και πρωτεάσες.
- EGTA 0.5M pH:8. Χειλικός παράγοντας με μεγαλύτερη συγγένεια για ιόντα ασβεστίου και πολύ μικρότερα για τα ιόντα μαγνησίου.
- SDS Laemmli Loading buffer απουσία DTT (τελική συγκέντρωση στο 1X): 50mM Tris pH: 6.8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη
- Αντιδραστήριο Bradford: Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue -R250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης.

Τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (**SDS-PAGE**) και την **ανοσοαποτύπωση κατά Western** ήταν τα εξής:

- SDS Laemmli Loading buffer (τελική συγκέντρωση στο 1X): 50mM Tris pH: 6.8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη, 100mM DTT
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating gel buffer): 0,375 Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (stacking gel buffer): 0,125 Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer): 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,3
- Coomassie brilliant blue σε υδατικό διάλυμα που περιέχει: 45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 3 g/LCoomassie brilliant blue
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer): 125 mM Tris-Borate (pH 8,5), 0,2% SDS, 0,5 mM DTT

- Διάλυμα χρωστικής Ponceau S: 2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ
- Διάλυμα γάλακτος κορεσμού (blocking): 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20
- Εμφανιστικό: Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore)

Τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την τεχνική του **έμμεσου ανοσοφθορισμού** ήταν τα εξής:

- Διάλυμα μονιμοποίησης: φορμαλδεΰδη 3.7% σε PBS 1X
- Διάλυμα αύξησης διαπερατότητας μεμβρανών: 0,2% Triton X-100 σε PBS 1X
- Διάλυμα κορεσμού: 1% BSA, 0,1% Tween 20 σε PBS 1X
- Διάλυμα διατήρησης MOWIOL (Sigma)

Τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την **απομόνωση πυρηνίσκων από κυτταρικά λύματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων** ήταν τα εξής:

- Nucleoli standard buffer (NSB) pH:7.4: 10mM Tris—HCl pH:7.4, 10mM NaCl, 1mM MgCl₂. Φυλάσσεται έως και 3 εβδομάδες στους 4°C.

Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν την ίδια μέρα διεξαγωγής του πειράματος και χρησιμοποιήθηκαν παγωμένα.

- 10% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40)
- 250 mM σουκρόζης /10 mM MgCl₂
- 880 mM σουκρόζης /5 mM MgCl₂
- 340 mM σουκρόζης /5 mM MgCl₂
- 0.34 M υδατικό διάλυμα σουκρόζης

3.12 Αντιδραστήρια

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το kit “NucleoSpin® plasmid” της εταιρείας Macherey-Nagel.

Για τη διαμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- PEI (Polyethilenamine) της εταιρείας abm Inc.
- Λιποφεκταμίνη (lipofectamine® RNAiMAX) της εταιρείας Invitrogen

Για τα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας έγινε χρήση του Dual-Luciferase® Reporter Assay System της εταιρείας Promega το οποίο περιείχε τα εξής:

- Luciferase Assay Buffer II

- Luciferase Assay Substrate (λυοφιλοποιημένη μορφή). Για την προετοιμασία του Luciferase Assay Reagent II (LAR II) διαλύεται το παρεχόμενο Luciferase Assay Substrate σε 10ml του Luciferase Assay Buffer II. Το αντιδραστήριο αυτό είναι σταθερό έως ένα μήνα και φυλασσόταν στους -80°C .
- Stop & Glow[®] Buffer
- Stop & Glow[®] Substrate, 50X. Για την προετοιμασία του Stop & Glo[®] Reagent γινόταν προσθήκη 1 όγκου του 50X Stop & Glow[®] Substrate σε 50 όγκους του Stop & Glo[®] Buffer. Το αντιδραστήριο φυλασσόταν στους -80°C .
- Passive Lysis Buffer, 5X. Χρησιμοποιούταν σε αραίωση 1X.

3.13 Σφαιρίδια σεφαρόζης

Τα σφαιρίδια σεφαρόζης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ήταν τα εξής:

- Protein A σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα έναντι της ετικέτας HA, τα οποία αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich
- Protein G – SUMO-1 σφαιρίδια τα οποία αποκτήθηκαν από την εταιρία SigmaAldrich και πάνω τους δεσμεύτηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της SUMO-1 πρωτεΐνης (Becker et al 2013)

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

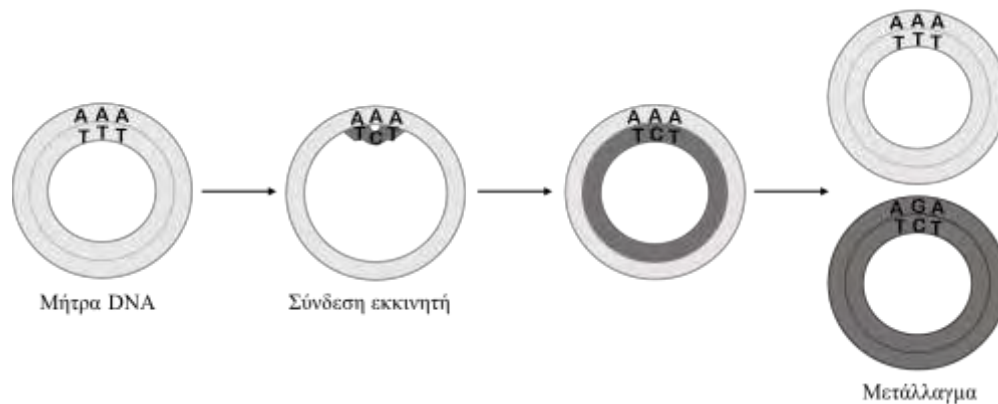
4.1.1 Δημιουργία πλασμιδιακών φορέων με τις επιθυμητές μεταλλάξεις

4.1.1.α Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω νουκλεοτιδίου

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου στηρίζεται στην ύπαρξη ενός ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη και λειτουργεί ως εκκινητής για τη σύνθεση DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερασης (PCR), χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον ένα κλώνο ενός πλασμιδίου (Εικόνα 22). Μετά το πέρας της PCR ακολουθεί επώαση με το ένζυμο DpnI, μια περιοριστική ενδονουκλεάση η οποία αναγνωρίζει και «κόβει» μεθυλωμένο ή ημι-

μεθυλιωμένο DNA, αποικοδομώντας το μητρικό φορέα αφήνοντας ανέπαφο μόνο το νεοσυντεθέν προϊόν που πιθανά φέρει την μετάλλαξη.



Εικόνα 22: Περιγραφή αρχής της μεθόδου της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου.

Πειραματική διαδικασία

Με τη χρήση της τεχνικής της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου κατασκευάστηκαν νέοι πλασμιδιακοί φορείς pCDNA 3.1-HA-Exosc10 *K168R*, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 *K201R*, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 *K168R-K583R*, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 *K201R-K583R* με τα μονά μεταλλάγματα *K168R*, *K201R* και τα διπλά μεταλλάγματα *K168R-K583R*, *K201R-K583R*. Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας την υψηλής αξιοπιστίας πολυμεράση Pfu (10^{-6} πιστότητα) και περιλάμβανε τους αντίστοιχους για κάθε μετάλλαγμα εκκινητές (Πίνακας 2). Για την κατασκευή των μονών μεταλλαγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA το πλασμίδιο pCDNA 3.1-HA-Exosc10 WT, ενώ για την κατασκευή των διπλών μεταλλαγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA το πλασμίδιο pCDNA 3.1-HA-Exosc10 *K583R*. Οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων των αντιδράσεων PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

Συνθήκες PCR	
Αρχική Αποδιάταξη : 95 °C, 1min	} 28 κύκλοι
Αποδιάταξη: 95 °C, 50sec	
Υβριδισμός εκκινητών: 59 °C, 50sec	
Επιμήκυνση: 68 °C, 14min	
Τελική επιμήκυνση: 68 °C, 14min	

Πίνακας 5: Τελικές ποσότητες/συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR σε τελικό όγκο 25μl

Αντίδραση PCR
50ng DNA μήτρας
1μl PrimerExosc10 168KR / PrimerExosc10 201KR 10pmol/l
1μl PrimerExosc10 168KR compl / PrimerExosc10 201KR compl 10pmol/l
1μl dNTPs 10mM
2.5μl 5x buffer Pfu
0.5μl Pfu High fidelity polymerase
1μl DMSO
+ Αποστειρωμένο ddH ₂ O έως ότου ο τελικός όγκος να φτάσει τα 25μl

Μετά το πέρας της PCR, τα προϊόντα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C με 0.5μl του ενζύμου DpnI και το DNA καθαρίστηκε από τα υπόλοιπα συστατικά της PCR με την μέθοδο κατακρήμνισης DNA με προσθήκη αιθανόλης. Συνοπτικά στα προϊόντα της PCR προστέθηκαν 2.5x όγκοι αιθανόλης 100% (EtOH absolut) και 1/10 του αρχικού όγκου οξικό κάλιο (CH₃COOK) 1M προκειμένου να κατακρημνιστεί το DNA και 1μl γλυκογόνου, το οποίο συγκατακρημνίζεται με το DNA κάνοντας πιο εύκολα ορατό το ίζημα. Τα δείγματα επώαστηκαν ολονύκτια στους -20°C. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, το ίζημα εκπλύθηκε με 300μl διαλύματος αιθανόλης 70%, επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, και το ίζημα ξηράνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά - 1 ώρα για την απομάκρυνση της αιθανόλης. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4.1.2 Πολλαπλασιασμός πλασμιδιακών φορέων σε βακτηριακές καλλιέργειες

4.1.2.α Δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E.coli

Αρχή της μεθόδου

Δεκτικά κύτταρα θεωρούνται τα βακτήρια τα οποία έχουν επεξεργαστεί στη συγκεκριμένη περίπτωση χημικά ώστε το DNA να μπορεί να διαπεράσει με μεγαλύτερη ευκολία τη κυτταρική τους μεμβράνη αυξάνοντας έτσι την ικανότητα πρόσληψης εξωγενούς πλασμιδιακού DNA. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην κατεργασία των κυττάρων με μια σειρά κρύων διαλυμάτων αλάτων

τα οποία διαταράσσουν τις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και τα καθιστούν διαπερατά σε μικρά μόρια DNA.

Πειραματική διαδικασία

Μικρή ποσότητα παγωμένης καλλιέργειας *Escherichia coli* (*E.coli*) Top10 εμβολιάστηκε σε 5ml TYM στο οποίο είχαν προστεθεί 5μl αντιβιοτικού στρεπτομυκίνης και επώασθηκαν ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, 30μl της ολονύκτιας καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε 3ml TYM (αραίωση:1/100) το οποίο περιείχε 3μl στρεπτομυκίνης και επώασθηκαν υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 37°C. Έπειτα, 250μl της νέας καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 50ml TYM (αραίωση: 1/200) απουσία αντιβιοτικού και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση. Όταν η οπτική απορρόφηση έφτασε στο 0.35-0.4 πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 7 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25ml διαλύματος TFB-I (αραίωση: 1/2). Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml διαλύματος TFB-II (αραίωση: 1/25) και επώασθηκε για 1 ώρα στον πάγο. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα μοιράστηκαν σε αποστειρωμένα erpendorfs και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

4.1.2.β Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* με θερμικό σοκ με τους πλασμιδιακούς φορείς

Αρχή της μεθόδου

Ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* με θερμικό σοκ στηρίζεται στην ύπαρξη πλούσιου σε θετικά ιόντα ασβεστίου περιβάλλοντος που παρέχονται από το χλωριούχο ασβέστιο τα οποία εξουδετερώνουν την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ του πλασμιδιακού DNA και της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης. Η ξαφνική αύξηση της θερμοκρασίας μέσω θερμικού σοκ δημιουργεί οπές στη πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων και επιτρέπει στο DNA να εισέλθει στα κύτταρα. Με αυτή την τεχνική στοχεύουμε στην πρόσληψη του επιθυμητού πλασμιδίου από τα βακτήρια, στον μαζικό πολλαπλασιασμό τους και κατά συνέπεια στον εμπλουτισμό του πλασμιδίου με το οποίο θέλουμε να δουλέψουμε.

Πειραματικό μέρος

10μl προϊόντος PCR προστέθηκαν σε 50μl δεκτικών βακτηρίων *E.coli* και επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα, άμεση μεταφορά στον πάγο για 2 λεπτά και επώαση για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση στους 37 °C σε 1ml υγρού θρεπτικού LB προκειμένου τα κύτταρα να ανακάμψουν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5

λεπτά στα 4000rpm, απομάκρυνση 800μl υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 200μl. Το επαναιώρημα μεταφέρθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό LB παρουσία αμπικιλίνης και επώαστηκε ολονύκτια στους 37 °C. Την επόμενη μέρα τα τρυβλία ελέγχθηκαν για την ύπαρξη αποικιών.

4.1.3 Έλεγχος ύπαρξης των πλασμιδιακών φορέων pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K168R, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K201R, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K168R-K583R, pCDNA 3.1-HA-Exosc10 K201R-K583R με τις επιθυμητές μεταλλάξεις

4.1.3.α Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας έγινε με τη χρήση του kit της εταιρείας Macherey-Nagel, το οποίο ενδείκνυται για την γρήγορη και αποδοτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά στελέχη *E.coli*.

Πειραματική διαδικασία

Για την κάθε συνθήκη επιλέχθηκαν 4 αποικίες και μεταφέρθηκαν σε 5ml υγρής καλλιέργειας LB παρουσία αμπικιλίνης ολονύκτια. Την επόμενη μέρα, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα υπέστη αλκαλική λύση με τη χρήση διαλύματος το οποίο είχε ως βάση το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Ακολούθησε εξουδετέρωση του διαλύματος αυτού με την προσθήκη διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την σύνδεση ύστερα του DNA σε silica στήλη. Η περίσσεια των αλάτων και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων απομακρύνθηκε με έκπλυση της στήλης με διάλυμα αιθανόλης και το DNA εκλούστηκε από τη στήλη με υπερκαθαρό αποστειρωμένο H₂O.

4.1.3.β Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Αρχή της μεθόδου

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν την αλληλουχία του Exosc10 στα βακτηριακά κύτταρα μετά τον μετασχηματισμό τους έγινε έλεγχος με πέψεις περιοριστικών ενζύμων. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ουσιαστικά ενδονουκλεάσες οι οποίες «κόβουν» το DNA κοντά ή πάνω σε συγκεκριμένες αλληλουχίες - θέσεις αναγνώρισης.

Πειραματική διαδικασία

1μl του πλασμιδιακού DNA εισήχθη σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και Xho. Το ένζυμο Xho «κόβει» εσωτερικά του ενθέματος ενώ δεν υπάρχει περιοχή αναγνώρισής του εντός του φορέα. Το μίγμα για τις αντιδράσεις των πέψεων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Μίγμα πέψης με τα ένζυμα BamHI και Xho

Μίγμα πέψης με τα ένζυμα BamHI και Xho
5μl Cut Smart buffer
0,25μl BamHI
0,25μl Xho
1μg πλασμιδιακού DNA
13,5μl H ₂ O

4.1.3.γ Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων αλλά και των πρωτεϊνών που βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Για την οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και η παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Το EtBr παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Κατάλληλα για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων μορίων DNA είναι τα πηκτώματα αγαρόζης τα οποία φέρουν ευμεγέθεις πόρους.

Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή πηκτώματος με περιεκτικότητα αγαρόζης 1% ζυγίστηκαν 0,6 g αγαρόζης και διαλύθηκαν σε 60 ml διαλύματος TAE (1X). Το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να γίνει ένα διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο, έως ότου να πήξει. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιείχε διάλυμα TAE (1X) και ακολούθησε η τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής. Στα δείγματα προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) σε τελική συγκέντρωση 1x. Το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς τον θετικό πόλο με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Για την οπτικοποίηση του DNA στην πηκτή χρησιμοποιήθηκε το Imager Uvitec Cambridge.

4.1.4 Έλεγχος ύπαρξης των επιθυμητών μεταλλάξεων

4.1.4.α Αλληλούχιση δειγμάτων πλασμιδιακού DNA

Για την τελική επιβεβαίωση της ύπαρξης των επιθυμητών μεταλλάξεων καθώς και του ελέγχου πιθανής ύπαρξης ανεπιθύμητων μεταλλάξεων από τυχόν λάθη της πολυμεράσης στην PCR πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε όλη την περιοχή του Exosc10 (Eurofins, Germany). Για την αλληλούχιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PrimerExosc10 168KR, PrimerExosc10 201KR που αναγράφονται στον πίνακα??.

4.2 Κυτταροκαλλιέργειες

4.2.1 Συντήρηση κυτταροκαλλιεργειών

4.2.1.α Διατήρηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών μέσω θρυψινοποίησης

Τα κύτταρα διατηρούνται μέσω αλλαγής του θρεπτικού μέσου έως ότου φτάσουν 100% πληρότητα. Όταν φτάνουν αυτό το ποσοστό του 100%, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου και πλύση με αποστειρωμένο διάλυμα PBS ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια θρεπτικού μέσου. Ακολουθεί η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του πιάτου με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης και επώαση για 3-5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε συνθήκες 5% CO₂. Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυ-τελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης συμβάλλοντας έτσι στην αποκόλληση των κυττάρων. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, είναι απαραίτητη η απενεργοποίηση της θρυψίνης μέσω της προσθήκης ίσου ή μεγαλύτερου όγκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Το αιώρημα των κυττάρων αραιώνεται κατάλληλα και ξεκινά νέα καλλιέργεια σε πιάτο 10 cm (1/10 αραιώση) ή πιάτο 60 mm (1/20 αραιώση). Η όλη κατεργασία των κυττάρων πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής.

4.2.1.β Μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων – πάγωμα κυττάρων

Για τη μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας πραγματοποιείται ψύξη τους με το υλικό παγώματος. Μετά τη διαδικασία θρυψινοποίησης (βλ. 2.2.1.α Διατήρηση των καρκινικών κυτταρικών σειρών μέσω θρυψινοποίησης) προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε falcon για φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε υλικό παγώματος και μεταφορά σε ειδικά cryovial. Τα κύτταρα ψύχονται σταδιακά, αρχικά στους -20°C για λίγες ώρες και ακολούθως στους -80°C προκειμένου να επιτευχθεί η ομαλή ψύξη τους, αρά και μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης τους. Τέλος, τα cryovials τοποθετούνται εντός δεξαμενής υγρού αζώτου.

4.2.1.γ Ξεπάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 2-3 λεπτά έως ότου να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του cryovial μεταφέρεται σε falcon και ακολουθεί σταδιακή προσθήκη θρεπτικού με αργό ρυθμό. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την πλήρη απομάκρυνση του DMSO. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα επαναιωρείται αργά και σταδιακά σε 8ml πλήρους θρεπτικού υλικού και μεταφέρεται σε 10cm πιάτο καλλιέργειας. Τα κύτταρα αφήνονται να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂.

4.2.1.δ Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στα τέσσερα μεγάλα γωνιακά τετράγωνα. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (κύτταρα/ml) υπολογίζεται ως ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων στα 4 τετράγωνα πολλαπλασιασμένο με το 10⁴ σύμφωνα με το τύπο που ακολουθεί:

$$(1^{\circ} + 2^{\circ} + 3^{\circ} + 4^{\circ} \text{ τετράγωνο}) / 4 * 10^4 \text{ κύτταρα/ml}$$

10μl από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκαν στην πλάκα Neubauer και σταθεροποιήθηκαν με μία καλυπτρίδα. Η παρατήρηση και μέτρηση των κυττάρων έγινε με τη βοήθεια μικροσκοπίου.

4.2.2 Διαμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

Η διαδικασία της διαμόλυνσης έχει ως στόχο την εισαγωγή εξωγενούς πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Εφικτή επίσης, είναι και η εισαγωγή μικρών μορίων RNA, όπως για παράδειγμα ειδικά μόρια siRNA τα οποία στοχεύουν στην αποσιώπηση της έκφρασης των εκάστοτε ενδογενών πρωτεϊνών. Η έκφραση του πλασμιδιακού DNA μπορεί να είναι είτε μόνιμη (stable) εφόσον το ξένο DNA ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα είτε παροδική (transient) εφόσον δεν ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα και σταδιακά αποικοδομείται. Στη παρούσα διπλωματική εργασία η έκφραση των πλασμιδιακών DNA έγινε παροδικά,. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά αντιδραστήρια για τη διαμόλυνση των κυττάρων: το μη λιπιδικό πολυμερές PEI και το αντιδραστήριο λιποφεκταμίνης.

4.2.2.α Διαμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση του μη λιπιδικού πολυμερούς PEI

Αρχή της μεθόδου

Το αντιδραστήριο PEI είναι ένα μη λιπιδικό πολυμερές. Ο ρόλος του ουσιαστικά εστιάζεται στη συμπύκνωση του DNA και τη δημιουργία θετικά φορτισμένων συσσωματωμάτων PEI-DNA. Τα

συσσωματώματα αυτά αλληλεπιδρούν με τα ανιονικά κατάλοιπα της κυτταρικής μεμβράνης και στη συνέχεια εισέρχονται εντός του κυττάρου μέσω της οδού της ενδοκύτωσης.

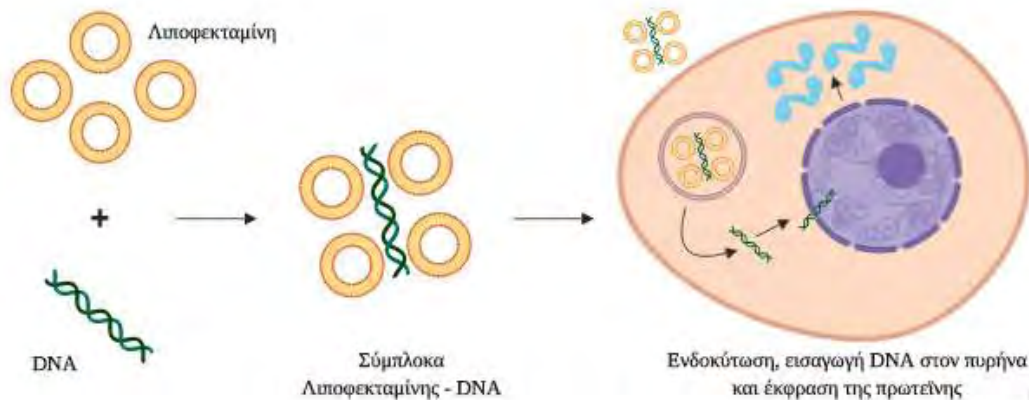
Πειραματική διαδικασία

Για να είναι επιτυχής και αποδοτική η διαμόλυνση κυττάρων HeLa, πρέπει το πιάτο καλλιέργειας την ημέρα της διαμόλυνσης να είναι σε ~80% κορεσμό. Οι ποσότητες που περιγράφονται στην παρακάτω διαδικασία αντιστοιχούσαν σε ένα 10cm πιάτο καλλιέργειας. Η αναλογία PEI προς πλασμιδιακό DNA ήταν 2:1. Για τη διαμόλυνση ενός 10cm πιάτου καλλιέργειας κυττάρων HeLa προστέθηκαν 15mg πλασμιδιακού DNA και 30μl του πολυμερούς PEI. Αρχικά, παρασκευάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε 1.5ml DMEM -FBS/-antibiotics και 15mg πλασμιδιακού DNA. Σε αυτό το στάδιο, είναι σημαντική η απουσία του ορού από το θρεπτικό μέσο καθώς εμποδίζει την δημιουργία των συσσωματωμάτων PEI-DNA. Σε αυτό προστέθηκαν 30μl PEI και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να δημιουργηθούν τα συσσωματώματα. Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα συμπληρώθηκε με 4.5ml DMEM με περιεκτικότητα 5% σε FBS. Ο συνολικός όγκος των 6ml μίγματος μεταφέρθηκε στο πιάτο καλλιέργειας αφού είχε προηγηθεί η απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και η έκπλυση του πιάτου καλλιέργειας με 6ml αποστειρωμένου PBS. Το πιάτο καλλιέργειας με το μίγμα επώαστηκε για 4 ώρες στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Μετά το πέρας του τετραώρου, έγινε απομάκρυνση του μίγματος και προσθήκη 8ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM.

4.2.2.β Διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με τη χρήση λιποφεκταμίνης

Αρχή της μεθόδου

Η λιποφεκταμίνη ανήκει στην κατηγορία των λιπιδικών αντιδραστηρίων διαμόλυνσης. Σχηματίζει κατιονικά λιπίδια τα οποία δημιουργούν λιποσώματα με θετικά φορτισμένη επιφάνεια. Τα θετικά αυτά φορτισμένα λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα και δημιουργούνται έτσι σύμπλοκα. Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη πλασματική μεμβράνη και επέρχεται η τήξη των συμπλόκων με αυτή. Τα σύμπλοκα εισάγονται στα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης και ύστερα το γενετικό υλικό εισέρχεται στον πυρήνα όπου ξεκινά να εκφράζεται (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση κατιονικών λιπιδικών αντιδραστηρίων (λιποφεκταμίνη). (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

Για τα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων HeLa με τη χρήση λιποφεκταμίνης ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αρχικά, κύτταρα HeLa επιστρώθηκαν σε 24-well πιάτα ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να βρίσκονταν σε 60% κορεσμό. Την ημέρα της διαμόλυνσης, αρχικά, αναμίχθηκαν 50μl DMEM-FBS/-antibiotics και 0.5μl λιποφεκταμίνης (μίγμα 1). Έπειτα, προετοιμάστηκε το μίγμα με τα νουκλεϊκά οξέα που επρόκειτο να εισαχθούν στα κύτταρα (μίγμα 2). Σε κάθε πηγαδάκι αντιστοιχούσαν 10ng πλασμιδιακού DNA και 20nM siRNA. Ακολούθησε η προσθήκη του μίγματος 1 στο μίγμα 2 και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να δοθεί χρόνος ώστε να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-νουκλεϊκών οξέων. Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα αυτά (συνολικός όγκος 100μl) μεταφέρθηκαν στα επιστρωμένα κύτταρα, συμπληρώθηκαν με 400μl DMEM -FBS/-antibiotics και επώαστηκαν στον επωαστικό κλίβανο για 4 ώρες αφού είχε προηγηθεί έκπλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS. Κατά τη διαδικασία της διαμόλυνσης είναι απαραίτητη η απουσία του ορού από το θρεπτικό μέσο καθώς παρεμποδίζει την συνολική διαδικασία και μειώνει δραματικά την ζωτικότητα των κυττάρων. Μετά το πέρας της 4ωρης επώασης έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε πλήρες θρεπτικό DMEM.

4.2.3 Επώαση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa σε συνθήκες υποξίας

Οι συνθήκες υποξίας 1% O₂ προσομοιάζονταν στον υποξικό θάλαμο Ruskinn INVIVO₂ (Εικόνα 24) που διαθέτει το εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο οποίο πραγματοποιήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία.



Εικόνα 24: Υποξικός θάλαμος Ruskinn INVIVO₂

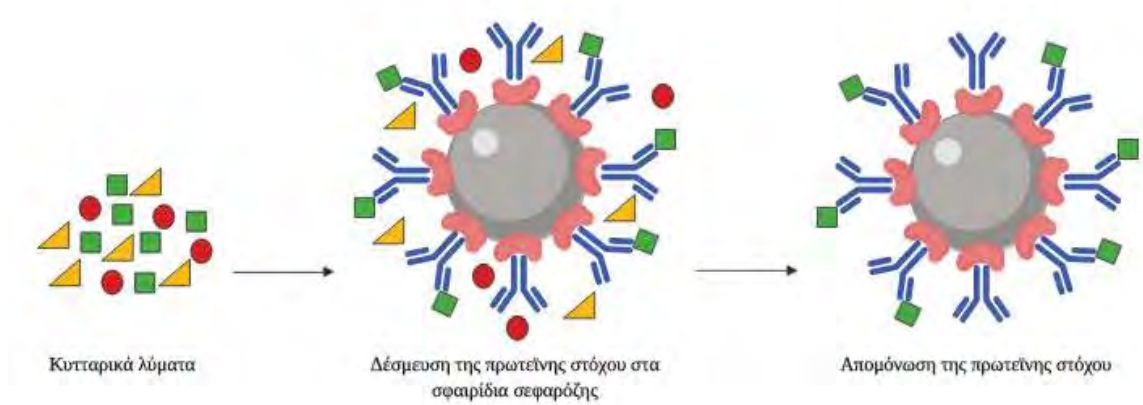
4.3 Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών

4.3.1 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες

Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μικρής κλίμακας χρωματογραφική μέθοδος καθαρισμού. Ουσιαστικά, η μέθοδος αυτή έχει ως αρχή την απομόνωση συγκεκριμένων αντιγόνων χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα έναντι αυτών. Το αντίσωμα έναντι μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι ακινητοποιημένο επάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, όπως ρητίνη (π.χ αγαρόζη) ή μαγνητικά σφαιρίδια, και στη συνέχεια επωάζεται με τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν την πρωτεΐνη-αντιγόνο στόχο (Εικόνα 25). Κατά τη διάρκεια της επώασης, ήπια ανάδευση του προσδεδεδμένου αντισώματος και του εκχυλίσματος επιτρέπει στο αντιγόνο -στόχο να συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Τα ακινητοποιημένα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος παραλαμβάνονται είτε με ήπια φυγοκέντρηση είτε με τη χρήση μαγνητών στην περίπτωση των μαγνητικών σφαιριδίων. Ως υπόστρωμα για το ακινητοποιημένο αντίσωμα χρησιμοποιούνται σφαιρίδια, συνήθως σεφαρόζης είτε αγαρόζης, ή εναλλακτικά μαγνητικά σφαιρίδια. Η ακινητοποίηση του αντισώματος πάνω στα σφαιρίδια μπορεί να γίνει είτε απευθείας με χημικό δεσμό είτε χρησιμοποιώντας ενδιάμεσες πρωτεΐνες, οι οποίες προσδέονται χημικά στα σφαιρίδια. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η πρωτεΐνη A, η πρωτεΐνη G ή μίγμα πρωτεΐνης A/G, είναι βακτηριακής προελεύσεως και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με ανοσοσφαιρίνες (Ig,

αντισώματα). Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης γίνεται υπό αποδιατακτικές συνθήκες ώστε όλες οι μη-ομοιοπολικές και ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών να μηδενιστούν.



Εικόνα 25: Απεικόνιση της αρχής της μεθόδου της τεχνικής ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

4.3.1.α Προετοιμασία κυτταρικών λυμάτων

Τα κυτταρικά λύματα για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης συλλέχθηκαν σε διάλυμα RIPA-0.1% SDS (RIPA με SDS σε τελική συγκέντρωση 0.1%, EGTA 0.005M, EDTA 0.005M, NEM 0.01M και τους αναστολείς πρωτεασών Leupeptin, Pepstatin και PMSF σε συγκέντρωση 1μl/ml). Η διαδικασία ήταν η εξής: Αρχικά, έγινε έκπλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1X και προσθήκη 300μl διαλύματος RIPA - 0.1% SDS. Η παρουσία του απορρυπαντικού SDS καθ' όλη την διαδικασία εξασφαλίζει την αρχική λύση των μεμβρανών των κυττάρων, ενώ η παρουσία των χειλικών παραγόντων και των αναστολέων πρωτεασών εξασφαλίζει την πλήρη αναστολή ενζύμων τα οποία θα μπορούσαν να καταστρέψουν τις προς μελέτη πρωτεΐνες. Ακολουθούσε απόξεση και συλλογή των κυτταρικών λυμάτων και η επιπλέον λύση και κατακερματισμός του DNA με την χρήση συσκευής υπερήχων (sonicator). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 13000rpm για 30 λεπτά στους 4°C προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα μέρη. Σε αυτό το στάδιο συλλέχθηκαν 30μl των κυτταρικών λυμάτων που αποτελούν τα δείγματα inputs του πειράματος, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως control για την εξακρίβωση της επιτυχούς δέσμευσης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Τέλος, τα κυτταρικά λύματα ψύχθηκαν ταχύτατα σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης.

4.3.1.β Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός τη συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford αφορά αξιόπιστη μέθοδο η οποία βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 να προσδένεται σε μόρια πρωτεΐνης υπό όξινες συνθήκες. Η πρόσδεση αυτή φέρει ως αποτέλεσμα την χρωματική αλλαγή από καφέ σε μπλε χρώμα. Η μέθοδος στηρίζεται στην παρουσία βασικών αμινοξικών καταλοίπων, αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης τα οποία συμβάλλουν στον σχηματισμό τον συμπλόκων της χρωστικής με τα μόρια πρωτεΐνης. Η χρωστική κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών παρουσία των συμπλόκων απορροφά στα 595 nm.

Πειραματική διαδικασία

200μl του αντιδραστηρίου Bradford αραιώθηκαν με ddH₂O σε τελικό όγκο 1ml ως τυφλό, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα έγινε προσθήκη 1μl διαλύματος πρωτεϊνών (δείγματα input). Ακολούθησε επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά προκειμένου να αναπτυχθεί το χρώμα και φωτομέτρηση στα 595 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα έγινε μέσω της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας (O.D.) με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).

4.3.1.γ Προετοιμασία σφαιριδίων, δέσμευση και τελική έκλυση των πρωτεϊνών

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν 2 προσεγγίσεις ανοσοκατακρήμνισης. Η μία αφορούσε την απομόνωση πρωτεϊνών που έφεραν τον επιτόπο HA μέσω της χρήσης σφαιριδίων συζευγμένων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA, ενώ η δεύτερη αφορούσε την απομόνωση του συνόλου των σουμυλιωμένων πρωτεϊνών από την SUMO-1 μέσω της χρήσης σφαιριδίων συζευγμένων με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SUMO-1. Αρχικά, 10μl σφαιριδίων σεφαρόζης για κάθε αντίδραση εξισορροπήθηκαν στο διάλυμα RIPA + 0.1% SDS. Στα εξισορροπημένα σφαιρίδια προστέθηκαν τα εκχυλίσματα των κυττάρων και ακολούθησε ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 4°C. Την επόμενη μέρα, τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο φυλάχθηκε ως δείγμα flow-through στους -20°C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις (Προσθήκη 1ml RIPA + 0.1% SDS, 5λεπτη επώαση υπό ανάδευση στους 4°C, φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 5 λεπτά) ώστε ότι μη ειδικό είχε συνδεθεί στα σφαιρίδια ασθενώς να απομακρυνθεί. Μετά το πέρας της τρίτης έκπλυσης, όλος ο όγκος του υπερκειμένου αφαιρέθηκε προσεκτικά. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια έγινε σε 50μl του SDS Laemmli Loading buffer το οποίο περιέχει το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Το απορρυπαντικό αυτό σχηματίζει υδρόφοβους δεσμούς με τις πρωτεΐνες, τις αποδιατάσσει, αποδεσμεύοντας έτσι και

την σύνδεση αντισώματος αντιγόνου. Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 λεπτά στους 37°C για την βελτιστοποίηση της έκλουσης και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στα 13000 x g. Στα εκλούσματα (δείγματα “eluate”) προστέθηκαν 12μl DTT 100mM (τελική συγκέντρωση 10mM), το οποίο ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τέλος, τα δείγματα επωάστηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά και φυλάχθηκαν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν.

4.3.4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Αρχή της μεθόδου

Ο αναλυτικός διαχωρισμός μακρομορίων που επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρηση, βασίζεται σε συγκεκριμένες αρχές της κίνησης φορτισμένων μακρομορίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό με βάση το μοριακό βάρος και το σχήμα των μακρομορίων. Το κατάλληλο πήκτωμα για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Σχηματίζεται ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (MBA). Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Το μέγεθος των πόρων ρυθμίζεται ανάλογα με την συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο, στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση (SDS-PolyAcrylamideGel Electrophoresis, SDS-PAGE) γίνεται υπό αποδιατακτικές συνθήκες και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η διαδικασία μονιμοποίησης των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση. Η ανοσοαποτύπωση περιλαμβάνει τη μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη και την ανίχνυσή τους με ειδικά για αυτές αντισώματα. Κατά την ηλεκτρομεταφορά έχουμε την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS πρωτεϊνών από το πήκτωμα προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Κατά τη κίνηση αυτή οι πρωτεΐνες παγιδεύονται και μονιμοποιούνται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι καθηλωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από ειδικά προς αυτές

αντισώματα και στη συνέχεια γίνεται χρήση ενός δευτερεύοντος αντισώματος που αναγνωρίζει και δεσμεύει τις σταθερές περιοχές του πρώτου και βρίσκεται σε σύνδεση με ένα ένζυμο-δείκτη την υπεροξειδάση του χρένου. Έτσι, όταν δρα πάνω στο κατάλληλο υπόστρωμα δίνει μια αντίδραση χημειοφωταύγειας, φανερώνοντας έτσι το σήμα της ύπαρξης του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντιγόνου.

4.3.4.α Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Στα εκλούσματα των πρωτεϊνών προστέθηκε το διάλυμα SDS Laemmli Loading buffer το οποίο περιείχε το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Το απορρυπαντικό αυτό σχηματίζει υδρόφοβους δεσμούς με τις πρωτεΐνες, τις αποδιατάσσει και τις προσδίδει επίμηκες σχήμα και καθαρό αρνητικό φορτίο. Προστέθηκε επίσης DTT το οποίο ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 95°C.

4.3.4.β Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Για την παρασκευή του πηκτώματος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, τα $\frac{3}{4}$ του πηκτώματος καταλαμβάνει το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ενώ το $\frac{1}{4}$ του πηκτώματος καταλαμβάνει το πήκτωμα επιστοιβαξής (stacking gel). Οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων δημιουργούνται με τη βοήθεια «χτένας» η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά η σύσταση των δύο πηκτωμάτων (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE

Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα επιστοιβαξής
8-15% ακρυλαμίδιο	4.5% ακρυλαμίδιο
0,04% v/v APS	0,0625% v/v APS
0,1% v/v TEMED	0,1% v/v TEMED
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβαξής
ddH ₂ O	ddH ₂ O

Το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλυπτόταν πλήρως με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Η ηλεκτροφόρηση έγινε υπό σταθερή ένταση ρεύματος 0.002A. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αναλύθηκε με χρώση με Coomassie brilliant blue είτε χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

4.3.4.γ Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε υγρό περιβάλλον στην συσκευή reqlab® Semi-Dry Blotter (VWR). Όλα τα επιμέρους υλικά

εμποτίστηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) και επιστρώθηκαν προσεκτικά ώστε να μην δημιουργούνταν φυσαλίδες μεταξύ τους καθώς αυτό θα εμπόδιζε την ομαλή ροή ρεύματος. Η τοποθέτηση των υλικών στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς έγινε με την εξής σειρά: 2 χαρτιά Whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και 2 χαρτιά Whatman. Η ηλεκτρομεταφορά έλαβε μέρος σε συνθήκες σταθερής τάσης 10 V για 60 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών και για να σημειωθούν οι διαδρομές στην μεμβράνη, αυτή βάφτηκε με τη χρωστική PonceauS. Η μεμβράνη ξεβάφτηκε για λίγα λεπτά με απιονισμένο νερό.

4.3.4.δ Ανοσοανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, οι πρωτεΐνες έχουν μονιμοποιηθεί επάνω στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη εμβαπτίστηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού (blocking). Ο σκοπός της επώασης αυτής με το συγκεκριμένο διάλυμα είναι η δέσμευση όλων των μη-ειδικών θέσεων δέσμευσης της μεμβράνης σε βαθμό κορεσμού από την καζεΐνη του γάλακτος. Έτσι, αποφεύγεται η μη ειδική αλληλεπίδραση του αντισώματος με περιοχές της μεμβράνης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε υπό ανάδευση ολονύκτια στους 4°C με το πρώτο αντίσωμα το οποίο ήταν διαλυμένο σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με 1x PBS – 0.1% Tween 20 και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG του πρώτου αντισώματος (κουνελιού ή ποντικού) αραιωμένο ομοίως σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση του χρένου HRP. Μετά τη σύνδεση και του δεύτερου αντισώματος ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών προκειμένου να απομακρυνθεί ότι πιθανώς έχει συνδεθεί μη ειδικά. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στηρίζεται στην αντίδραση χημειοφωταύγειας κατά την οποία η υπεροξειδάση του δευτέρου αντισώματος σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση ενός υποστρώματος λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Το εμφανιστικό διάλυμα επώαστηκε για 1 λεπτό με τη μεμβράνη ώστε να δοθεί χρόνος για την πραγματοποίηση της αντίδρασης και στη συνέχεια το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύθηκε με τη χρήση του Imager Uvitec Cambridge.

4.3.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Αρχή της μεθόδου

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα για την ανίχνευση και την παρατήρηση του εντοπισμού

συγκεκριμένων αντιγόνων ή αντισωμάτων σε ιστούς ή κύτταρα. Τα φθοριοχρώματα είναι ειδικές χημικές ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να φθορίζουν και χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των αντισωμάτων. Για την παρατήρηση του φθορισμού χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοροχρώματος, αυτά διεγείρονται και απελευθερώνουν με τη μορφή φωτονίων την ενέργεια που προσέλαβαν. Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Εικόνα 26) χωρίζεται στα εξής στάδια: Αρχικά, τα προς μελέτη κύτταρα καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε γυάλινες καλυπτρίδες όπου υφίστανται διαδικασία μονιμοποίησης. Προστίθεται σε αυτά το πρώτο κύριο αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης και ύστερα ακολουθεί η προσθήκη του δευτέρου αντισώματος έναντι των IgG του πρώτου αντισώματος το οποίο φέρει και το φθορόχρωμα. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού που φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.



Εικόνα 26: Απεικόνιση της αρχής της μεθόδου της τεχνικής έμμεσου ανοσοφθορισμού. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

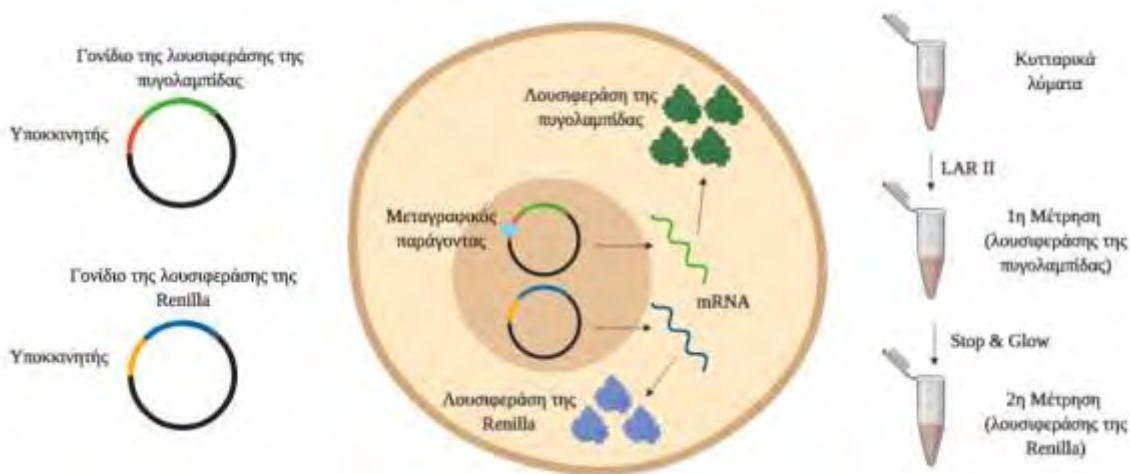
Αρχικά, κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν και προσκολλήθηκαν πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες. Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με διάλυμα PBS 1X και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν στις καλυπτρίδες με διάλυμα φορμαλδεΐδης 3.7% για 5 λεπτά. Η φορμαλδεΐδη είναι η πιο κοινή μονιμοποιητική ουσία και δρα σχηματίζοντας δεσμούς (cross-linking) με τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS 1X. Για τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών έγινε επίδραση διαλύματος 0,2% Triton X-100 σε PBS για 5 λεπτά στους 4°C. Επαναλήφθηκαν 3 πλύσεις με PBS και έπειτα έγινε κατεργασία με διάλυμα κορεσμού 1% BSA, 0,1% Tween 20 σε PBS προκειμένου να καλυφθούν όλες οι πιθανές μη ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης με τα αντισώματα. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% BSA σε PBS ολονύκτια στους 4°C. Την επόμενη μέρα, εκπλύθηκαν

τρεις φορές και επώστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα ειδικό έναντι του πρώτου αντισώματος το οποίο ήταν συζευγμένο με το φθορόχρωμα Alexa για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS και μία πλύση με αποστειρωμένο H₂O. Εν συνεχεία, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με 10μl διαλύματος διατήρησης MOWIOL στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI. Η ουσία αυτή δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι επιτυγχάνεται η χρώση του πυρήνα των κυττάρων. Στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση των αντικειμενοφόρων σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss και λήψη φωτογραφιών με το πρόγραμμα Zen. Η επεξεργασία των εικόνων του ανοσοφθορισμού έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.

4.3.6 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης

Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα λουσιφεράσης Dual-Luciferase Reporter assay το οποίο βασίζεται στην μέτρηση της χημειοφωταύγειας που προκύπτει όταν το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας *Photinus pyralis* οξειδώνει τη λουσιφερίνη σε μια αντίδραση που χρησιμοποιεί ATP και Mg²⁺. Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως η ένταση του οποίου μετράται μέσω ενός λουμινομέτρου. Παράλληλα με την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας μετράται και η δράση ενός δεύτερου ενζύμου λουσιφεράσης της *Renilla* η οποία χρησιμοποιείται ως εσωτερικό control για την απόδοση της διαμόλυνσης (Εικόνα 27). Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο αναφοράς *pGL3-VEGF-5HRE*, στο οποίο είναι κλωνοποιημένο το γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου VEGF (βλ. Υλικά-3.1) και το πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης, το *pCI-Renilla*, το οποίο κωδικοποιεί τη λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*.



Εικόνα 27: Απεικόνιση της αρχής της μεθόδου της τεχνικής μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μέτρησης λουσιφεράσης τα κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε 24-well πιάτα. 40 ώρες πριν την διεξαγωγή του πειράματος, διαμολύνθηκαν με τη χρήση λιποφεκταμίνης όπως περιγράφεται στις παραπάνω παραγράφους (βλ. 4.2.2.β Διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με τη χρήση λιποφεκταμίνης) με τα πλασμίδια *pGL3-VEGF-5HRE*, *pCI-Renilla* και siRNA που στοχεύει στην αποσίωπιση της έκφρασης της Exosc10. Στα αντίστοιχα δείγματα control, χρησιμοποιήθηκε αντ' αυτού ntRNA. Για την προετοιμασία των δειγμάτων αρχικά έγινε έκπλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1X και στην συνέχεια λύση αυτών μέσω της προσθήκης 80μl Passive Lysis Buffer (PLB). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Έπειτα, τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στα 13000 x g. Για την μέτρηση της χημειοφωταύγειας, σε 20μl δείγματος προστέθηκαν 20μl λουσιφερίνης (Luciferase Assay Reagent II, LAR II). Σημειώθηκε η ένδειξη του λουμινόμετρου και ακολούθησε ταχύτατα προσθήκη 10μl Stop & Glo® Reagent. Το αντιδραστήριο αυτό σε συγκεκριμένο pH απενεργοποιεί την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και προσθέτει το υπόστρωμα για την μέτρηση της Renilla λουσιφεράσης. Τέλος, από τις μετρήσεις που προέκυψαν, υπολογίσθηκαν οι λόγοι των ενδείξεων για την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας προς την Renilla. Ο υπολογισμός των τελικών τιμών έγινε ως εξής: οι τιμές λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας διαιρέθηκαν με την αντίστοιχη ένδειξη της ίδιας επανάληψης για τις τιμές λουσιφεράσης Renilla. Στην συνέχεια, υπολογίσθηκαν οι μέσοι όροι των τριών κλασμάτων από κάθε τριπλέτα και κανονικοποιήθηκαν ως προς τον μέσο όρο της συνθήκης

κοντρόλ στη νορμοξία (ntRNA). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism6 (ισχύει ότι $**P < 0.01$ και $****P < 0.0001$).

4.3.7 Απομόνωση πυρηνίσκων από κυτταρικά λύματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa

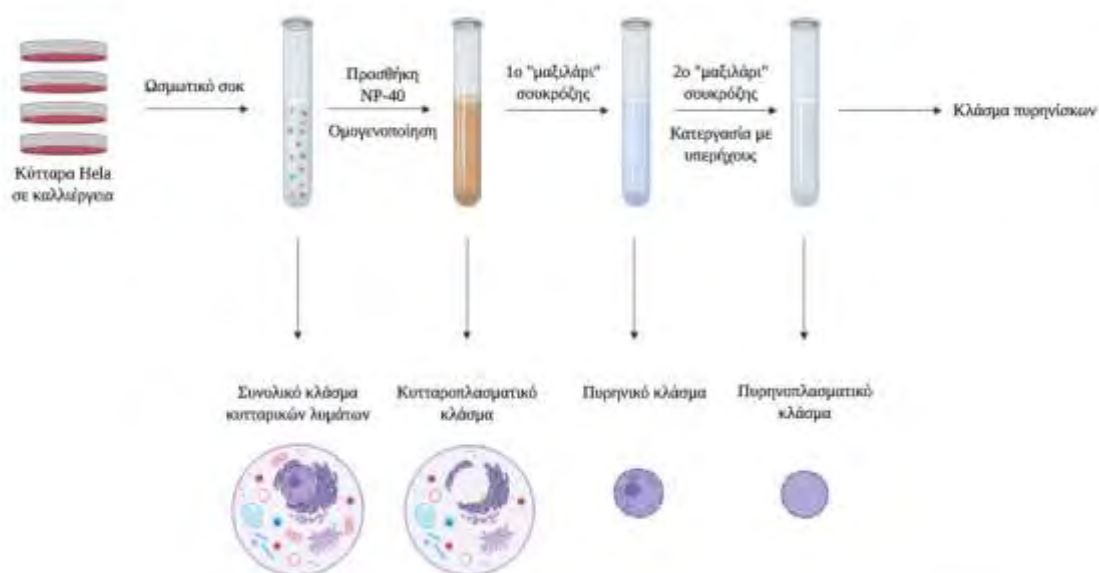
Αρχή της μεθόδου

Για την απομόνωση πυρηνίσκων ακολουθήθηκε το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Hacot S. et al (*Curr Protocol Cell Biol*, 2010). Αυτό το πρωτόκολλο αφορά τη καρκινική σειρά HeLa και στηρίζεται στην εξής αρχή: αρχικά γίνεται συλλογή των κυττάρων μέσω ωσμωτικού σοκ με το κατάλληλο υποτονικό διάλυμα. Στην συνέχεια, επέρχεται η λύση των κυτταρικών μεμβρανών εκ των οποίων και της πυρηνικής μεμβράνης με την προσθήκη του μη ιονικού απορρυπαντικού NP-40. Οι πυρήνες απομονώνονται μέσω ενός «μαξιλαριού σουκρόζης». Ακολουθεί κατεργασία των λυμάτων με υπερήχους (sonication) προκειμένου να καταστραφούν οι πυρήνες και τέλος μέσω ενός δεύτερου «μαξιλαριού σουκρόζης» παραλαμβάνονται οι πυρηνίσκοι (Εικόνα 28). Σε κάθε στάδιο είναι απαραίτητη η παρατήρηση των κλασμάτων σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

Πειραματική διαδικασία

Συνολικά χρειάστηκαν 4 πιάτα καλλιέργειών 10cm που είχαν επωαστεί σε συνθήκες νορμοξίας και αντίστοιχα 4 πιάτα καλλιέργειών 10cm που είχαν επωαστεί σε συνθήκες υποξίας 1% O₂ ενώ ο κορεσμός ανερχόταν στο 80% την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με 10ml παγωμένου PBS. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 1ml παγωμένου PBS ανά πιάτο (συνολικός όγκος: 4ml για κάθε συνθήκη). Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στα 500 x g στους 4°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προσδιορίστηκε ο όγκος αναφοράς με τον εξής τρόπο: Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 όγκους NSB (200μl) και μετρήθηκε ο συνολικός όγκος. Αυτός ο όγκος αντιστοιχεί στον αρχικό όγκο των κυττάρων και των όγκο διαλύματος NSB που προστέθηκε. Ο όγκος αναφοράς είναι λοιπόν η διαφορά του συνολικού όγκου που μετρήθηκε μείον τον όγκο του διαλύματος NSB που προστέθηκε. Στο παρόν πείραμα ο όγκος αναφοράς τόσο στην συνθήκη νορμοξία όσο και στην συνθήκη υποξία ήταν 125μl. Αφότου προσδιορίστηκε ο όγκος αναφοράς τα δείγματα προσαρμόστηκαν με την προσθήκη παγωμένου διαλύματος NSB στους 15 όγκους αναφοράς (συνολικός όγκος: 1.875ml) και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C. Σε αυτό το στάδιο παραλήφθηκε το πρώτο δείγμα της κλασμάτωσης (90μl) το οποίο αφορά το συνολικό κλάσμα κυτταρικών λυμάτων και μία σταγόνα του κάθε δείγματος της κάθε συνθήκης παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Για την λύση των κυττάρων, έγινε προσθήκη του διαλύματος 10% NP-40 (56μl) ώστε να αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 0.3%. Τα δείγματα

ομογενοποιήθηκαν με την χρήση ομογενοποιητή Dounce τόσες φορές ώστε κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο να μην φαίνονται διακριτά κύτταρα (10 strokes). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1200 x g στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 όγκους αναφοράς (1.25ml) του διαλύματος 250mM σουκρόζης με 10mM MgCl₂ και κάτω από αυτό προστέθηκαν 10 όγκοι επιπλέον (1.25ml) του διαλύματος 880mM σουκρόζης με 5mM MgCl₂. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 1200 x g στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 όγκους αναφοράς (1.25ml) του διαλύματος 340mM σουκρόζης με 5mM MgCl₂. Σε αυτό το στάδιο παραλήφθηκε και το πυρηνικό κλάσμα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε κατεργασία με υπερήχους για 5-6 φορές στα 40V για 30 δευτερόλεπτα με 5 λεπτα διαλείμματα. Κάθε φορά γινόταν παρατήρηση κάτω από το μικροσκόπιο για την πλήρη ρήξη των πυρήνων. Κάτω από το κλάσμα των «σπασμένων» πυρήνων προστέθηκε το τελευταίο διάλυμα 880mM σουκρόζης, ακολούθησε φυγοκέντρηση 20 λεπτών στα 2000 x g στους 4°C και συλλέχθηκε το κλάσμα νουκλεοπλάσματος. Τέλος, το κλάσμα των πυρηνίσκων επαναιωρήθηκε σε 100μl διαλύματος σουκρόζης 0.34M και η συγκέντρωση πρωτεϊνών σε αυτό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε ανάλυση όλων των κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση Coomassie ή ανοσοαποτύπωση κατά Western.



Εικόνα 28: Συνοπτική απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης πυρηνίσκων. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

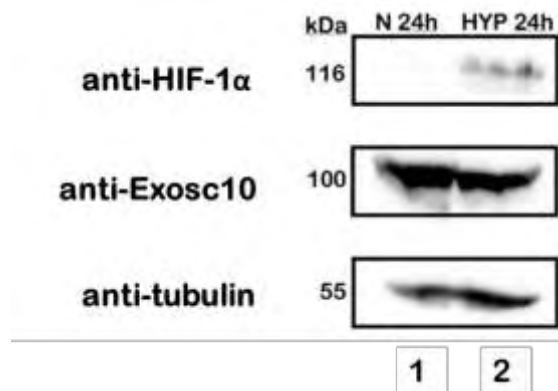
5.1 Μελέτη της ενδογενούς Exosc10 σε συνθήκες υποξίας

Έναυσμα για την παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσαν αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης της Dr. Χαχάμη Γεωργίας, Λέκτορας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, [135]. Αναλυτικά στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε ανοσοκατακρήμιση όλων των σουμυλιωμένων πρωτεϊνών και ποσοτική πρωτεομική ανάλυση τους σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (SILAC) σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Από τη μελέτη προέκυψαν πρωτεΐνες που παρουσίαζαν αλλαγές στο πρότυπο σουμυλίωσής τους κατά την υποξία. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που έδειξαν να αλλάζουν σημαντικά τα επίπεδα σουμυλίωσης τους χωρίς όμως να παρουσιάζουν αλλαγές στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα κατά την υποξία ήταν η πρωτεΐνη Exosc10 (Exosome Component 10).

Το πρώτο σκέλος της διπλωματικής εργασίας εστιάζεται στην προκαταρκτικό χαρακτηρισμό της Exosc10 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας. Για το σκοπό αυτό αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Exosc10 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, καθώς και η επίδραση της αποσιώπησής της σε συνθήκες υποξίας.

5.1.1 Μελέτη της έκφρασης της Exosc10 σε συνθήκες υποξίας

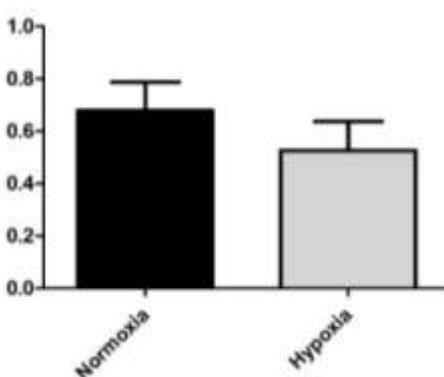
Για την μελέτη της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση των καρκινικών κυττάρων HeLa σε φυσιολογικές συνθήκες (νορμοξία) και σε συνθήκες 1% οξυγόνου (υποξία). Μετά το πέρας της επώασης, οι πρωτεΐνες των κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση (βλ. Μέθοδοι-4.3.4) χρησιμοποιώντας ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Exosc10.



Εικόνα 29: Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της Exosc10 σε καρκινικά κύτταρα HeLa που επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (διαδρομή 1) και υποξίας (διαδρομή 2). Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού

αντισώματος έναντι της *Exosc10*. Ως μάρτυρας ισοφορτόματος χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη τουμπουλίνη, και ως μάρτυρας εφαρμογής της υποξίας χρησιμοποιήθηκε ο HIF-1α.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, ο HIF-1α όπως αναμενόταν επάγεται σε συγκέντρωση 1% οξυγόνου (διαδρομή 2) και επιβεβαιώνει την ύπαρξη υποξικών συνθηκών στην καλλιέργεια. Η *Exosc10* εμφανίζει σημαντικά επίπεδα έκφρασης στη νορμοξία (διαδρομή 1) τα οποία δεν αλλάζουν σημαντικά στην υποξία (διαδρομή 2). Τα αποτελέσματα 2 ανεξάρτητων πειραμάτων ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) και κανονικοποιήθηκαν ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνης. Το διάγραμμα που προκύπτει από αυτές τις τιμές (επίπεδα *Exosc10*/τουμπουλίνη) σε νορμοξία και υποξία παρουσιάζεται στην Εικόνα 30, και όπως φαίνεται δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση της πρωτεΐνης μεταξύ των δύο συνθηκών (ns, $P=0.948$).

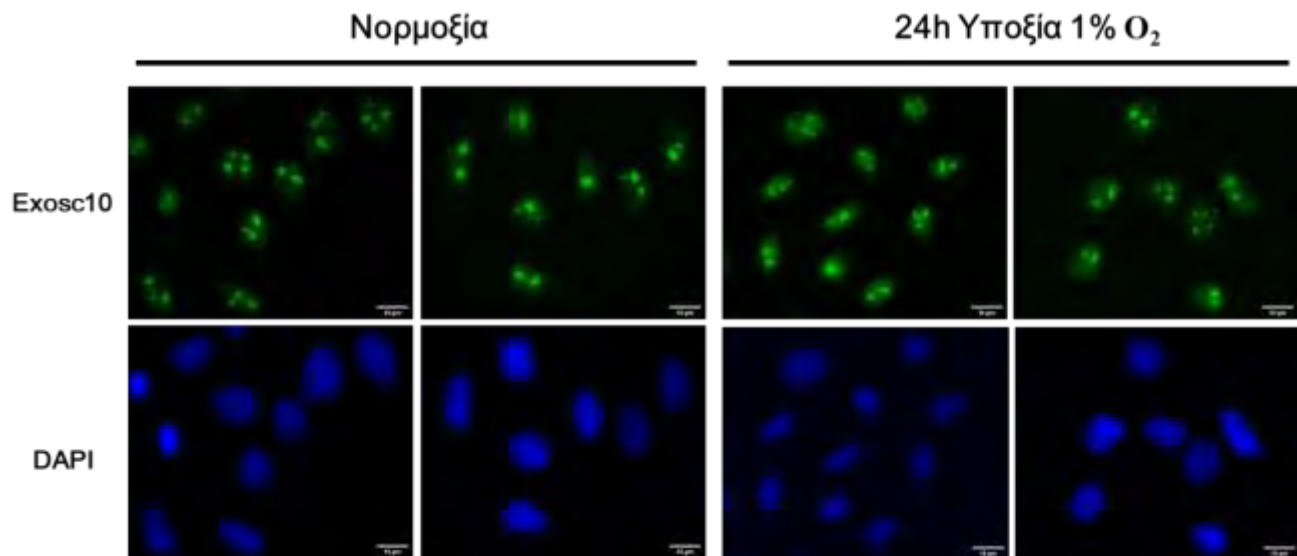


Εικόνα 30: Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της *Exosc10* σε νορμοξία και υποξία. Στον άξονα Y, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές των επιπέδων της *Exosc10* κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνων. Η μπάρα αντιστοιχεί στην νορμοξία, ενώ η γκρι στην υποξία. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από 2 ανεξάρτητα πειράματα (ns, $P = 0.948$). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge), ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.

5.1.2 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της *Exosc10* σε συνθήκες υποξίας

Προκαταρκτικά πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) σε καρκινικά κύτταρα HeLa (Χαχάμη Γ., αδημοσίευτα αποτελέσματα) που αφορούσαν στην παρατήρηση της ενδογενούς πρωτεΐνης *Exosc10* σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, έδειξαν ότι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός επηρεάζεται μετά το πέρας 48 ωρών υποξίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στην νορμοξία, η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά μεγάλο βαθμό στους πυρηνίσκους, ενώ μετά από 48ωρη επώαση των κυττάρων στην υποξία, ο εστιασμένος αυτός εντοπισμός στους πυρηνίσκους φάνηκε να μειώνεται και η πρωτεΐνη να εντοπίζεται περισσότερο διάχυτη στο πυρηνόπλασμα. Για να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της υποξίας (1% O_2) για μικρότερο χρονικό διάστημα υποξίας (24ώρες) στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της ενδογενούς πρωτεΐνης

Exosc10 πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα HeLa και ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (βλ.Μέθοδοι-4.3.5).



Εικόνα 31: Έλεγχος έκφρασης της ενδογενούς Exosc10 σε καρκινικά κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Exosc10 (πράσινη χρώση) ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε). Τα διαφορετικά πάνελ προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

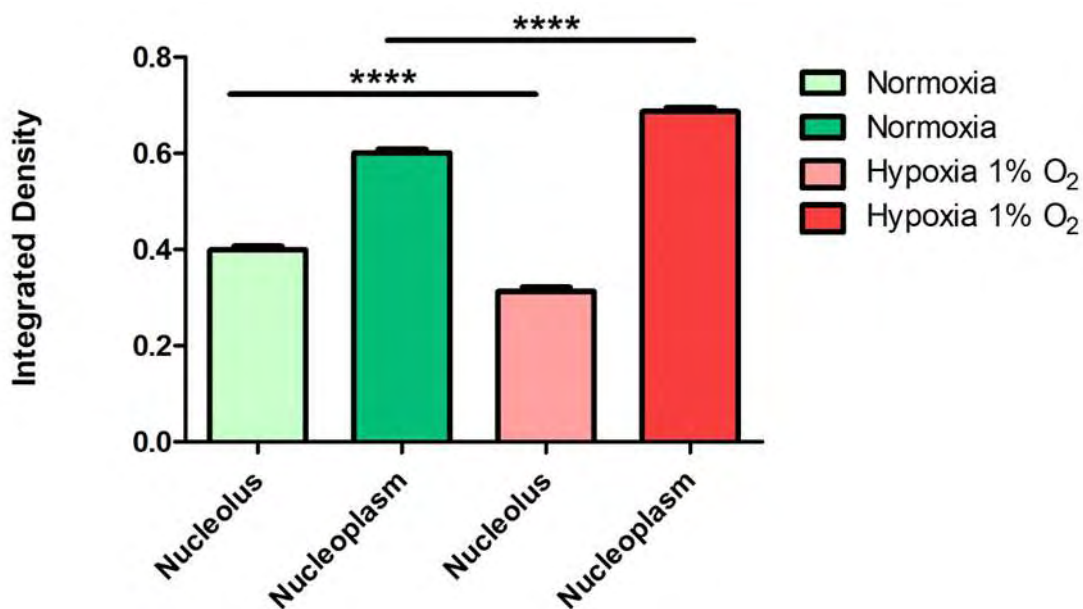
Όπως αποτυπώνεται και στην Εικόνα 31, σε συνθήκες νορμοξίας, η πρωτεΐνη Exosc10 έχει έναν εστιασμένο εντοπισμό στους πυρηνίσκους με ένα μικρό ποσοστό της να βρίσκεται και στο πυρηνόπλασμα. Μετά την επίδραση 24ωρης υποξίας, ο εντοπισμός στους πυρηνίσκους διατηρείται, παρόλα αυτά το σήμα στο πυρηνόπλασμα φαίνεται πιο έντονο.

Για την ποσοτικοποίηση των διαφορών στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Exosc10 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητα πειράματα ανοσοφθορισμού και αναλύθηκαν 10 εικόνες από κάθε πείραμα (συνολικά 110 κύτταρα για κάθε συνθήκη). Τα όρια των πυρηνίσκων και πυρήνων καθορίστηκαν μέσω του εργαλείου “threshold” (Image→Adjust→Threshold) (Εικόνα 32). Για κάθε κύτταρο υπολογίστηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) του σήματος των πυρηνίσκων και των πυρήνων (Analyze→Set measurements→Integrated density, Analyze→Analyze particles). Για τον υπολογισμό της ενσωματωμένης πυκνότητας του πυρηνόπλάσματος αφαιρέθηκαν οι τιμές της ενσωματωμένης πυκνότητας των πυρηνίσκων από τις αντίστοιχες των πυρήνων ($\text{integrated density}_{\text{nucleoplasm}} = \text{integrated density}_{\text{nucleus}} - \text{integrated density}_{\text{nucleolus}}$). Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σήματος στον πυρηνίσκο και του πυρηνικού σήματος της Exosc10 τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 33. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.



Εικόνα 32: Επεξεργασία εικόνας μέσω του του εργαλείου Threshold του προγράμματος ImageJ, για τον καθορισμό και ποσοτικοποίηση του σήματος της ενδογενούς Exosc10 σε πυρήνα και πυρηνόπλασμα.

Σύμφωνα με την Εικόνα 33, παρατηρήθηκε μείωση του σήματος της Exosc10 στους πυρηνίσκους στην υποξία συγκριτικά με την νορμοξία, η οποία είναι στατιστικά σημαντική (p^{****}). Η αλλαγή αυτή ακολουθείται από αντίστοιχη στατιστικά σημαντική αύξηση του πυρηνοπλασματικού σήματος της Exosc10 στην υποξία σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (νορμοξία), υποδηλώνοντας την μεταφορά της Exosc10 από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα κατά την υποξία, χωρίς όμως να παρατηρείται μείωση των ολικών επιπέδων της πρωτεΐνης (βλ. Εικόνες 28,29).



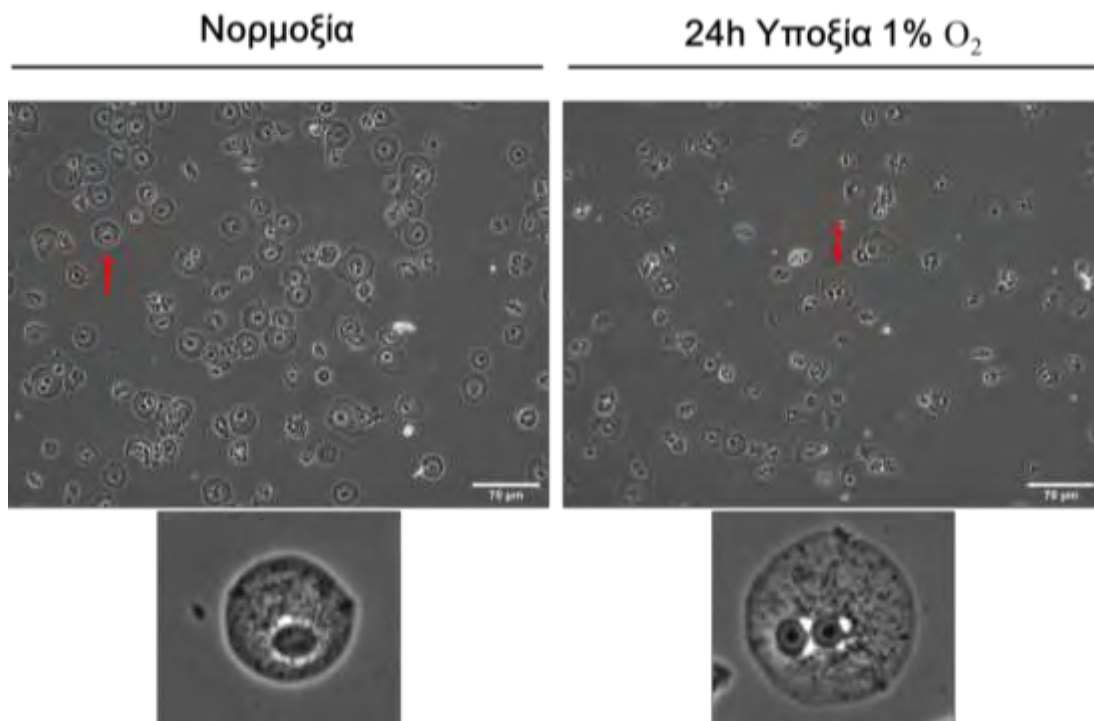
Εικόνα 33: Ποσοτικοποίηση του σήματος ανοσοφθορισμού της πρωτεΐνης Exosc10 σε πυρηνίσκους και πυρηνόπλασμα σε νορμοξία (πράσινες μπάρες) και 24ωρη υποξία (κόκκινες μπάρες). Συμπεριλήφθηκαν 2 ανεξάρτητα πειράματα ανοσοφθορισμού από τα οποία αναλύθηκαν 20 εικόνες με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων να ανέρχεται στα 110 για κάθε συνθήκη ($n=110$, $****P < 0.0001$). Για κάθε κύτταρο υπολογίστηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) του σήματος των πυρηνίσκων και των πυρήνων. Για τον υπολογισμό της ενσωματωμένης πυκνότητας του πυρηνοπλάσματος αφαιρέθηκαν οι τιμές της ενσωματωμένης πυκνότητας των πυρηνίσκων από τις αντίστοιχες των πυρήνων ($integrated\ density_{nucleoplasm} = integrated\ density_{nucleus} - integrated\ density_{nucleolus}$). Οι τιμές έντασης που

προέκυψαν από κάθε κύτταρο κανονικοποιήθηκαν ως προς την συνολική ένταση των πυρήνων τους και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

5.1.3 Ανάλυση της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 μετά από κλασμάτωση πυρηνίσκων καρκινικών κυττάρων HeLa

Για την επιβεβαίωση της παρατηρούμενης, με ανοσοφθορισμό, αλλαγής στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Exosc10 στην υποξία, πραγματοποιήθηκε πείραμα κυτταρικής κλασμάτωσης με σκοπό την απομόνωση σε διαφορετικά κλάσματα των πυρήνων, των πυρηνίσκων και του πυρηνοπλάσματος από κυτταρικά λύματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Για την πραγματοποίηση του πειράματος κλασμάτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία είχαν επωαστεί για 24 ώρες σε νορμοξία και υποξία αντίστοιχα. Η αρχή της μεθόδου και η πειραματική διαδικασία του πειράματος αυτού περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (βλ. Μέθοδοι-4.3.7).

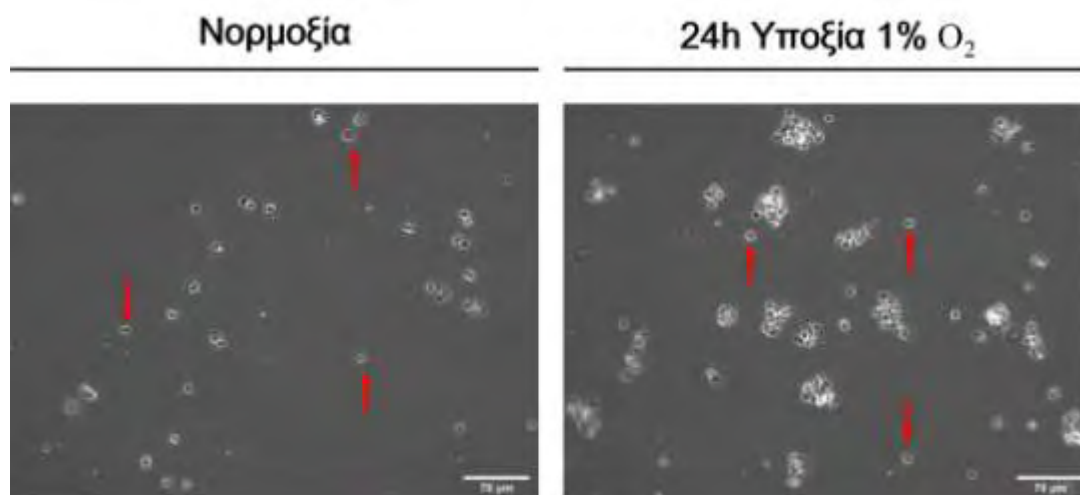
1^ο στάδιο: Αρχικά, τα κύτταρα μετά την συλλογή τους υπέστησαν ωσμωτικό σοκ με επώαση σε υποτονικό διάλυμα προκειμένου να αποκολληθούν τα κυτταροπλάσματα από τους πυρήνες. Τα κύτταρα σε αυτό το στάδιο έχουν χάσει την φυσιολογική τους διαμόρφωση και μοιάζουν πιο σφαιρικά. (Εικόνα 34)



Εικόνα 34: 1^ο στάδιο πειράματος κλασμάτωσης. Στο επάνω μέρος της εικόνα παρουσιάζεται η εικόνα του συνόλου των κυττάρων HeLa (συνθήκες: νορμοξία και υποξία) μετά από επώαση με υποτονικό διάλυμα. Στο κάτω μέρος, διακρίνεται η σφαιρική διαμόρφωση που έχουν αποκτήσει τα κύτταρα μετά την κατεργασία αυτή.

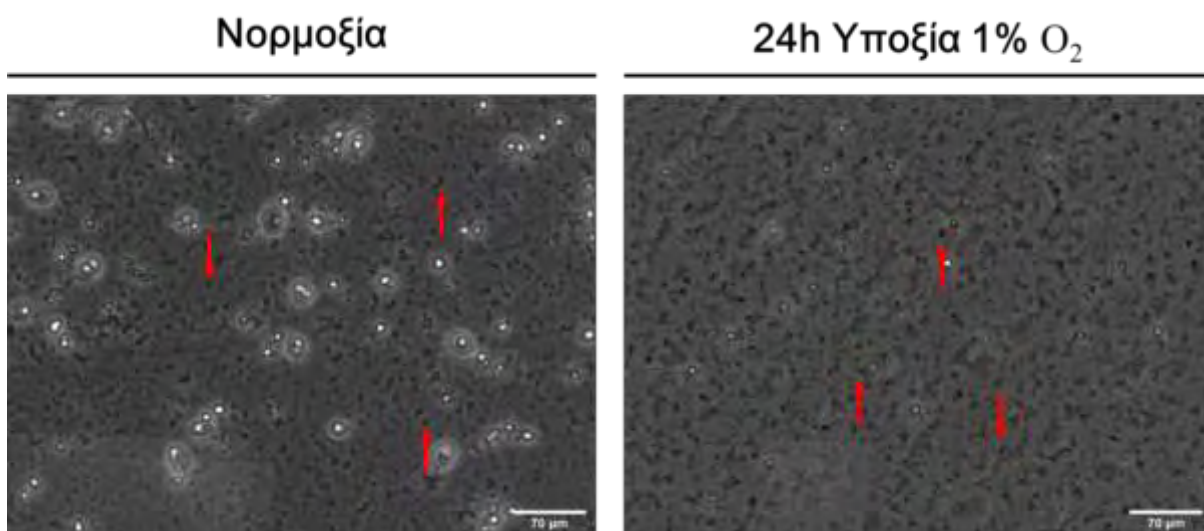
2^ο στάδιο: Μετά το ωσμωτικό σοκ και την αποκόλληση του κυτταροπλάσματος, στα δείγματα προστέθηκε το μη-ιονικό απορρυπαντικό NP-40, το οποίο προκαλεί την κατάρρευση των

πλασματικών μεμβρανών και την λύση των κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο, στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν οι ακέραιοι πυρήνες των κυττάρων (Εικόνα 35) και έγινε η συλλογή του κυτταροπλάσματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του πρώτου «μαξιλαριού» σουκρόζης και έτσι επιτεύχθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός των πυρήνων.



Εικόνα 35: 2^ο στάδιο πειράματος κλασμάτωσης. Με βέλη υποδεικνύονται οι πυρήνες μετά την λύση των κυττάρων με το μη ανιονικό απορρύπαντικό NP-40.

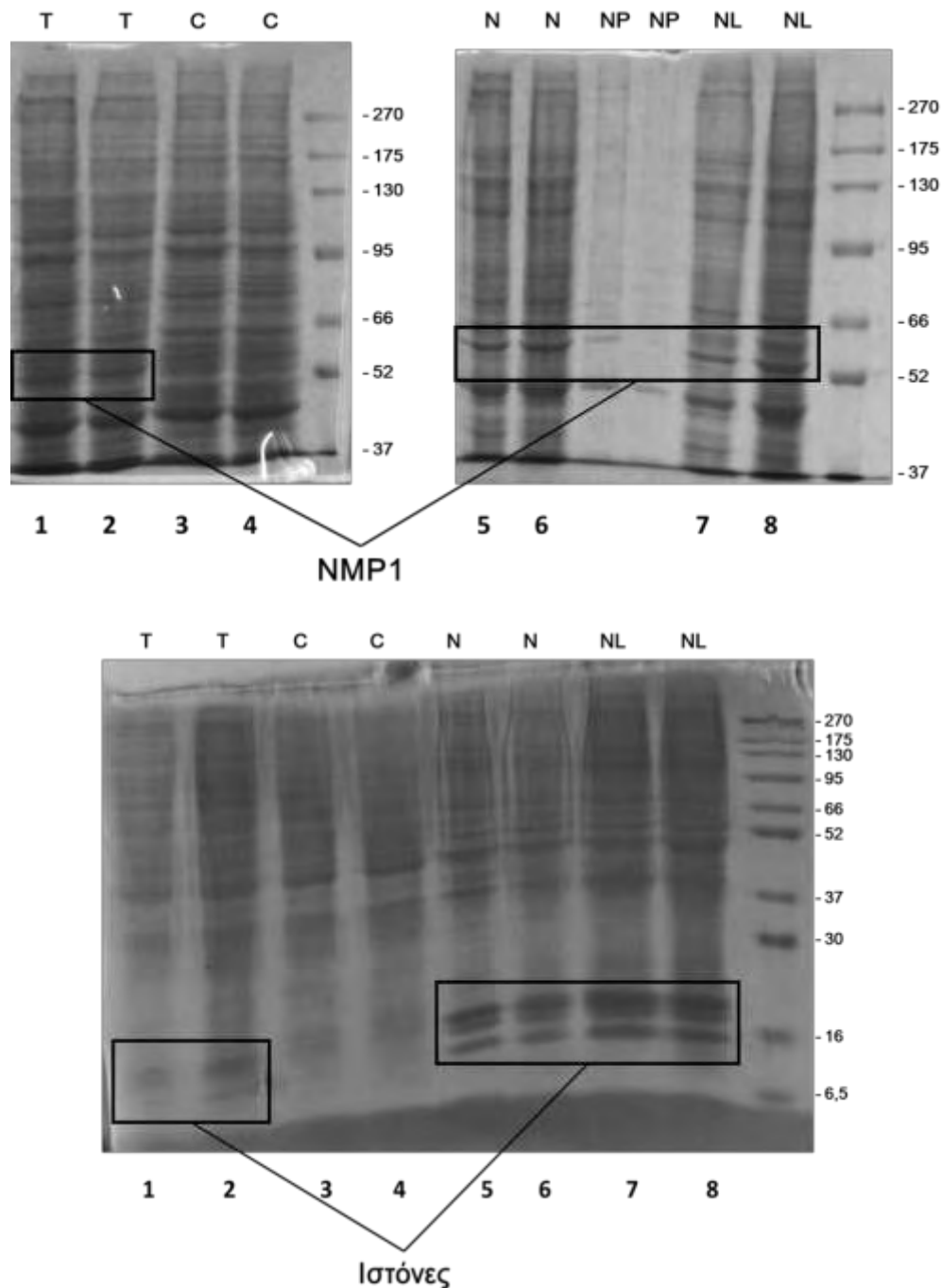
3^ο στάδιο: Στο τρίτο στάδιο του πειράματος, πραγματοποιήθηκε λύση των πυρήνων και κατακερματισμός της χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων και η συλλογή του κλάσματος του πυρηνοπλάσματος. Το τελικό κλάσμα το οποίο παραλήφθηκε ήταν οι καθαροί πυρηνίσκοι. Οι πυρηνίσκοι είναι διακριτοί ως μαύρες κουκκίδες στην Εικόνα 36.



Εικόνα 36: 3^ο στάδιο πειράματος κλασμάτωσης. Διακρίνονται οι πυρηνίσκοι ως μαύρες κουκκίδες σε νορμοξία και υποξία (κόκκινα βέλη).

Απομονώθηκαν συνολικά 4 κλάσματα: το κυτταροπλασματικό, το ολικό πυρηνικό κλάσμα, το πυρηνόπλασμα και οι πυρηνίσκοι. Ίδια ποσότητα πρωτεϊνών (10μg), από τα διάφορα κλάσματα και τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, αναλύθηκαν σε SDS-PAGE, υπέστησαν χρώση με Coomassie και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Exosc10. Οι πρωτεΐνες του πυρηνόπλάσματος ήταν αρκετά αραιωμένες και δεν ήταν αρκετές για την ανάλυση.

Με τη χρώση Coomassie (Εικόνα 37) φαίνεται πως το ολικό κλάσμα των κυτταρικών εκχυλισμάτων (διαδρομές 1 και 2) και το κλάσμα του κυτταροπλάσματος (διαδρομές 3 και 4) παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα, εκτός από την περίπτωση των ζωνών που αντιστοιχούν στις ιστόνες (σημειώνονται με πλαίσιο στην παρακάτω εικόνα), οι οποίες απουσιάζουν από το κλάσμα του κυτταροπλάσματος όπως και αναμενόταν. Η απουσία των πρωτεϊνών αυτών από το κλάσμα του κυτταροπλάσματος αποτελεί επιβεβαίωση του σωστού διαχωρισμού των πυρήνων από το κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, το κλάσμα του κυτταροπλάσματος με το πυρηνικό (διαδρομές 5 και 6) και το κλάσμα των πυρηνίσκων (διαδρομές 7 και 8) διαφέρουν κατά πολύ. Στα πυρηνικά κλάσματα παρατηρείται εμπλουτισμός των ζωνών που αντιστοιχούν στις ιστόνες (H1-H3) καθώς και της πρωτεΐνης NMP1 η οποία φαίνεται να είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένη σε σχέση με το ολικό κλάσμα των κυτταρικών λυμάτων και να απουσιάζει από το κυτταροπλασματικό κλάσμα, όπως και αναμένεται.



Εικόνα 37: Ανάλυση κυτταρικών κλασμάτων με SDS-PAGE και χρώση Coomassie. Α. πηκτή 8% πολυακρυλαμιδίου Β. πηκτή περιεκτικότητας 15%. T: total (συνολικό κλάσμα κυτταρικών λυμάτων), C: cytoplasmic (κυτταροπλασματικό κλάσμα), N: nucleus (πυρηνικό κλάσμα), NP: nucleoplasm (πυρηνοπλασματικό κλάσμα), NL: nucleolar (κλάσμα πυρηνίσκων). Τα μοριακά βάρη (kDa) αναγράφονται δεξιά. Στα πλαίσια φαίνονται ζώνες που αντιστοιχούν στις ιστόνες και την NMP1.

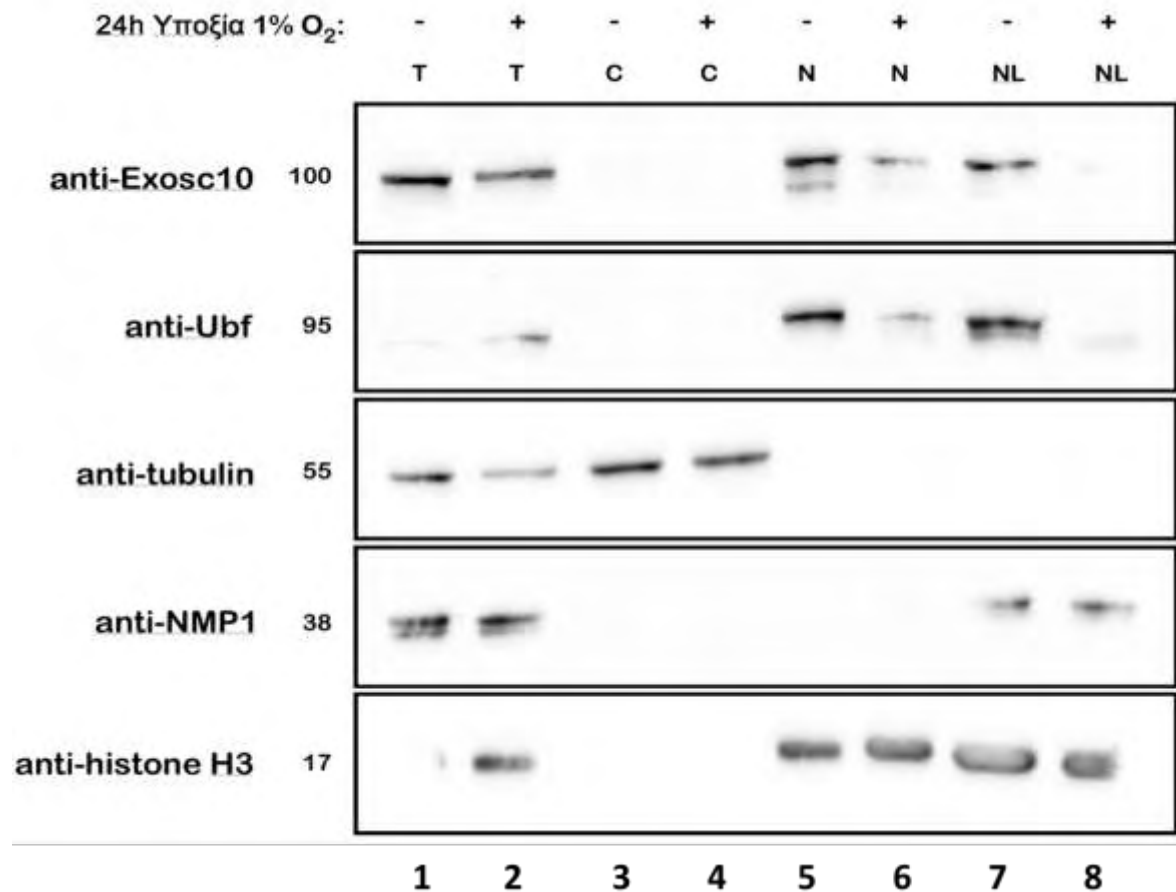
10μg από το κάθε ένα από τα 4 κλάσματα και το ολικό εκχύλισμα των κυττάρων HeLa σε νορμοξία και υποξία ηλεκτροφορήθηκαν και αναλύθηκαν επιπλέον με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 38). Ως μάρτυρας της καθαρότητας του κλάσματος του κυτταροπλάσματος χρησιμοποιήθηκε η ιστόνη H3, ως μάρτυρας καθαρότητας του πυρηνικού κλάσματος και

ισοφορτώματος χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη και σαν μάρτυρας εμπλουτισμού των πρωτεϊνών του πυρηνίσκου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες Ubf και NMP1. Η πρωτεΐνη Ubf (Upstream Binding Factor) σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται κυρίως στους πυρηνίσκους και συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των ριβοσωμικών RNA [160], ενώ η πρωτεΐνη NMP1 (Nucleophosmin) εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνίσκο και έχει συσχετιστεί με διαδικασίες όπως η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η επεξεργασία του mRNA και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [161].

Αρχικά, η κλασμάτωση φαίνεται να δούλεψε ικανοποιητικά αφού στο κυτταροπλασματικό κλάσμα (διαδρομή 3 και 4) παρατηρούμε την απουσία των πρωτεϊνών των πυρήνων: της ιστόνης H3, της NMP1 και της Ubf. Όσον αφορά στο κλάσμα των πυρηνίσκων σε νορμοξία (διαδρομή 7) και υποξία (διαδρομή 8), η ίση παρουσία της ιστόνης H3 και της NMP1 στις δύο συνθήκες δίνει την ένδειξη σωστού ισοφορτώματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως παρατηρείται μεγάλη μείωση της Exosc10 στη υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία, ενώ όμοια δραματική μείωση παρατηρείται και για την Ubf στην υποξία. Η παρατήρηση αυτή της μείωσης της Exosc10 από τους πυρηνίσκους στην υποξία επιβεβαιώνει τα παραπάνω αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ποσοτικοποίησης.

Παρόλα αυτά υπάρχουν τεχνικά προβλήματα στη συγκεκριμένη ανάλυση ώστε το παραπάνω αποτέλεσμα να μην είναι βέβαιο. Για παράδειγμα στις διαδρομές 5 και 6 του πυρηνικού κλάσματος, η πρωτεΐνη Exosc10 και η Ubf φαίνεται να είναι επίσης λιγότερες στο κλάσμα της υποξίας σε σχέση με την νορμοξία, αν και όχι τόσο έντονα όπως στα κλάσματα των πυρηνίσκων (ενώ η ιστόνη H3 φαίνεται να διατηρεί ίδια επίπεδα και στις δύο συνθήκες) χωρίς να δείχνουν μετακίνηση σε άλλο κλάσμα. Αυτό αποτελεί δείγμα ότι οι πρωτεΐνες μπορεί να υπέστησαν παραδείγματος χάριν πρωτεόλυση στο συγκεκριμένο κλάσμα κατά την επεξεργασία. Επιπλέον στα ολικά εκχυλίσματα φαίνεται πως, η πρωτεΐνη Exosc10 είναι λιγότερη στην υποξία σε σχέση με τη νορμοξία. Αντίστοιχα, λιγότερη παρατηρείται να είναι και η πρωτεΐνη τουμπουλίνη, άρα τα δείγματα πιθανά δεν ισοφορτώθηκαν σε αυτήν την περίπτωση. Η πρωτεΐνη NMP1 δεν εμφανίζει διαφορές στην νορμοξία και στην υποξία, ενώ η ιστόνη H3 και η Ubf φαίνεται να απουσιάζουν από τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα στην νορμοξία λόγω κατά πάσας πιθανότητας τεχνικού πρόβληματος κατά τη διαδικασία της ανοσοανίχνευσης. Η απουσία ανίχνευσης της NMP1 από το πυρηνικό κλάσμα ίσως οφείλεται σε τεχνικό πρόβλημα κατά την ανοσοανίχνευση ή σε αδυναμία του αντισώματος. Συνεπώς το παρόν πείραμα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστον άλλες 2 φορές χωρίς τα παραπάνω

τεχνικά προβλήματα προκειμένου να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την πιθανή μετακίνηση της Exosc10 και της Ubf από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα.

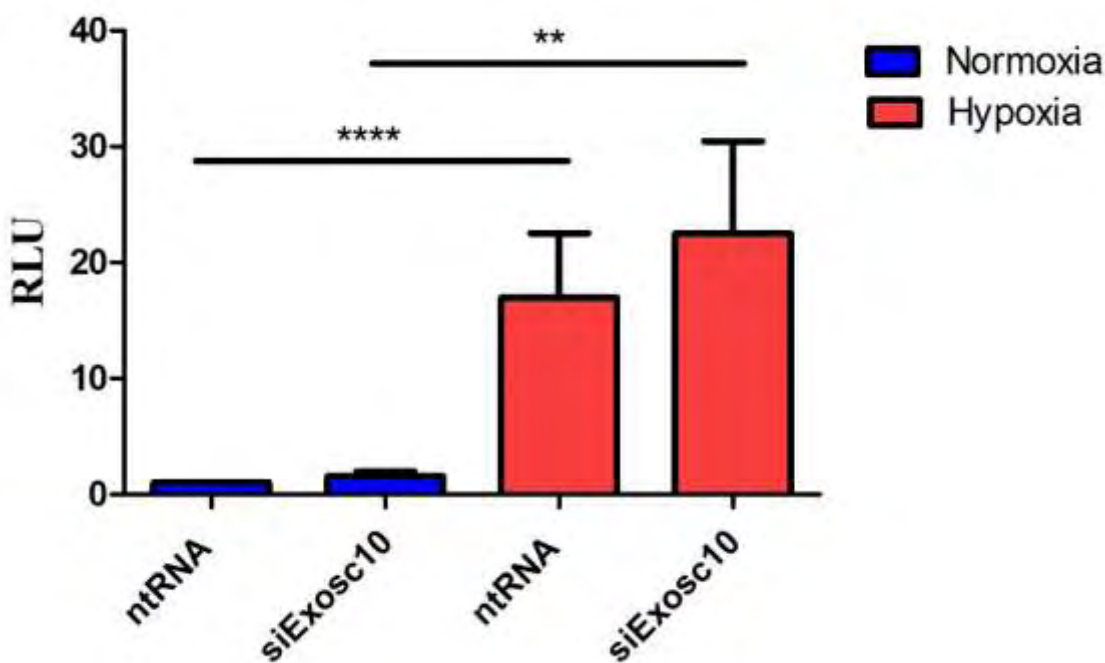


Εικόνα 38: Ανάλυση κλασμάτων μετά από την απομόνωση πυρηνίσκων σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hacot *et al* (2010) σε νορμοξία και υποξία με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σημειώνονται στα αριστερά της εικόνας. T: total (συνολικό κλάσμα κυτταρικών λυμάτων), C: cytoplasmic (κυτταροπλασματικό κλάσμα), N: nucleus (πυρηνικό κλάσμα), NL: nucleolar (κλάσμα πυρηνίσκων).

5.1.2 Μελέτη της επίδρασης της Exosc10 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας

Για την κατανόηση του ρόλου της Exosc10 στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία, ελέγχθηκε αν η αποσιώπηση της πρωτεΐνης Exosc10 επηρεάζει την μεταγραφική ικανότητα του HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν (βλ. Μέθοδοι-4.2.2.β) με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3-VEGF-5HRE, το οποίο περιέχει 5 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HRE) του γονιδίου του VEGF (γονίδιο στόχος του HIF-1) πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας και με το πλασμίδιο μάρτυρας pCI-Renilla, ως δείκτης της

απόδοσης της διαμόλυνσης. Παράλληλα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι περιοχής του mRNA της Exosc10. Σαν αρνητικό κοντρόλ έγινε διαμόλυνση με siRNA που δεν στοχεύει σε αλληλουχία (control siRNA-non targeted). Μετά το πέρας 40 ωρών, τα κύτταρα επώστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για 8 ώρες και στη συνέχεια τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση λουμινομέτρου για τη μέτρηση χημειοφωταύγειας (βλ.Μέθοδοι-4.3.6). Οι τιμές που παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνας 39 προκύπτουν από 3 ανεξάρτητα πειράματα αποτελούμενα από τριπλέτες επαναλήψεων για κάθε συνθήκη. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 ήταν σχεδόν μηδαμινή στην νορμοξία όπως και αναμένεται. Στην υποξία λόγω επαγωγής του HIF-1 παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργότητα 20 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα δείγματα κοντρόλ της νορμοξίας (σύγκριση μπάρας 3 με μπάρα 1). Μετά την αποσιώπηση της πρωτεΐνης Exosc10, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 αυξήθηκε σε σχέση με τη συνθήκη χωρίς αποσιώπηση (περίπου 25 φορές, μπάρα 4 με μπάρα 2) αλλά η μικρή αυτή αύξηση δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συνεπώς, από τα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης, φαίνεται πως η αποσιώπηση της πρωτεΐνης Exosc10 δεν επηρεάζει σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.



Εικόνα 39: Μέτρηση της εξαρτώμενης του HIF-1 δραστηριότητας λουσιφεράσης. Κύτταρα HeLa επώστηκαν 40 ώρες με: το πλασμίδιο αναφοράς pGL3-VEGF-5HRE, το πλασμίδιο μάρτυρας pCI-Renilla και siRNA έναντι της Exosc10. Σαν αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε nt (non targeted) siRNA. Ακολούθησε 8 ώρες επώαση στην υποξία (1% O₂) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης. Στον άξονα Y, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές λουσιφεράσης της πυρολαμπίδας κανονικοποιημένες ως προς τη λουσιφεράση Renilla σε μονάδες RLU (Relative Luciferase Units). Οι μπλε μπάρες αντιστοιχούν στην νορμοξία, ενώ οι κόκκινες στην υποξία. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από 3 ανεξάρτητα πειράματα και από 3 τιμές (τριπλέτες) για κάθε συνθήκη (**P < 0.01 και ****P < 0.0001).

5.2 Μελέτη της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10

Η σουμοϋλίωση της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 βρέθηκε να μειώνεται κατά την υποξία σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου [135]. Ελάχιστα είναι γνωστά για την σουμοϋλίωση της Exosc10 και το ρόλο της στη ρύθμιση της πρωτεΐνης. Προκειμένου να μελετηθεί αναλυτικά ο ρόλος της σουμοϋλίωσης για την Exosc10, θελήσαμε αρχικά να ταυτοποιήσουμε τις λυσίνες στόχους στις οποίες η Exosc10 σουμοϋλιώνεται και να βρούμε την μεταλλαγμένη μορφή της Exosc10 η οποία στερείται της ικανότητας σύζευξης με τη SUMO πρωτεΐνη. Η απόκτηση της μεταλλαγμένης αυτής μορφής της Exosc10, θα θέσει τις βάσεις για περαιτέρω πειράματα τα οποία θα έχουν ως στόχο την πλήρη διασαφήνιση του ρόλου της σουμοϋλίωσης πάνω στη λειτουργία της πρωτεΐνης Exosc10.

5.2.1 Εύρεση των θέσεων σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης Exosc10 και δημιουργία μη σουμοϋλιωμένων μορφών της

Προγράμματα βιοπληροφορικής όπως το GPS-SUMO [162] και το SUMOplot (Abgent.com) για την πρόγνωση των θέσεων σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών δίνουν ως πιο πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης τις λυσίνη K583 (GPS-SUMO score:12.776 / SUMOplot score: 0.91) και K168 (GPS-SUMO score:2.736 / SUMOplot score: 0.79) (Εικόνες 40 και 41) . Δεδομένα στην βιβλιογραφία αναλύσεων πρωτεομικής για την ανίχνευση πιθανών λυσινών που σουμοϋλιώνονται [50] δείχνουν πως η λυσίνη K583 είναι μια πιθανή θέση αφού εμφανίζεται σε 4 από τις 5 συμπεριλαμβανόμενες μελέτες που αναφέρουν την Exosc10. Η συγκεκριμένη λυσίνη βρίσκεται εντός τυπικού μοτίβου σουμοϋλίωσης (ΨKxE). Η λυσίνη K168 παρόλο που δεν βρίσκεται εντός τυπικού μοτίβου σουμοϋλίωσης (xKxE) επίσης εμφανίζεται σαν πιθανή θέση σουμοϋλίωσης της Exosc10 σε 2 από τις 5 μελέτες. Η K201 παρόλο που δεν εμφανίζει σημαντικό σκορ στα προγράμματα πρόγνωσης θέσης (GPS-SUMO score:0.635 / SUMOplot score: 0.26) και είναι εκτός τυπικού μοτίβου σουμοϋλίωσης εμφανίζεται ως μια τρίτη και πιθανή θέση σουμοϋλίωσης σε 1/5 μελέτες και μαζί με τις δύο παραπάνω λυσίνες K583, K168 εμφανίζονται σε μία σχετική μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10 ως απόκριση στο κρύο [163]. Και οι τρεις λυσίνες σύμφωνα με τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης είναι σε μη διαμορφωμένες περιοχές στην επιφάνεια του μορίου και θα μπορούσαν θεωρητικά να αποτελούν θέσεις σουμοϋλίωσης.

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	P-value	Type
Unnamed	583	AREMFLLESEVAAGV	12.776	3.24	0.008	Sumoylation Concensus
Unnamed	168	AEYGGKAKSETFRLL	2.736	0	0.038	Sumoylation Concensus
Unnamed	178	TFRLLEKAFNIIRPQL	2.173	0	0.617	Sumoylation Nonconcensus
Unnamed	186	NIIRPQLKRFREIDN	1.197	0	0.802	Sumoylation Nonconcensus
Unnamed	190	PQLKRFREIDNSNTP	1.189	0	0.48	Sumoylation Nonconcensus
Unnamed	201	SNTPFLPKIFIKPNA	0.635	0	0.948	Sumoylation Nonconcensus

Εικόνα 40: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την πρόγνωση των θέσεων σουμοϋλίωσης της *Exosc10* με τη χρήση του εργαλείου GPS-SUMO. Σε κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι επιλεγμένες λυσίνες K583, K168, K201 με την K583 να διαθέτει το υψηλότερο σκορ και να ανήκει σε τυπικό μοτίβο σουμοϋλίωσης.

1	MAPPSTREPR	VLSATSATKS	DGEMVLPGFP	DADSFVKFAL	GSVVAVTKAS	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; align-items: center;"> Motifs with high probability</div> <div style="display: flex; align-items: center;"> Motifs with low probability</div> <div style="display: flex; align-items: center;"> Overlapping Motifs</div> </div>
51	GGLPQFGDEY	DFYRSFPGFQ	AF CETQGDRL	LQCM SRVMQY	HGCRSNIKDR	
101	SKVTELEDKF	DLLVDANDVI	LERV GILLDE	ASGVNKNQQP	VLPAGLQVPK	
151	TVVSSWNRKA	AEYGGKAKSE	TFRL LHAKNI	IRPQLKFREK	IDNSNTPFLP	
201	KIFIKPNAQK	PLPQALSKER	RERPODRPED	LDVPPALADF	IHQRTQQVE	
251	QDMFAHPYQY	ELNHFTPAD A	VLQKPQQLY	RPIEETPCHF	ISSLDELVEL	
301	NEKLLNCQEF	AVDLEHHSYR	SFLGLTCLMQ	ISTRTEDFII	DTLELRSDMY	
351	ILNESLTDPA	IVKVFHGADS	DIEWLQKDFG	LYVVMFDTH	QAARLLNLGR	
401	HSLDHLLKLY	CNVDSNKQYQ	LADWRIRPLP	EEMLSYARDD	THYLLYIYDK	
451	MRLEMWERGN	GQPVQLQVWV	QRSRDICLKK	FIKPIFTDES	YLELYRKQKK	
501	HLNTQQLTAF	QLLFAWRDKT	ARREDESYGY	VLPNHMMLKI	AEELPKEPQG	
551	IIACCPNPPP	LVRQQINEMH	LLIQQAREMP	LLKSEVAAGV	KKSGPLPSAE	
601	RLENVLFPGH	DCSHAPPDGY	PIIPTSGSVP	VQKQASLFPD	EKEDNLLGTT	
651	CLIA TAVITL	FNEPSAEDSK	KGPLTVAQKK	AQNIMESFEN	PF RMFLPSLG	
701	HRAPVSAAK	FDPSTKIYEI	SNRWKLAQVQ	VQKDSKEAVK	KKAAEQTAAR	
751	EQAKEACKAA	AEQAISVRQQ	VVLENAAKKR	ERATSDPRTT	EQKQEKRLK	
801	ISKPKDPEP	PEKEFTPYDY	SQSDFKAFAG	NSKSKVSSQF	DPNKQTPSGK	
851	KCIAAKKIKQ	SVGNKMSFFP	TGKSDRGFRY	NWPQR		

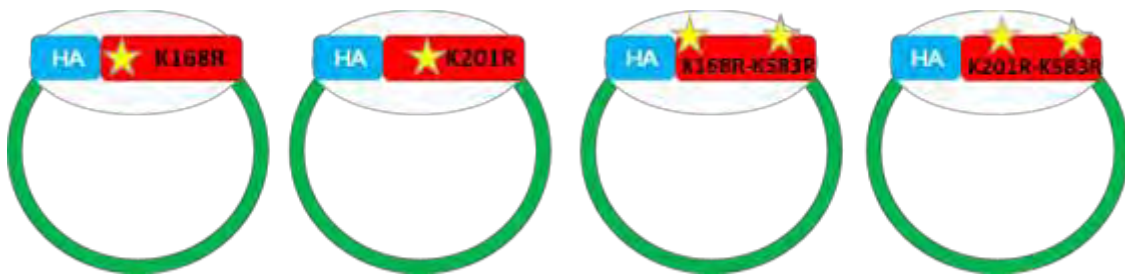
No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K583	REMP L LKSE VAAGV	0.91	11	K546	IAEEL PKEP QGIIA	0.5
2	K710	PVSQA AKFD PSTKI	0.79	12	K190	QLKFR EKID NSNTP	0.5
3	K168	EYGGK AKSE TFRL	0.79	13	K109	VTELE DKFD LLVDA	0.5
4	K873	MSFPT GKSD RGFY	0.67	14	K779	LENAA KKRE RATSD	0.48
5	K363	TDPAI VKVF HGADS	0.58	15	K671	SAEDS KKGP LTVAQ	0.37
6	K479	SRDIC LKKF IKPIF	0.56	16	K592	VAAGV KKSG PLPSA	0.31
7	K826	YSQSD FKAF AGNSK	0.5	17	K201	NTPFL PKIF IKPNA	0.26
8	K806	KISKK PKDP EPPEK	0.5	18	K813	DPEPP EKEF TPYDY	0.15
9	K793	PRTTE QKQE KKRLK	0.5	19	K377	DIEWL QKDF GLYVV	0.15
10	K642	SLFPD EKED NLLGT	0.5				

Εικόνα 41: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την πρόγνωση των θέσεων σουμοϋλίωσης της *Exosc10* με τη χρήση του εργαλείου SUMOPlot. Σε κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι επιλεγμένες λυσίνες K583, K168, K201 με την K583 να διαθέτει το υψηλότερο σκορ και την K168 να ακολουθεί με επίσης υψηλό σκορ.

Αποφασίσαμε να μεταλλάξουμε για τους παραπάνω λόγους τις λυσίνες K583, K168, K201 σε αργινίνη (aaa→aga), ένα αμινοξύ το οποίο δεν σουμοϋλιώνεται αλλά μοιάζει στο φορτίο με τη

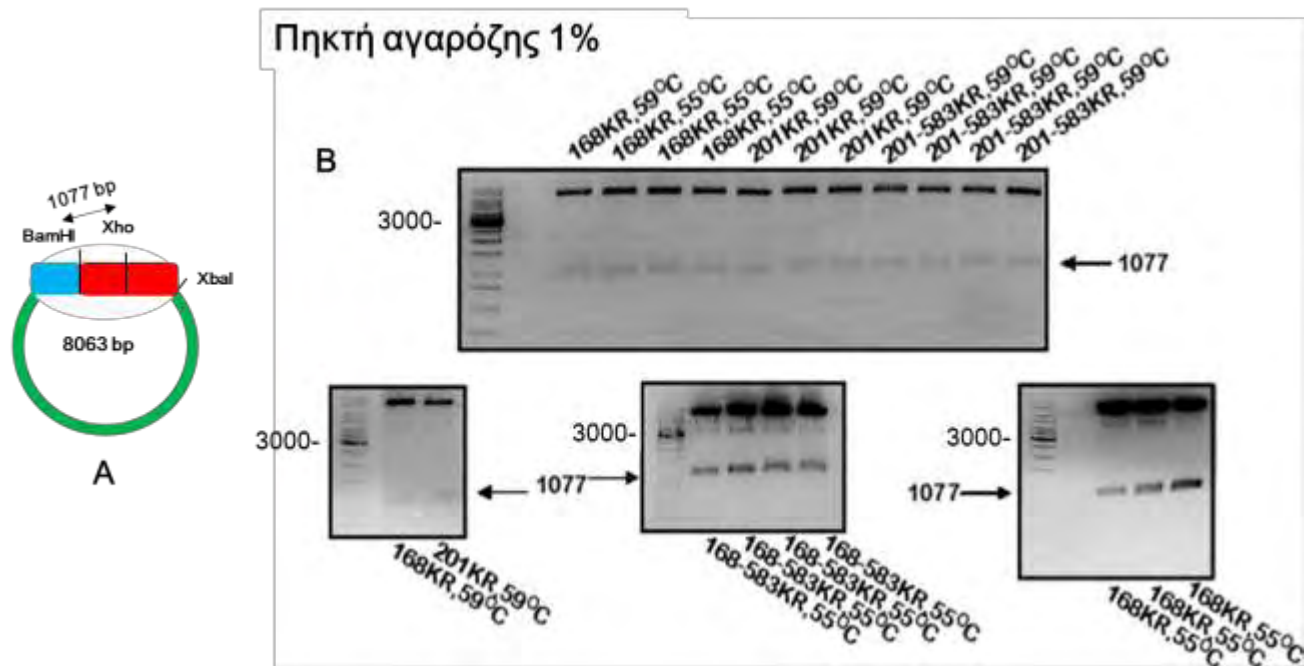
λυσίνη. Επιπλέον προχωρήσαμε στη δημιουργία διπλών μεταλλάξεων προκειμένου να εξετάσουμε το ενδεχόμενο σουμοϋλίωσης πάνω από μίας λυσίνης.

Οι μετατροπές αυτές έγιναν με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (βλ. Μέθοδοι-3.1.1.α) με εκμαγείο για την δημιουργία των μονών μεταλλάξεων το πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 HA-Exosc10 και των διπλών μεταλλάξεων το πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 HA-Exosc10 K583R (**K583R**) (Αρχική κλωνοποίηση από την κ. Χαχάμη Γ., δημοσίευτα αποτελέσματα). Τα πλασμίδια που προέκυψαν μετά την τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου είναι τα εξής: αυτά που φέρουν τις μονές μεταλλάξεις pcDNA3.1 HA-Exosc10 K168R (**K168R**), pcDNA3.1 HA-Exosc10 K201R (**K201R**) και αυτά που φέρουν τις διπλές μεταλλάξεις pcDNA3.1 HA-Exosc10 K168R-K583R (**K168R-K583R**) και pcDNA3.1 HA-Exosc10 K201R-K583R (**K201R-K583R**) και απεικονίζονται στην Εικόνα 42.



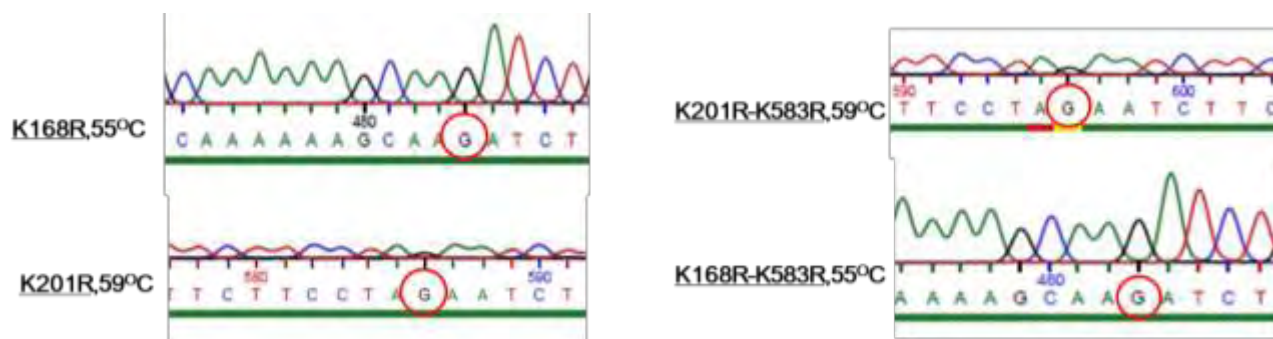
Εικόνα 42: Απεικόνιση των πλασμιδιακών φορέων pcDNA3.1-HA-Exosc10 που δημιουργήθηκαν με την τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου και των μεταλλάξεων που φέρουν.

Οι πλασμιδιακοί φορείς *K168R*, *K201R*, *K168R-K583R* και *K201R-K583R* οι οποίοι έφεραν κλωνοποιημένο το cDNA της Exosc10 απομονώθηκαν από τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, επώαστηκαν με τα ένζυμα BamHI και XhoI (οι θέσεις πέψης φαίνονται στην Εικόνα 43) για την επιβεβαίωση του ενθέματος και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1%. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται επίσης στην Εικόνα 43. Η παρουσία ζώνης στα 1077 bp επιβεβαιώνει την ύπαρξη του επιθυμητού ενθέματος (Exosc10) σε όλα τα δείγματα τα οποία επιλέχθηκαν, ενώ η ύπαρξη έντονων ζωνών στο επάνω μέρος της πηκτής (5400bp) αντιστοιχούν στον υπόλοιπο πλασμιδιακό φορέα (κομμένο ή άκοπο).



Εικόνα 43: (Α) Σχεδιάγραμμα του πλασμιδιακού φορέα pCDNA που φέρει το cDNA της Exosc10 (κόκκινο) και τον επίτοπο HA (μπλε) στο οποίο σημειώνονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και Xho. (Β) Ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και Xho των πλασμιδιακών φορέων K168R, K201R, K168R-K583R, K201R-K583R που απομονώθηκαν από βακτηριακά κύτταρα E.coli, σε πηκτώματα αραρόζης 1%. Με βέλη υποδεικνύεται η ζώνη των 1077bp η οποία επιβεβαιώνει την ύπαρξη του ενθέματος του cDNA της Exosc10. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο 1kb Generuler (Fermentas).

Επιλέχθηκαν οι 2 θετικές αποικίες για κάθε κατασκευή και τα αντίστοιχα πλασμίδια ελέγχθηκαν με αλληλούχιση χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην PCR μεταλλαξιγένεσης (βλ.3.2 Εκκινητές). Στην Εικόνα 44, παρουσιάζονται τα θετικά χρωματογραφήματα με την επιθυμητή αλλαγή της βάσης A σε G (μετατροπή λυσίνης σε αργινίνη) για όλα τα προς μελέτη πλασμίδια.

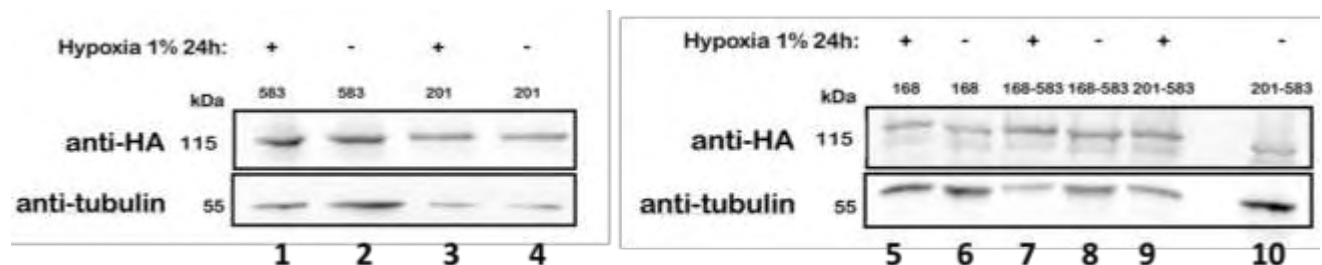


Εικόνα 44: Χρωματογραφήματα που εστιάζονται στις περιοχές cDNA της Exosc10 των πλασμιδίων pcDNA3.1-HA-Exosc10 που προέκυψαν μετά από στοχευμένη μεταλλαξιγένεση λυσινών K168 και K201 της Exosc10. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι επιθυμητές μεταλλάξεις από A σε G για την μετατροπή της τριπλέτας από την οποία προκύπτει η λυσίνη AAA σε τριπλέτα από την οποία προκύπτει αργινίνη AGA.

Στα δείγματα τα οποία έφεραν τις σωστές μεταλλάξεις, επαναλήφθηκε η αλληλούχιση με άλλους εκκινητές για να ελεγχθεί η αρτιότητα όλης της αλληλουχίας της Exosc10 και να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της εισαγωγής ανεπιθύμητων μεταλλάξεων εξαιτίας της διαδικασίας της PCR.

5.2.3 Μελέτη της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 σε κύτταρα HeLa με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Επόμενο βήμα, μετά την κατασκευή των πλασμιδίων *K168R*, *K201R*, *K583R*, *K168R-K583R*, *K201R-K583R*, ήταν ο έλεγχος των αντίστοιχων εκφρασμένων πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι μεταλλαγμένοι πλασμιδιακοί φορείς εισήχθησαν σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να ελεγχθεί αν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εκφράζονται επιτυχώς και συμπεριφέρονται ομοίως με την ενδογενή πρωτεΐνη Exosc10 τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου PEI με τα πλασμίδια *K168R*, *K201R*, *K583R*, *K168R-K583R*, *K201R-K583R* (βλ. Μέθοδοι-4.2.2.α) και επώαστηκαν σε νορμοξία ή υποξία αντίστοιχα για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του επιτόπου HA για τον έλεγχο της έκφρασης των χμαιρικών HA-Exosc10 KR μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Για τον έλεγχο του ισοφορτώματος χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της τουμπουλίνης. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 45, όλες οι πρωτεΐνες που φέρουν τις μεταλλάξεις K→R, τόσο τις μονές όσο και τις διπλές, εκφράζονται επιτυχώς στα καρκινικά κύτταρα HeLa, στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (115kDa) ενώ δεν παρουσιάζουν δραματικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ νορμοξίας και υποξίας.

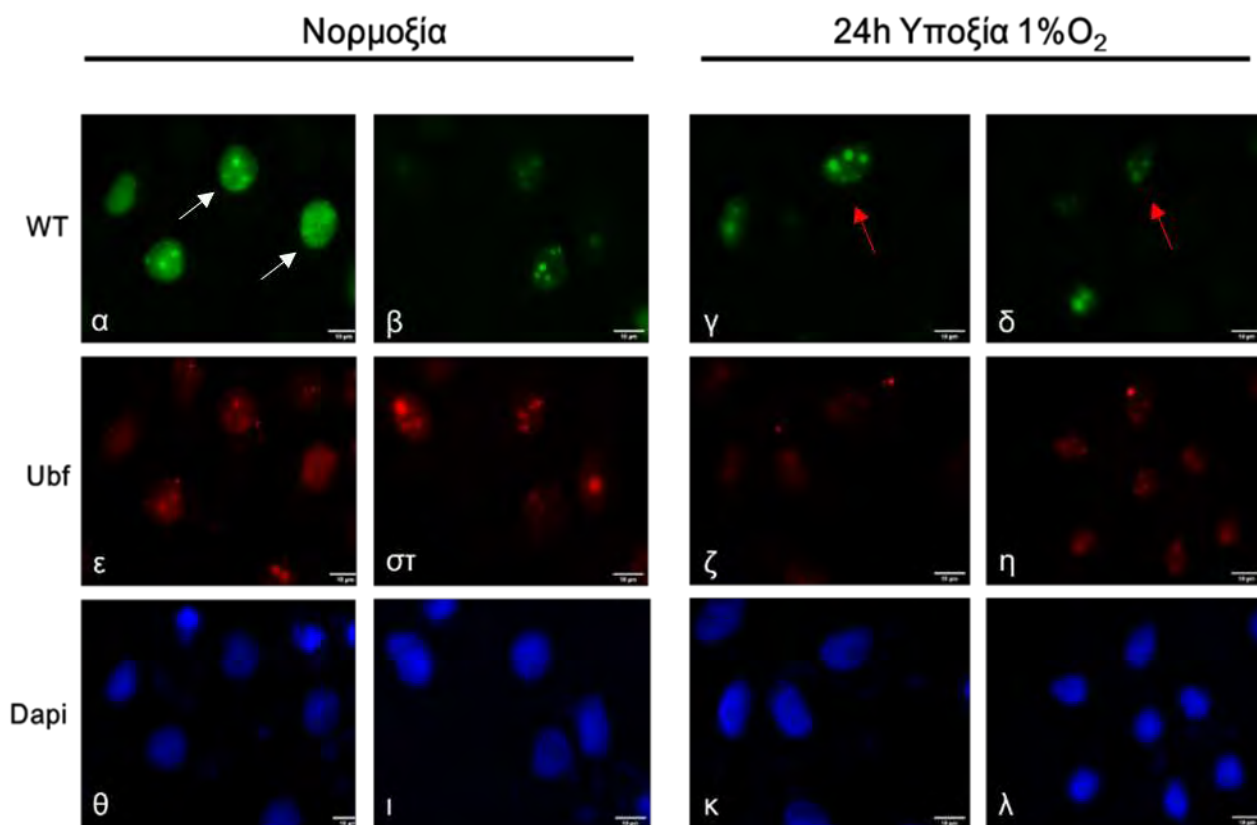


Εικόνα 45: Έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 K583R, HA-Exosc10 K201R, HA-Exosc10 K168R, HA-Exosc10 K168R-K583R, HA-Exosc10 K201R-K583R σε νορμοξία και υποξία με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια: K583R (διαδρομές 1 και 2), K201R (διαδρομές 3 και 4), K168R (διαδρομές 5 και 6), K168R-K583R (διαδρομές 7 και 8), K201R-K583R (διαδρομές 9 και 10) και επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία αντίστοιχα για 24 ώρες. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επιτόπου HA και της τουμπουλίνης για τον έλεγχο ισοφορτώματος. Με (+) συμβολίζονται τα δείγματα σε υποξία ενώ με (-) σε νορμοξία. Αριστερά συμβολίζονται τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σε kDa.

5.2.3 Μελέτη της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 σε κύτταρα HeLa με ανοσοφθορισμό

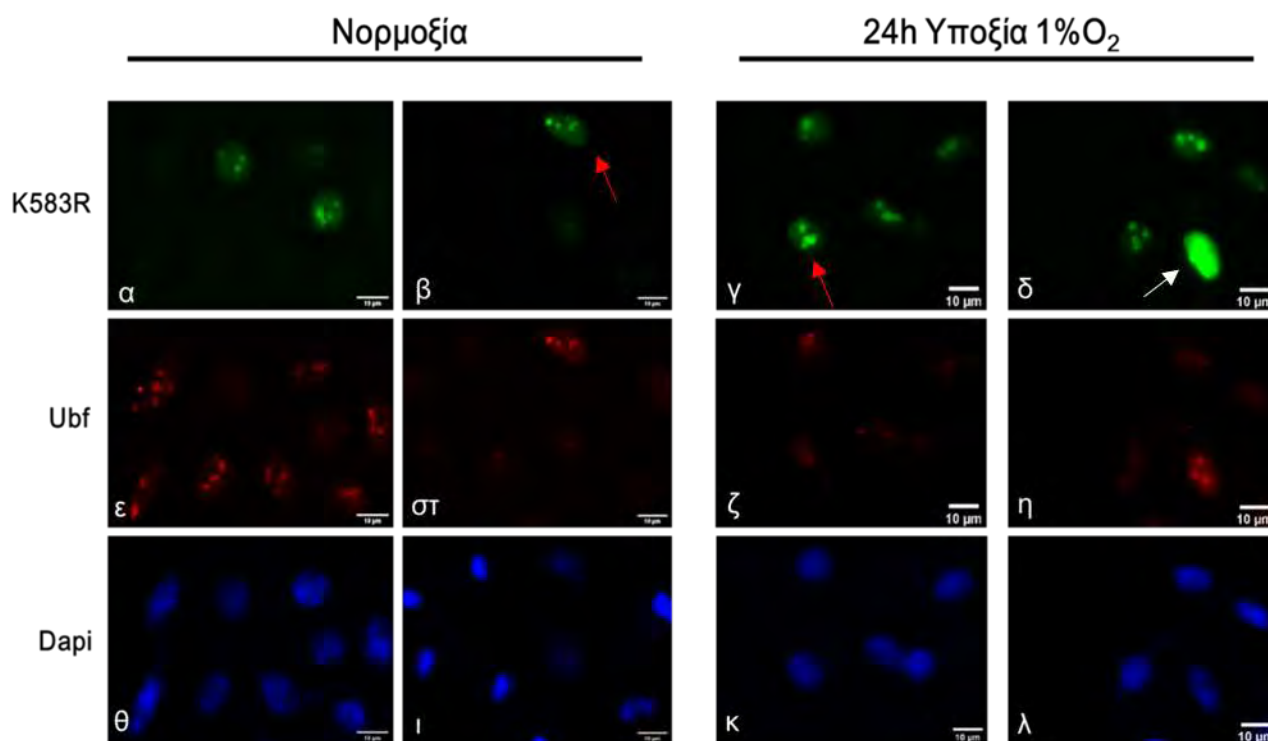
Για την επιβεβαίωση της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 και για την ανίχνευση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 K583R, HA-Exosc10 K168R, HA-Exosc10 K201R, HA-Exosc10 K168R-K583R, HA-Exosc10 K201R-K583R και της υπερεκφρασμένης αγρίου τύπου HA-Exosc10 (WT) πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού (βλ. Μέθοδοι-4.3.5). Κύτταρα HeLa τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου PEI με τα πλασμίδια που φέρουν τις μονές και διπλές μεταλλάξεις της Exosc10, όσο και με τον πλασμιδιακό φορέα ο οποίος έφερε το cDNA της Exosc10 αγρίου τύπου (WT) επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία και υποξία αντίστοιχα. Για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκαν: ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA για την ανίχνευση των υπερεκφρασμένων HA-Exosc10 πρωτεϊνών και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Ubf, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ένδειξης των πυρηνίσκων. Τα αποτελέσματα της μελέτης του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των διάφορων HA-Exosc10 μορφών παρουσιάζονται και αναλύονται στις παρακάτω παραγράφους.

Αρχικά, όσον αφορά την υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου HA-Exosc10 (WT) πρωτεΐνη παρατηρούμε πως ένα μεγάλο ποσοστό της συγκεντρώνεται στους πυρηνίσκους, ενώ το υπόλοιπο βρίσκεται διάχυτο στο πυρηνόπλασμα, εικόνα δηλαδή παρόμοια με αυτή που παρουσιάζει η ενδογενής πρωτεΐνη (Εικόνα 46). Στη νορμοξία και υποξία, εντοπίστηκαν κύτταρα με πολύ υψηλά ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (Εικόνα 46α) με αποτέλεσμα η ένταση του σήματος να είναι έντονη σε όλον τον πυρήνα (άσπρα βέλη), ενώ υπήρξαν και κύτταρα με χαμηλή και μεσαία ένταση (Εικόνα 46β, κόκκινα βέλη) στα οποία η πρωτεΐνη ήταν εστιασμένη κυρίως στους πυρηνίσκους. Παρόλα αυτά γενικά ο εντοπισμός του σήματος της πρωτεΐνης δεν φαίνεται να αλλάζει στην υποξία (εικόνες 46γ,46δ). Η πρωτεΐνη Ubf φαίνεται να εστιάζεται στους πυρηνίσκους όπως αναμένεται και αποτέλεσε αρχικά το κοντρόλ για τον εντοπισμό των πυρηνίσκων.



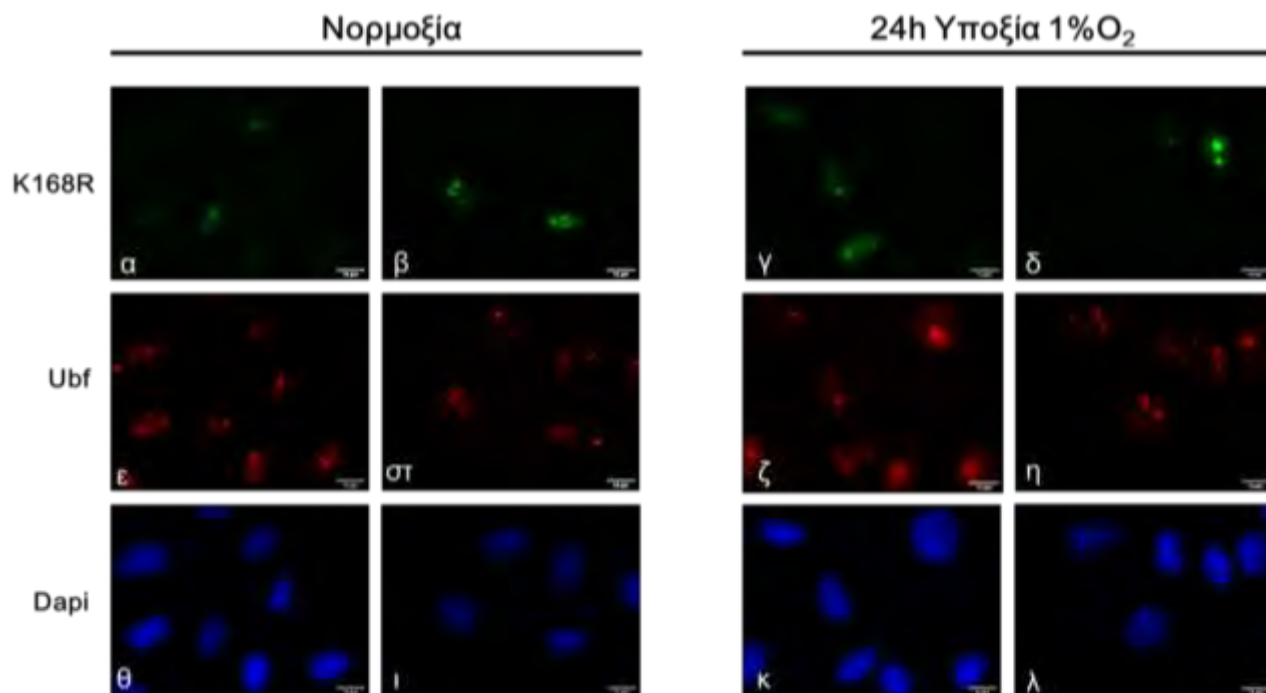
Εικόνα 46: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της υπερεκφρασμένης WT HA-Exosc10 πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA- Exosc10 WT και προεπωάστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (εικόνες 46α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (εικόνες 46ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί με DAPI (μπλε)(εικόνες 46θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Στον ανοσοφθορισμό με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HA-Exosc10 K583R, παρατηρούμε ότι διαθέτει όμοιο ενδοκυτταρικό εντοπισμό με την υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου πρωτεΐνη τόσο σε νορμοξία (Εικόνες 47α,47β) όσο και στην υποξία (Εικόνες 47γ,47δ). Ομοίως, υπήρχαν κύτταρα με μεγαλύτερη έκφραση όπου η ένταση του σήματος είναι έντονη σε όλον τον πυρήνα (άσπρα βέλη), και με μικρότερη όπου η πρωτεΐνη είναι εστιασμένη κυρίως στους πυρηνίσκους (κόκκινα βέλη).



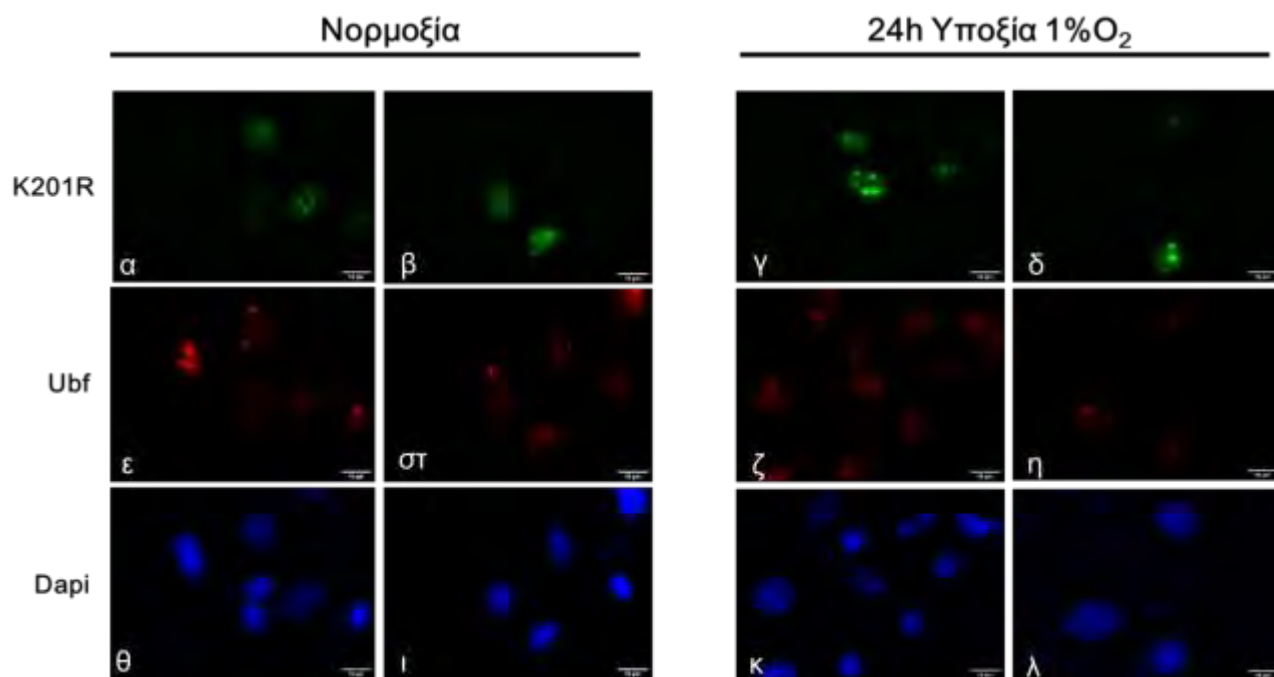
Εικόνα 47: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης HA-Exosc10 K583R πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA- Exosc10 K583R και προεπεωάστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (Εικόνες 47α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (Εικόνες 47ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί με DAPI (μπλε)(Εικόνες 47θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Η ανασυνδυασμένη HA-Exosc10 K168R πρωτεΐνη παρουσίασε σε ανοσοφθορισμό ίσως τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης σε σχέση με τις άλλες δύο μορφές που έφεραν τις μονές μεταλλάξεις, ενώ φαίνεται και αυτό να διαθέτει τον αναμενόμενο ενδοκυτταρικό εντοπισμό κατά βάση στους πυρηνίσκους τόσο στην νορμοξία (Εικόνες 48α,48β) όσο και στην υποξία (Εικόνες 48γ,48δ). Επίσης, δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές σε νορμοξία και υποξία.



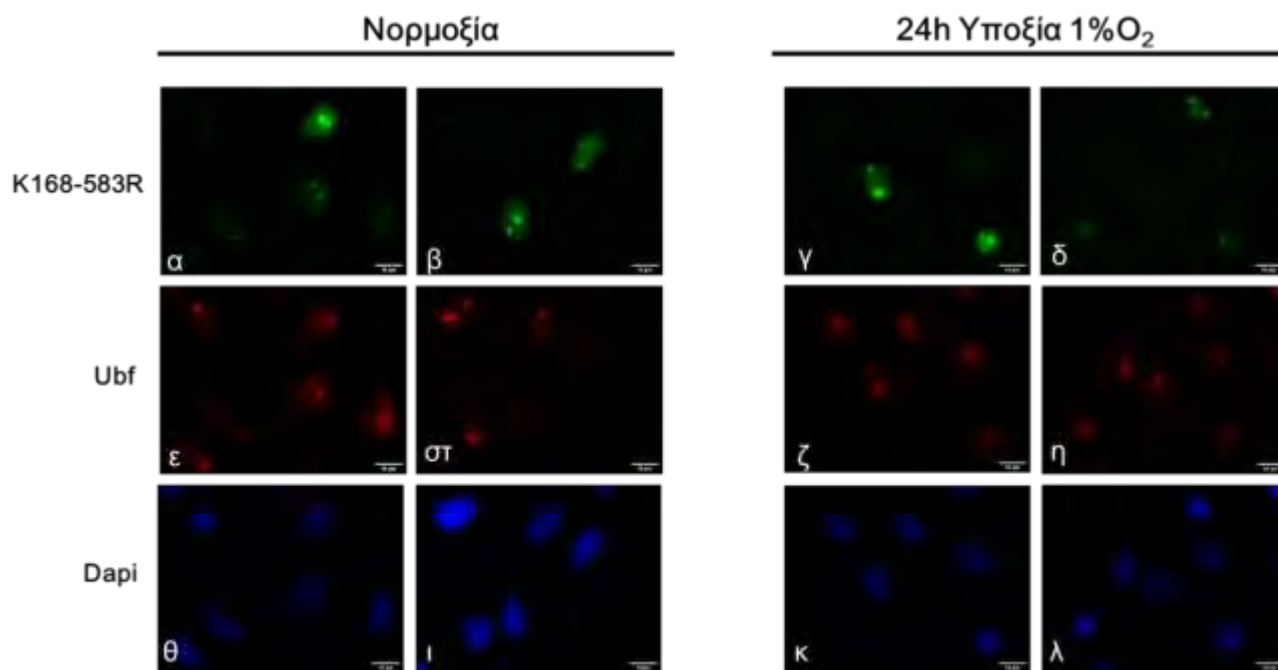
Εικόνα 48: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης HA-Exosc10 K168R πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA- Exosc10 K168R και προεπεωάστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (Εικόνες 48α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (Εικόνες 48ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί με DAPI (μπλε)(Εικόνες 48θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Η τρίτη μορφή της Exosc10 η οποία φέρει τη μονή μετάλλαξη αντιστοιχεί στην ανασυνδυασμένη HA-Exosc10 K201R πρωτεΐνη. Και σε αυτή την μορφή, παρατηρούμε επίσης τον αναμενόμενο ενδοκυτταρικό εντοπισμό εντός του πυρήνα, με την πρωτεΐνη να εστιάζεται κυρίως στους πυρηνίσκους αλλά και στο πυρηνόπλασμα, ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στη νορμοξία (Εικόνες 49α,49β) και στην υποξία (Εικόνες 49γ, 49δ).



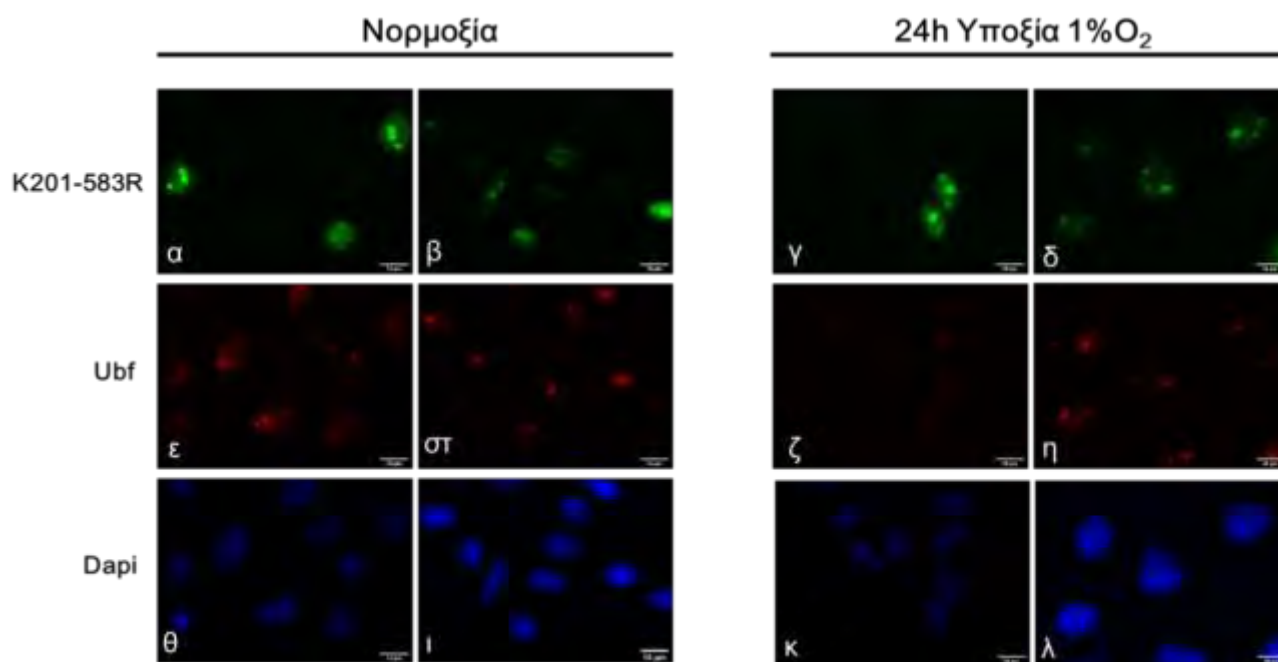
Εικόνα 49: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης HA-Exosc10 K201R πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA- Exosc10 K201R και προεπεώστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (Εικόνες 49α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (Εικόνες 49ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί με DAPI (μπλε)(Εικόνες 49θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Προχωρώντας στις μορφές της Exosc10 που έφεραν τις διπλές μεταλλάξεις, με πρώτη την K168R-K583R, παρατηρούμε ότι εκφράζεται επιτυχώς σε παρόμοια επίπεδα και αυτή διατηρώντας τον αναμενόμενο εντοπισμό σε πυρηνικό και σε μικρότερη ποσότητα διάχυτη στο πυρηνόπλασμα τόσο σε νορμοξία (Εικόνες 50α,50β) όσο και στην υποξία (Εικόνες 50γ,50δ).



Εικόνα 50: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης HA-Exosc10 K168R-K583R πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA-Exosc10 K168R-K583R και προεπεωάστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (Εικόνες 50α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (Εικόνες 50ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε)(Εικόνες 50θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Τέλος, παρατηρώντας τις εικόνες του ανοσοφθορισμού της μορφής της Exosc10 που φέρνει την διπλή μετάλλαξη K201R-K583R, επιβεβαιώνουμε ότι και αυτή η μορφή όπως και όλες οι προηγούμενες εκφράζεται επιτυχώς στα ευκαρυωτικά κύτταρα τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα, η χμιαϊκή πρωτεΐνη HA-Exosc10 K201R-K583R φαίνεται να έχει τον αναμενόμενο ενδοκυτταρικό εντοπισμό χωρίς κάποια διαφορά στην έκφραση του ανάμεσα στην νορμοξία (Εικόνες 51α,51β) και στην υποξία (Εικόνες 51γ,51δ).



Εικόνα 51: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ανασυνδυασμένης HA-Exosc10 K201R-K583R πρωτεΐνης σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό. Καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pCDNA-Exosc10 K201R-K583R και προεπωάστηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Exosc10 (Εικόνες 51α,β,γ,δ) και με κόκκινο της πρωτεΐνης Ubf (Εικόνες 51ε,στ,ζ,η), ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε)(Εικόνες 51θ,ι,κ,λ). Τα δύο πάνελ σε νορμοξία και υποξία αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα: 10μm

Γενικότερα, δεν παρατηρείται κάποια έντονη αλλαγή στον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία όπως παρατηρήθηκε στην ενδογενή πρωτεΐνη Exosc10. Παρόλα αυτά υπάρχει αρκετή ανομοιογένεια στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των κυττάρων και διαφορετική απόδοση της διαμόλυνσής τους ανά πείραμα που δυσκολεύει την ποσοτικοποίηση τους για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Στα κύτταρα τα οποία έχουν πάρα πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 παρατηρείται έντονο σήμα σε ολόκληρο τον πυρήνα, ενώ όσο μειώνεται η ένταση του σήματος ο κύριος εντοπισμός όλων των μορφών αυτών είναι στους πυρηνίσκους. Γι' αυτούς τους λόγους δεν μπορούμε να πούμε με ακρίβεια, όπως στο παράδειγμα της ενδογενούς πρωτεΐνης, από πειράματα ανοσοφθορισμού ότι παρατηρούμε μετακίνηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα κατά την υποξία. Το σίγουρο είναι ότι καμία από τις μορφές της Exosc10 που φέρει τις μεταλλάξεις στις λυσίνες K168, K201, K583 δεν αποκλείεται από τους πυρηνίσκους, άρα η σουμυλίωση τουλάχιστον σε αυτές τις λυσίνες που ελέγξαμε δεν φαίνεται να απαιτείται για τον εντοπισμό και την κατακράτηση της πρωτεΐνης στον πυρηνίσκο.

Η πρωτεΐνη UBF παρόλο που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αρχικά χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού σαν κοντρόλ της θέσης των πυρηνίσκων φαίνεται να παρουσιάζει κάποιες αλλαγές στον εντοπισμό και στην ένταση του σήματος σε κάποιες περιπτώσεις. Για παράδειγμα στις περιπτώσεις της υπερεκφρασμένης HA-Exosc10 αγρίου τύπου (Εικόνες 46ε,στ,ζ,η), της μορφής K583R (Εικόνες 47ε,στ,ζ,η) και K201R(Εικόνες 49ε,στ,ζ,η) και των μορφών που φέρουν τις διπλές μεταλλάξεις (Εικόνες 50ε,στ,ζ,η και 51ε,στ,ζ,η) φαίνεται μια μικρή μείωση στο σήμα στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία, κάτι που εμφανίζεται και στα αποτελέσματα κλασμάτωσης (Εικόνα 38). Βέβαια, η διαφορά αυτή στην ένταση του σήματος στον ανοσοφθορισμό μπορεί να προέρχεται και από τεχνικά θέματα για παράδειγμα κατά την επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα. Η επανάληψη των παραπάνω πειραμάτων με κύριο αυτό της κλασμάτωσης για κάθε μία από της μεταλλαγμένες μορφές της Exosc10 είναι απαραίτητη καθώς θα διαλευκάνει τον ρόλο της σουμοϋλίωσης της Exosc10 στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

5.2.4 Ανοσοκατακρήμνιση των χμαιοικόν HA-Exosc10 πρωτεϊνών για τον έλεγχο της σουμοϋλίωσης σε νορμοξία και υποξία

Προηγούμενα πειράματα [135] έδειξαν πως η πρωτεΐνη Exosc10 σουμοϋλιώνεται από την SUMO-1 και η σουμοϋλίωσή αυτή μειώνεται κατά την υποξία. Επιπλέον δείχθηκε ([135] και Εικόνα 29) ότι στην υποξία δεν αλλάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της. Για την περαιτέρω μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10 κατά την υποξία προχωρήσαμε σε διερεύνηση της ικανότητας σουμοϋλίωσης των χμαιοικόν HA-Exosc10 πρωτεϊνών που φέρουν τις μεταλλάξεις K→R στις πιθανές λυσίνες στόχους για την SUMO. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (IP). Η διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της σουμοϋλιωμένης μορφής καθώς η σουμοϋλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Exosc10 ανέρχεται περίπου στο 5% της συνολικής πρωτεΐνης.

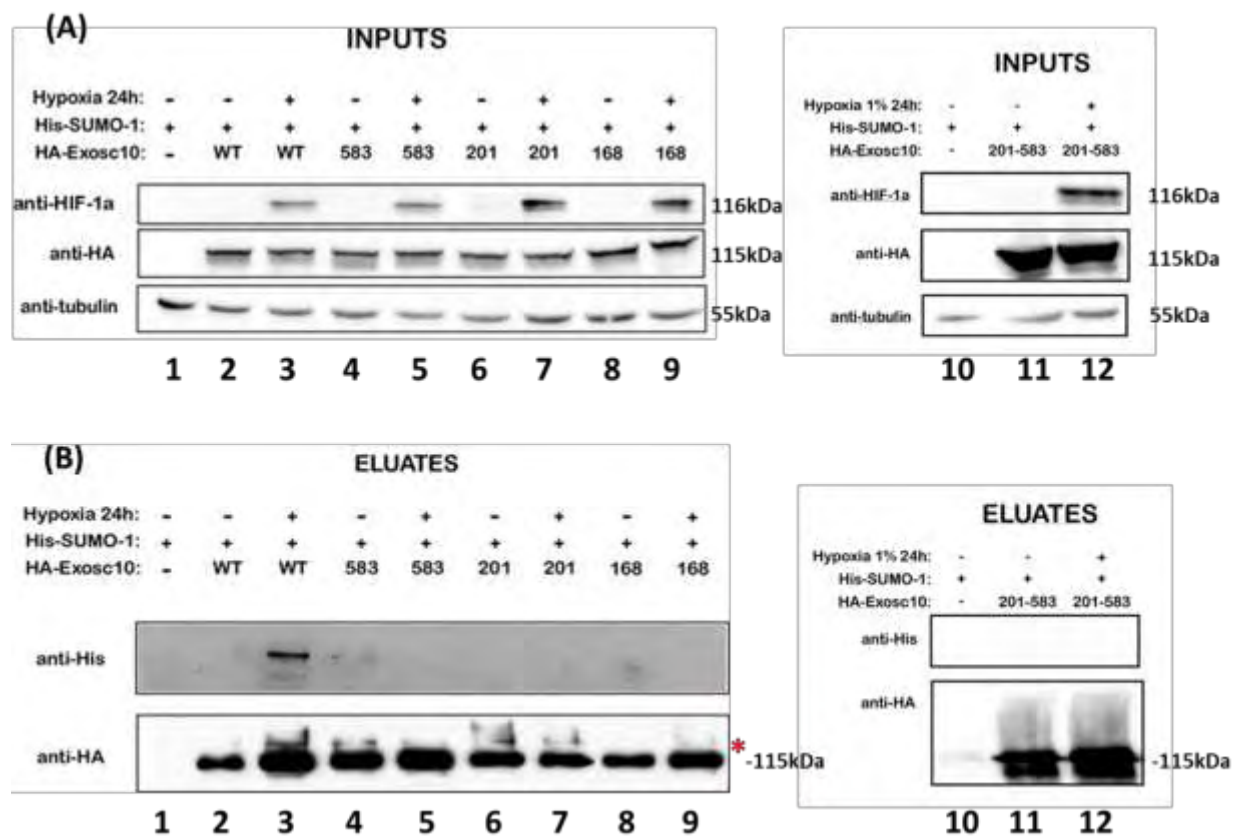
Αρχικά, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης HA επιτόπου (HA-IP) σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa σε νορμοξία και υποξία. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που φέρουν τις μονές μεταλλάξεις *K583R*, *K201R*, *K168R* και τις διπλές μεταλλάξεις *K168R-K583R*, *K201R-K583R*, της πρωτεΐνης αγρίου τύπου HA-Exosc10 (WT) καθώς και το πλασμίδιο pcDNA3.1 His-SUMO-1 για την υπερέκφραση εξωγενούς πρωτεΐνης SUMO-1 ώστε η ποσότητα της να μην αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στη σουμοϋλίωση πρωτεϊνών. Ως δείγμα κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-HA. Τα κύτταρα επώαστηκαν στην νορμοξία ή υποξία για 24 ώρες αντίστοιχα και στη συνέχεια στα κυτταρικά λύματα πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση των επιθυμητών HA

πρωτεϊνών. Η ανοσοκατακρήμιση αυτή έγινε με τη χρήση σφαιριδίων τα οποία φέρουν συζευγμένο ειδικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA. Τα εκλούσματα (eluates) και τα δείγματα των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων πριν τη διεξαγωγή της ανοσοκατακρήμισης (inputs) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του επιτόπου HA, του HIF-1α για την επιβεβαίωση της υποξίας και της τουμπουλίνης για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 52.

Στην εικόνα 52, βλέπουμε την έκφραση των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 WT (σχήμα A, διαδρομές 2 και 3) και των διάφορων HA-Exosc10 K→R (σχήμα A, διαδρομές 4-9 και 11-12) στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πριν την διεξαγωγή της ανοσοκατακρήμισης. Παρατηρούμε την ύπαρξη ζώνης για την μη τροποποιημένη ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (115kDa) και όπως επιβεβαιώνεται και με τα παραπάνω πειράματα δεν υπάρχουν μεταβολές στην έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών ανάμεσα σε νορμοξία και υποξία. Στα δείγματα κοντρόλ (σχήμα A, διαδρομές 1 και 10) δεν είδαμε την παρουσία κάποιου μη ειδικού σήματος. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο είναι ότι δεν παρατηρείται πρωτεόλυση των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών, η οποία θα παρεμπόδιζε έπειτα τη διαδικασία της σωστής δέσμευσης στα σφαιρίδια HA. Στα παραπάνω εκχυλίσματα δεν ανιχνεύθηκε κάποια ζώνη πάνω από την κύρια ζώνη της Exosc10 που θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην σουμοϋλιωμένη μορφή της.

Όσον αφορά την ανάλυση των εκλουσμάτων, παρατηρώντας την εικόνα 52(σχήμα B) διακρίνουμε αρχικά τεχνικά προβλήματα της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμισης με το κυριότερο πρόβλημα αυτού του πειράματος να είναι ότι η ποσότητα που κατακρημνίζεται σε κάθε συνθήκη δεν είναι ίδια (μεγαλύτερη κατακρήμιση της HA-Exosc10 WT στην υποξία από ότι στην νορμοξία, ενώ μικρή κατακρήμιση για τις HA-Exosc10 K168R και K201R). Παρατηρούμε μία κύρια ζώνη της HA-Exosc10 WT και των μεταλλαγμένων μορφών της να εμφανίζεται στα 115kDa (σχήμα B, διαδρομές 2-9 και 11-12) η οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι η μη τροποποιημένη (μη σουμοϋλιωμένη) μορφή και σε κάποια από τα δείγματα παρατηρούμε 1-2 ζώνες περίπου στα 20kDa παραπάνω, οι οποίες πιθανά να αντιστοιχούν στην σουμοϋλιωμένη μορφή των χιμαιρικών HA-Exosc10 πρωτεϊνών. Η μορφή αυτή αντιδρά με το His αντίσωμα στη συνθήκη της υπερεκφρασμένης HA-Exosc10 WT πρωτεΐνης στην υποξία (σχήμα B, διαδρομή 3) που σημαίνει ότι είναι τροποποιημένη με την εξωγενή His-SUMO1 πρωτεΐνη. Στην νορμοξία δεν εμφανίστηκε η ίδια ζώνη ίσως λόγω της μικρότερης ποσότητας συνολικής κατακρημισμένης HA-Exosc10 WT πρωτεΐνης. Η ζώνη αυτή (στην εικόνα συμβολίζεται με αστερίσκο) εντοπίζεται και στην συνθήκη της HA-Exosc10 K583R. Η μορφή αυτή αντιδρά επίσης, με το His αντίσωμα αν και σε εμφανώς

μειωμένη ποσότητα (σχήμα Β, διαδρομή 4) σε σχέση με την υπερεκφρασμένη αγρίου τύπου πρωτεΐνη ενώ στην υποξία φαίνεται να μειώνεται ακόμα περισσότερο, δείχνοντας πως πιθανά η λυσίνη 583 είναι η κύρια θέση σουμυλίωσης. Εφόσον όμως παραμένει σήμα σουμυλίωσης όπως εντοπίζεται με το anti- his αντίσωμα πιθανά να υπάρχει και άλλη θέση σουμυλίωσης. Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα ίσως και λόγω της μικρότερης κατακρημνισμένης ποσότητας εμφανίζουν ελάχιστες ποσότητες της πιθανής ζώνης σουμυλίωσης και δεν αντέδρασαν με το his αντίσωμα, άρα δεν μπορούμε να βγάλουμε ξεκάθαρα συμπεράσματα. Στην περίπτωση της μεταλλαγμένης μορφής K201R-K583R (σχήμα Β, διαδρομές 11 και 12), παρά την μεγάλη ποσότητα κατακρημνισμένης πρωτεΐνης δεν παρατηρήσαμε κάποια ζώνη που πιθανώς να αντιστοιχεί στην σουμυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης αυτής και δεν είχαμε αντίδραση με το His αντίσωμα. Απαραίτητη είναι και η διεξαγωγή αντίστοιχου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης για το μέταλλαγμα K168R-K583R.



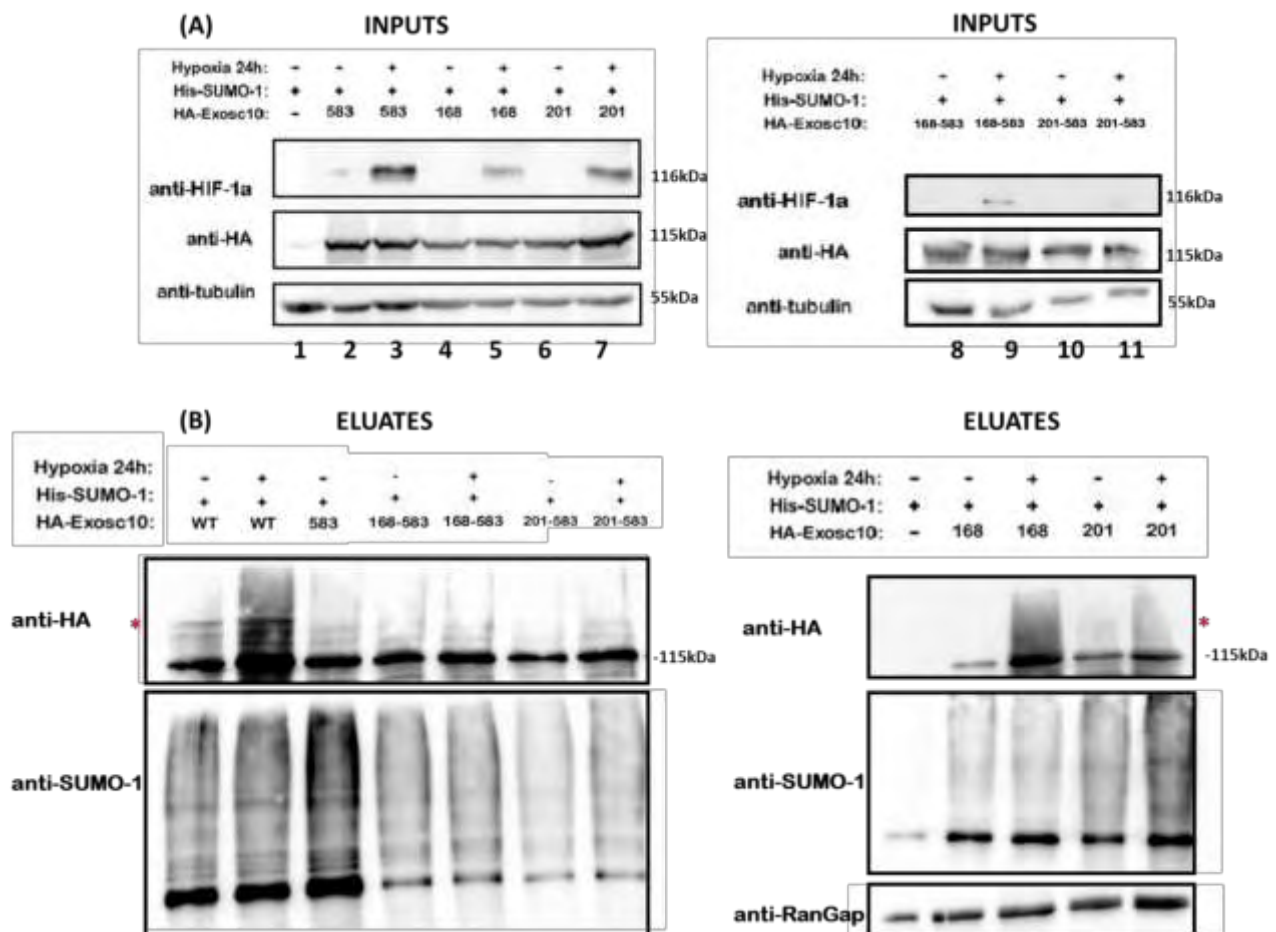
Εικόνα 52: Α) Έλεγχος των διάφορων μορφών της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης HA-Exosc10 σε νορμοξία και υποξία στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του HA επίτοπου, του HIF-1a (δείκτης δράσης υποξίας) και της τουμποουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). Β) Έλεγχος των εκλουσμάτων των διάφορων μορφών της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης HA-Exosc10 σε νορμοξία και υποξία μετά την ανοσοκατακρήμνιση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του HA και του His επίτοπου.

Μια δεύτερη προσέγγιση για την μελέτη της σουμυλίωσης της Exosc10 ήταν η ανοσοκατακρήμιση του συνόλου των σουμυλιωμένων από την SUMO-1 πρωτεϊνών για τη μετέπειτα ανίχνευση της σουμυλιωμένης exosc10 αναμεσα τους.(βλ. Μέθοδοι-4.3.1). Ομοίως με την πρώτη προσέγγιση του HA-IP, κύτταρα Hela διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις *K583R*, *K201R*, *K168R*, *K168R-K583R*, *K201R-K583R*, της πρωτεΐνης αγρίου τύπου HA-Exosc10 (WT) και το πλασμίδιο pcDNA3.1 His-SUMO-1 με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου PEI. Ως δείγμα κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Hela τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-HA. Τα κύτταρα επώαστηκαν στην νορμοξία ή υποξία για 24 ώρες αντίστοιχα και στη συνέχεια στα κυτταρικά λύματα πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση του συνόλου των SUMO-1 σουμυλιωμένων πρωτεϊνών. Η ανοσοκατακρήμιση αυτή έγινε με τη χρήση σφαιριδίων τα οποία φέρουν συζευγμένο ειδικό αντίσωμα έναντι της SUMO-1 [164],[165]. Τα δείγματα των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων πριν τη διεξαγωγή της ανοσοκατακρήμισης (inputs) και τα εκλούσματα (eluates) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του επιτόπου HA για την ανίχνευση της χμαιρικής πρωτεΐνης HA-Exosc10, του HIF-1α για την επιβεβαίωση της υποξίας και της τουμπουλίνης για τον έλεγχο του ισοφορτώματος και της SUMO-1 και της RanGap για την επιβεβαίωση της ανοσοκατακρήμισης των σουμυλιωμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 53.

Στην Εικόνα 53, παρουσιάζεται η έκφραση των διάφορων μορφών των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 (σχήμα A, διαδρομές 2-11) στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πριν την διεξαγωγή της ανοσοκατακρήμισης. Παρατηρούμε την ύπαρξη ζώνης μη τροποποιημένης από sumo ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (115kDa) χωρίς μεταβολές στην ένταση ανάμεσα σε νορμοξία και υποξία.

Για την ανάλυση των εκλουσμάτων, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της SUMO-1 πρωτεΐνης, το οποίο όπως φαίνεται και στην εικόνα (σχήμα B) αντέδρασε με το σύνολο των σουμυλιωμένων από τη SUMO-1 κατακρημισμένων πρωτεϊνών. Για την επιβεβαίωση της κατακρήμισης των σουμυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε επίσης ειδικό αντίσωμα έναντι της RanGap, γνωστής πρωτεΐνης στόχου σουμυλίωσης. Το αντίσωμα έναντι του HA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των υπερεκφρασμένων HA πρωτεϊνών οι οποίες απομονώθηκαν μαζί με το σύνολο των άλλων σουμυλιωμένων πρωτεϊνών. Στο HA αντίσωμα βλέπουμε την παρουσία 2-3 μορφών κατά πάσα πιθανότητα μη ειδικών και μιας μορφής που φαίνεται ειδική και θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην σουμυλιωμένη μορφή (σχήμα B, διαδρομές 1-2, στην εικόνα συμβολίζεται με αστερίσκο). Με

αυτή τη προσέγγιση IP, η Lys583 φαίνεται να είναι η κύρια θέση σουμυλίωσης γιατί τόσο στη μορφή της Exosc10 με τη μετάλλαξη *K583R* όσο και στις μορφές με τις δύο διπλές μεταλλάξεις *K168R-K583R*, *K201R-K583R* η ειδική αυτή ζώνη σουμυλίωσης (συμβολίζεται με αστερίσκο) φαίνεται να εξαφανίζεται. Όσον αφορά τις μορφές *K168R* και *K201R*, στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης φαίνεται να υπάρχουν τεχνικά προβλήματα και να μην έχει κατακρημνιστεί αρκετή ποσότητα ώστε να αναλυθεί σωστά και το αρχικό υλικό με το οποίο ξεκίνησε το πείραμα ήταν το μισό σε σχέση με τα υπόλοιπα. Παρόλα αυτά η μορφή *K201R* (σχήμα B, διαδρομή 10) φαίνεται να παρουσιάζει μια αντίστοιχη ειδική ζώνη.



Εικόνα 53: A) Έλεγχος των διάφορων μορφών της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-Exosc10 σε νορμοξία και υποξία στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του HA επιτόπου, του HIF-1Aa (δείκτης δράσης υποξίας) και της τουμποουλίνης (δείκτης ισοφορτώματος). B) Έλεγχος της σουμυλίωσης των διάφορων μορφών της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-Exosc10 σε νορμοξία και υποξία που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια μετά την ανοσοκατακρήμνιση, με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι της RanGap, της SUMO-1 και του επιτόπου HA.

Γενικότερα, και τα 2 πειράματα ανοσοκατακρήμνισης θα πρέπει να επαναληφθούν άλλες 2 φορές προκειμένου να φτάσουμε σε βέβαια συμπεράσματα. Παρόλα αυτά ένα γενικό συμπέρασμα

είναι πως η λυσίνη 583 φαίνεται να είναι η κύρια αν όχι η μοναδική λυσίνη που τροποποιείται από τις SUMO πρωτεΐνες.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υποξία είναι η κατάσταση μειωμένης διαθεσιμότητας O₂ για τα κύτταρα ή για ολόκληρο τον οργανισμό και έχει συσχετιστεί τόσο με φυσιολογικές όσο και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος [88]. Η υποξία πολλές φορές περιγράφεται ως είδος στρες το οποίο έχει αρνητικές επιδράσεις για τα κύτταρα εξαιτίας της έλλειψης διαθέσιμου οξυγόνου το οποίο απαιτείται για την παραγωγή ενέργειας [104]. Παρόλα αυτά κύτταρα, όπως τα καρκινικά κύτταρα στερεών όγκων [166], έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους μπορούν όχι μόνο να αποκρίνονται στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου αλλά και να μεγαλώνουν ταχύτερα αποφεύγοντας την απόπτωση και προωθώντας την μεταστατική τους δράση [167]. Το κύριο μονοπάτι απόκρισης που ενεργοποιείται κατά την υποξία περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factor), οι οποίοι επάγουν την μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η ερυθροποίηση και η γλυκόλυση [119].

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών αποτελούν έναν από τους ταχύτερους μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει τα κύτταρα ως τρόπο απόκρισης στις διάφορες μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος τους. Μια πολύ σημαντική και σχετικά πρόσφατα ανακαλυφθείσα μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η σουμοϋλίωση η οποία περιλαμβάνει την σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων [4]. Η σουμοϋλίωση μπορεί να επηρεάζει σχεδόν όλες τις ιδιότητες των πρωτεϊνών όπως η ενεργότητα, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός και η σταθερότητα, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται σε διαδικασίες τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [53], η επιδιόρθωση του DNA [168], η ρύθμιση της μεταγραφής [169] και στη μεταγωγή σήματος [170]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως πολλοί παράγοντες του μονοπατιού της υποξίας όπως οι HIF-α και HIF-β υπομονάδες, οι συμπαράγοντες CBP/p300 και η pVHL επηρεάζονται ποικιλοτρόπως από τη σουμοϋλίωση. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο μονοπάτι της υποξίας είναι αμφιλεγόμενος όσον αφορά τον HIF-1α με αποτελέσματα μελετών να δείχνουν τόσο ενεργοποιητική [114],[115] όσο και ανασταλτική δράση [116],[117], ενώ η σουμοϋλίωση των παραγόντων CBP/p300 και pVHL φαίνεται να έχει κατασταλτικά αποτελέσματα στη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών οδηγώντας στην μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας στο μονοπάτι της υποξίας [120] και στην αύξηση αυτής αντίστοιχα [122].

Πρόσφατα δεδομένα που αφορούν την μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στα κύτταρα υποδεικνύουν πως η σουμοϋλίωση εμπλέκεται ενεργά στην απόκριση των κυττάρων σε διάφορα στρες. Συγκεκριμένα σε διάφορα είδη στρες όπως το οξειδωτικό στρες [70], το θερμικό σοκ [70],[71],[72],[73] και η ισχαιμία [129],[130] έχουν βρεθεί αλλαγές στο γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Ειδικότερα, στην ισχαιμία θεωρείται ότι η μαζική αύξηση των επιπέδων σουμοϋλίωσης και του πυρηνικού εντοπισμού πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [128], προσδίδει πιθανών ένα «νευροπροστατευτικό» ρόλος στη σουμοϋλίωσης [127].

Όσον αφορά την υποξία, ο ρόλος των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Πρόσφατες μελέτες ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας [135],[134] έχουν δείξει πως παρόλο που δεν υπάρχουν μαζικές αλλαγές στο γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες των οποίων η σουμοϋλίωση μεταβάλλεται κατά την υποξία (μειώνεται ή αυξάνεται). Σε πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες όπως ένζυμα της γλυκολυτικής οδού [171],[167],[172] αλλάζουν παράλληλα και τα επίπεδα έκφρασης αλλά και τα πρότυπα σουμοϋλίωσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως κάποιες από τις πρωτεΐνες, κυρίως μεταγραφικοί παράγοντες, αλλάζουν μόνο την ικανότητα σουμοϋλίωσης τους χωρίς να μεταβάλλουν τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα μετά την επώαση τους στην υποξία [135]. Μια εξ αυτών των πρωτεϊνών είναι η πρωτεΐνη Exosc10, μία εκ των δύο καταλυτικών υπομονάδων του RNA εξωσώματος. Συγκεκριμένα, η σουμοϋλίωση της Exosc10 φαίνεται να μειώνεται δραματικά στην υποξία [135] και αυτή η παρατήρηση αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης κατά την υποξία. Επιπρόσθετα στην βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν έως τώρα μελέτες που να συσχετίζουν τον ρόλο της Exosc10 και της σουμοϋλίωσής της στην υποξία.

Η Exosc10 η οποία συχνά αναφέρεται και ως Rpr6 εμπλέκεται στον ποιοτικό έλεγχο, επεξεργασία και αποικοδόμηση σχεδόν όλων των ειδών RNA στον πυρήνα [173], διεργασίες οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στην υποξία. Πρόσφατα, η σουμοϋλίωση της Exosc10 έχει συσχετιστεί με την απόκριση στο κρύο [163]. Συγκεκριμένα δειχθηκε ότι ως απόκριση στο κρύο, επάγεται αύξηση των επιπέδων σουμοϋλίωσης της Exosc10 και μάλιστα αυτή η αύξηση φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της Exosc10.

Ένας από τους κύριους στόχους της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η προκαταρκτική μελέτη της σημασίας της πρωτεΐνης Exosc10 σε καρκινικά κύτταρα και ο εντοπισμός πιθανών αλλαγών της Exosc10 κατά την υποξία. Σκοπός επίσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν

η εύρεση της/των θέσεων σουμυλίωσης της πρωτεΐνης αυτής με σκοπό τη δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 που έχουν χάσει την ικανότητα σύζευξης με τις πρωτεΐνες SUMO. Αυτές οι μορφές έχουν μεγάλη σημασία καθώς θα μπορούν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την μελέτη της σημασίας και του ρολού της σουμυλίωσης της Exosc10 στην απόκριση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες.

Όσον αφορά στο πρώτο στόχο της εργασίας αρχικά ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης, τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και το πρότυπο σουμυλίωσης της ενδογενούς και υπερεκφρασμένης HA-Exosc10 στην υποξία. Η παρουσία του επίτοπου HA μας δίνει την δυνατότητα να διακρίνουμε την ενδογενή από την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη Exosc10 και επιτρέπει επίσης την εκλεκτικό εντοπισμό ή ανοσοκατακρήμιση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επίτοπου αυτού. Αρχικά παρατηρήσαμε πως η έκφραση είτε της ενδογενούς ή της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης HA-Exosc10 δεν αλλάζει στην υποξία σε σχέση με τη νορμοξία, επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα [135]. Πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμιση της υπερεκφρασμένης αγρίου τύπου HA-Exosc10 WT πρωτεΐνης δεν μπορέσαμε να δούμε σημαντικές αλλαγές στη σουμυλίωση της Exosc10 στην υποξία που να επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις που αφορούσαν την ενδογενή πρωτεΐνη (κ.Χαχάμη Γ., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε τεχνικά προβλήματα της ανοσοκατακρήμισης όπως η άνιση ποσότητα κατακρημισμένης πρωτεΐνης μεταξύ των συνθηκών ή στην μικρή ποσότητα της σουμυλιωμένης μορφής (λιγότερο από 5%) σε σχέση με τη μη σουμυλιωμένη μορφή της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, που κάνει δύσκολο τον εντοπισμό αλλαγών. Θεωρούμε ότι η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων απαιτείται προκειμένου να διευκρινιστεί αν υπάρχουν τυχόν αλλαγές στην σουμυλίωση, όμοιες με αυτές της ενδογενούς πρωτεΐνης, και στην περίπτωση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης.

Η υπόθεση ότι η κατηγορία των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν μεταβολές στη σουμυλίωσή τους αλλά όχι στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα κατά την υποξία [135] πιθανώς σχετίζεται με τον μηχανισμό απόκρισης των κυττάρων στην υποξία, μας οδήγησε στο να εξετάσουμε αν υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ του ρόλου και της μείωσης της σουμυλίωσης της Exosc10 στην υποξία με την δράση των κύριων ρυθμιστών της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία, των παραγόντων HIF. Προκαταρκτικά πειράματα μας έδειξαν πως η αποσιώπηση της Exosc10 δεν φαίνεται να επηρεάζει άμεσα την μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1.

Ενδιαφέρον εμφάνισε το γεγονός πως η υποξία επηρέασε τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10. Συγκεκριμένα, πειράματα ανοσοφθορισμού και ποσοτικοποίησης

του σήματος της Exosc10 στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα καθώς και κλασμάτωσης έδειξαν πως ένα ποσοστό της Exosc10 στους πυρηνίσκους φάνηκε να μειώνεται στην υποξία ενώ αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε στο πυρηνόπλασμα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει παλιότερα ανεξάρτητα πειράματα της κ. Χαχάμη (αδημοσίευτα αποτελέσματα) ανοσοφθορισμού με συνεστιακή μικροσκοπία, τα οποία έδειξαν ότι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της Exosc10 επηρεάζεται μετά το πέρας 48 ωρών υποξίας και συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη χάνει τον εστιασμένο ενδοκυτταρικό εντοπισμό της στους πυρηνίσκους στην υποξία και εντοπίζεται περισσότερο διάχυτη στο πυρηνόπλασμα. Δεδομένου ότι μία από τις διάφορες λειτουργίες της σουμοϋλίωσης στα κύτταρα είναι η ρύθμιση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών, δημιουργήθηκε το ερώτημα του εάν η παρατηρούμενη μείωση της σουμοϋλίωσης της Exosc10 στην υποξία σχετίζεται με την μετακίνηση της από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα. Όπως φαίνεται, ένα κλάσμα της Exosc10 και όχι όλη η πρωτεΐνη μετακινείται κατά την υποξία και θα μπορούσε αυτό το κλάσμα να αντιστοιχεί στο κλάσμα της πρωτεΐνης που χάνει τη σουμοϋλίωση κατά την υποξία. Άρα, γεννήθηκε το ερώτημα για το αν η σουμοϋλίωση της Exosc10 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της στον πυρηνίσκο και για την συμμετοχή της έτσι στις ειδικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα εκεί όπως για παράδειγμα η ωρίμανση των ριβοσωμικών RNA [140].

Για να διερευνήσουμε αν αυτή η αλλαγή που παρατηρείται στον εντοπισμό της ενδογενούς πρωτεΐνης Exosc10 στην υποξία σχετίζεται πράγματι με τη σουμοϋλίωσή της, κατασκευάσαμε τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές από τις οποίες προκύπτουν χιμαιρικές πρωτεΐνες HA-Exosc10 που φέρουν μεταλλάξεις σε μία ή πολλαπλές πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης της Exosc10. Επιλέξαμε να μεταλλάξουμε τις λυσίνες K583, K201 και K168. Η επιλογή των υποψήφιων προς μετάλλαξη και άρα υποψήφιων για σουμοϋλίωση λυσινών της Exosc10 στηρίχθηκε αρχικά σε βιοπληροφορική ανάλυση μέσω προγραμμάτων, τα οποία προβλέπουν τις πιθανές λυσίνες στόχους σύζευξης με τις SUMO πρωτεΐνες (SUMOplot, GPS-SUMO) και σε δεδομένα της βιβλιογραφίας, SUMO-πρωτεομικών αναλύσεων στον άνθρωπο [50]. Επειδή πολλές φορές μια πρωτεΐνη μπορεί να σουμοϋλιώνεται σε περισσότερες από μια θέσεις αποφασίσαμε να δημιουργήσουμε και συνδυασμούς που περιέχουν διπλές μεταλλάξεις λυσινών. Μια πρόσφατη και ίσως η μόνη μελέτη της σουμοϋλίωσης της Exosc10 σε συνθήκες κρύου [163], χρησιμοποιεί για την ανάλυση μια μορφή της Exosc10 που φέρει 3 μεταλλάξεις των λυσινών K583, K201 και K168.

Μελετήσαμε την έκφραση και τον εντοπισμό των μεταλλαγμένων μορφών της Exosc10 που δημιουργήσαμε σε νορμοξία και υποξία, προκειμένου να δούμε εάν συμπεριφέρονται και

εκφράζονται επιτυχώς και αν ομοιάζουν στην συμπεριφορά της ενδογενούς πρωτεΐνης. Η αρχική μας παρατήρηση είναι ότι δεν φαίνεται κάποιο από αυτά τα μεταλλάγματα να παρουσιάζει δραματική αλλαγή στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία όπως παρατηρήθηκε με την ενδογενή πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά οι διαφορές στην υπερέκφραση των διάφορων HA-Exosc10 χιμαιρικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο και από πείραμα σε πείραμα κάνουν δύσκολη τη σύγκριση της ικανότητας μετακίνησης των διάφορων αυτών μορφών στον πυρηνίσκο. Αυτό που μπορεί να ειπωθεί με ασφάλεια είναι ότι κανένα μέταλλαγμα ούτε από αυτά που περιείχαν τις μονές μεταλλάξεις ούτε από αυτά που περιείχαν τις διπλές μεταλλάξεις δεν αποκλείστηκε από το πυρηνίσκο, δείχνοντας πως σουμυλίωση τουλάχιστον σε αυτές τις πιθανές λυσίνες δεν απαιτείται. Προκειμένου να διαλευκανθεί η ύπαρξη ή όχι διαφορών στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των χιμαιρικών πρωτεϊνών HA-Exosc10 που έφεραν τις μεταλλάξεις στις υποψήφιες λυσίνες κατά την υποξία, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πειράματα κλασμάτωσης για την ανίχνευση και σύγκριση του εντοπισμού των υπερέκφρασμένων πρωτεϊνών HA-Exosc10 στον πυρηνίσκο και στο πυρηνόπλασμα.

Θέλοντας να χαρακτηρίσουμε περισσότερο τις μορφές της Exosc10 που δημιουργήσαμε ως προς την ικανότητα να σουμυλιώνονται ή όχι, προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με βάση τον επίτοπο HA (HA-IP) ή του συνόλου των σουμυλιωμένων από την SUMO-1 πρωτεϊνών. Από την ανοσοκατακρήμνιση των SUMO-1 πρωτεϊνών που ήταν και πιο επιτυχής από τεχνικής άποψης, θεωρούμε ότι η Lys583 της Exosc10 είναι μάλλον η κύρια θέση σουμυλίωσης. Η λυσίνη αυτή ανήκει σε τυπικό μοτίβο σουμυλίωσης και από την βιοπληροφορική ανάλυση με προγράμματα SUMO-πρόγνωσης εμφάνισε το μεγαλύτερο σκόρ. Δεν μπορούμε όμως ακόμη να αποκλείσουμε και την ύπαρξη και άλλων θέσεων σουμυλίωσης όπως δείχνουν τα πειράματα HA-IP. Απαραίτητη κρίνεται η επανάληψη των πειραμάτων για την επιβεβαίωση της μορφής της HA-Exosc10 η οποία στερείται την ικανότητα σουμυλίωσης.

Υπάρχει πιθανότητα η αλλαγή του προτύπου σουμυλίωσης να μην σχετίζεται άμεσα με τον εντοπισμό της Exosc10 στην υποξία αλλά να επηρεάζει την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης οσον αφορά στην επεξεργασία των ριβοσωμικών RNA (rRNA) και των μικρών πυρηνισκικών RNA (snoRNA) στους πυρηνίσκους [174]. Γι' αυτό τον λόγο απαιτούνται περισσότερα πειράματα για την διαλεύκανση της σημασίας της Exosc10 και της σουμυλίωσής της στην κυτταρική αποκρίση στην υποξία.

Συνοψίζοντας, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, αξίζει να τονισθεί ότι δόθηκαν οι βάσεις για την διαλεύκανση του ρόλου της σουμυλίωσης στη ρύθμιση της πρωτεΐνης Exosc10 αλλά και

στη σημασία της στην κυτταρική απόκριση κατά την υποξία. Επιτεύχθηκαν η κατασκευή και ο χαρακτηρισμός των πλασμιδιακών κατασκευών οι οποίες φέρουν μεταλλάξεις σε πιθανές λυσίνες στόχους σύζευξης με τη SUMO1 πρωτεΐνη. Οι κατασκευές αυτές είναι τα απαραίτητα εργαλεία για την διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων που θα έχουν ως στόχο την μελέτη της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης στην Exosc10.

Ως μελλοντικοί στόχοι μπορούν να αποτελέσουν πειράματα όπως ανοσοφθορισμός και κλασμάτωση σε καρκινικά κύτταρα HeLa αλλά και σε άλλες κυτταρικές σειρές προκειμένου να διαλευκανθεί αν η σουμοϋλίωση παίζει όντως ρόλο στην ρύθμιση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της Exosc10. Σημαντικό επίσης, είναι να εξετασθούν και άλλες πιθανοί ρόλοι της σουμοϋλίωσης στην πρωτεΐνη Exosc10, με πειράματα τα οποία θα μελετήσουν πιθανή συσχέτιση της σουμοϋλίωσης της Exosc10 με την καταλυτική της δράση και ενεργότητα όσον αφορά στην αποικοδόμηση mRNA ή την ωρίμανση rRNA και με την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες.

Τέλος, η διασαφήνιση του ρόλου της σουμοϋλίωσης στις λειτουργίες της Exosc10 καθώς και η μελέτη του ρόλου της μείωσής της κατά την υποξία θα βοηθήσει στην κατανόηση του ρόλου της Exosc10 αλλά και των διαδικασιών αποικοδόμησης του RNA στην προσαρμογή των κυττάρων σε υποξικό περιβάλλον. Η υποξία παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου και η διασαφήνιση των μηχανισμών προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων θα δώσει νέα σημεία-στόχους για την ανάπτυξη μελλοντικών φαρμακολογικών προσεγγίσεων και στοχευμένης θεραπείας.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21:255-61.
2. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP (2014) The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics* 14:513-24.
3. Bossis G, Melchior F (2006) SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* 1:13.
4. Flotho A, Melchior F (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 82:357-85.
5. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135:1457-70.
6. van der Veen AG, Ploegh HL (2012) Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* 81:323-57.
7. Cappadocia L, Lima CD (2018) Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 118:889-918.
8. Yang M, Hsu CT, Ting CY, Liu LF, Hwang J (2006) Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem* 281:8264-74.
9. Melchior F (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
10. Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, Bohren KM (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337:517-20.
11. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276:35368-74.
12. Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, Lamond AI (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5:2298-310.
13. Saitoh H, Hinchey J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275:6252-8.
14. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC (2017) SUMO-4: A novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS One* 12:e0178056.
15. Ayaydin F, Dasso M (2004) Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* 15:5208-18.
16. Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81:203-29.
17. Schulman BA, Harper JW (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:319-31.
18. Sampson DA, Wang M, Matunis MJ (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276:21664-9.
19. Xu J, He Y, Qiang B, Yuan J, Peng X, Pan XM (2008) A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 9:8.
20. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-79.
21. Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP (2017) The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Res* 77:1542-7.
22. Wilkinson KA, Henley JM (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428:133-45.
23. Yunus AA, Lima CD (2009) Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell* 35:669-82.

24. Werner A, Flotho A, Melchior F (2012) The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell* 46:287-98.
25. Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH (2009) Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 324:1327-30.
26. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP (2005) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25:8456-64.
27. Weger S, Hammer E, Heilbronn R (2005) Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 579:5007-12.
28. Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113:127-37.
29. Nayak A, Muller S (2014) SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol* 15:422.
30. Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET (2000) Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275:3355-9.
31. Hang J, Dasso M (2002) Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277:19961-6.
32. Gong L, Yeh ET (2006) Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281:15869-77.
33. Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, et al. (2006) SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174:939-49.
34. Shen LN, Geoffroy MC, Jaffray EG, Hay RT (2009) Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J* 421:223-30.
35. Goeres J, Chan PK, Mukhopadhyay D, Zhang H, Raught B, Matunis MJ (2011) The SUMO-specific isopeptidase SENP2 associates dynamically with nuclear pore complexes through interactions with karyopherins and the Nup107-160 nucleoporin subcomplex. *Mol Biol Cell* 22:4868-82.
36. Cubenas-Potts C, Goeres JD, Matunis MJ (2013) SENP1 and SENP2 affect spatial and temporal control of sumoylation in mitosis. *Mol Biol Cell* 24:3483-95.
37. Itahana Y, Yeh ET, Zhang Y (2006) Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. *Mol Cell Biol* 26:4675-89.
38. Yun C, Wang Y, Mukhopadhyay D, Backlund P, Kolli N, Yergey A, et al. (2008) Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J Cell Biol* 183:589-95.
39. Zunino R, Braschi E, Xu L, McBride HM (2009) Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem* 284:17783-95.
40. Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, et al. (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9:769-79.
41. Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR (2008) Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci* 121:4106-13.
42. Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, Janne OA (2008) Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* 28:5381-90.
43. Wang J, Chen L, Wen S, Zhu H, Yu W, Moskowitz IP, et al. (2011) Defective sumoylation pathway directs congenital heart disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:468-76.
44. Wang L, Wansleben C, Zhao S, Miao P, Paschen W, Yang W (2014) SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep* 15:878-85.

45. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET (2007) SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF-1 α during hypoxia. *Cell* 131:584-95.
46. Kang X, Qi Y, Zuo Y, Wang Q, Zou Y, Schwartz RJ, et al. (2010) SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol Cell* 38:191-201.
47. Cheng J, Bawa T, Lee P, Gong L, Yeh ET (2006) Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8:667-76.
48. Bawa-Khalfe T, Yeh ET (2010) SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. *Genes Cancer* 1:748-52.
49. Mooney SM, Grande JP, Salisbury JL, Janknecht R (2010) Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* 49:1-10.
50. Hendriks IA, Vertegaal AC (2016) A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:581-95.
51. Geoffroy MC, Hay RT (2009) An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:564-8.
52. Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-82.
53. Wotton D, Pemberton LF, Merrill-Schools J (2017) SUMO and Chromatin Remodeling. *Adv Exp Med Biol* 963:35-50.
54. Seeler JS, Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:690-9.
55. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88:97-107.
56. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, et al. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11:1043-54.
57. Heun P (2007) SUMO Organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 19:350-5.
58. Wasik U, Filipek A (2014) Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843:2878-85.
59. Yang Y, He Y, Wang X, Liang Z, He G, Zhang P, et al. (2017) Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biol* 7.
60. Seeler JS, Dejean A (2017) SUMO and the robustness of cancer. *Nat Rev Cancer* 17:184-97.
61. Lee JS, Choi HJ, Baek SH (2017) Sumoylation and Its Contribution to Cancer. *Adv Exp Med Biol* 963:283-98.
62. Yang LS, Zhang XJ, Xie YY, Sun XJ, Zhao R, Huang QH (2016) SUMOylated MAFB promotes colorectal cancer tumorigenesis. *Oncotarget* 7:83488-501.
63. Li R, Wei J, Jiang C, Liu D, Deng L, Zhang K, et al. (2013) Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res* 73:5742-53.
64. Da Silva-Ferrada E, Ribeiro-Rodrigues TM, Rodriguez MS, Girao H (2016) Proteostasis and SUMO in the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 79:443-50.
65. Liu Y, Zhao D, Qiu F, Zhang LL, Liu SK, Li YY, et al. (2017) Manipulating PML SUMOylation via Silencing UBC9 and RNF4 Regulates Cardiac Fibrosis. *Mol Ther* 25:666-78.
66. Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, et al. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304:100-4.
67. Luo HB, Xia YY, Shu XJ, Liu ZC, Feng Y, Liu XH, et al. (2014) SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16586-91.
68. Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, et al. (2006) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 13:96-108.

69. Saul VV, Niedenthal R, Pich A, Weber F, Schmitz ML (2015) SUMO modification of TBK1 at the adaptor-binding C-terminal coiled-coil domain contributes to its antiviral activity. *Biochim Biophys Acta* 1853:136-43.
70. Tempe D, Piechaczyk M, Bossis G (2008) SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36:874-8.
71. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, et al. (2009) System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal* 2:ra24.
72. Vihervaara A, Sistonen L (2014) HSF1 at a glance. *J Cell Sci* 127:261-6.
73. Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, et al. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276:40263-7.
74. Niskanen EA, Malinen M, Sutinen P, Toropainen S, Paakinaho V, Vihervaara A, et al. (2015) Global SUMOylation on active chromatin is an acute heat stress response restricting transcription. *Genome Biol* 16:153.
75. Bossis G, Melchior F (2006) Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 21:349-57.
76. Xu Z, Lam LS, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SW (2008) Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *FASEB J* 22:127-37.
77. Zhao M, Mishra L, Deng CX (2018) The role of TGF-beta/SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 14:111-23.
78. Xiu D, Wang Z, Cui L, Jiang J, Yang H, Liu G (2018) Sumoylation of SMAD 4 ameliorates the oxidative stress-induced apoptosis in osteoblasts. *Cytokine* 102:173-80.
79. Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 88:1474-80.
80. Sarkar S, Banerjee PK, Selvamurthy W (2003) High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol Cell Biochem* 253:287-305.
81. Favret F, Richalet JP (2007) Exercise and hypoxia: the role of the autonomic nervous system. *Respir Physiol Neurobiol* 158:280-6.
82. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M (2012) The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 31:2448-60.
83. Dunwoodie SL (2009) The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell* 17:755-73.
84. Huang X, Trinh T, Aljoufi A, Broxmeyer HE (2018) Hypoxia Signaling Pathway in Stem Cell Regulation: Good and Evil. *Curr Stem Cell Rep* 4:149-57.
85. Vaupel P, Mayer A, Hockel M (2004) Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 381:335-54.
86. Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008) The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8:967-75.
87. Ramachandran S, Ient J, Gottgens EL, Krieg AJ, Hammond EM (2015) Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia. *Genes (Basel)* 6:935-56.
88. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK (2015) The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* 3:83-92.
89. Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49:507-21.
90. Krock BL, Skuli N, Simon MC (2011) Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2:1117-33.

91. Azab AK, Hu J, Quang P, Azab F, Pitsillides C, Awwad R, et al. (2012) Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features. *Blood* 119:5782-94.
92. Rohwer N, Cramer T (2011) Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* 14:191-201.
93. Cosse JP, Michiels C (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 8:790-7.
94. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5510-4.
95. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771-8.
96. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30:393-402.
97. Wang S, Ge K, Roeder RG, Hankinson O (2004) Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 279:13593-600.
98. Koh MY, Powis G (2012) Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 37:364-72.
99. Chee NT, Lohse I, Brothers SP (2019) mRNA-to-protein translation in hypoxia. *Mol Cancer* 18:49.
100. O'Rourke JF, Dachs GU, Gleadle JM, Maxwell PH, Pugh CW, Stratford IJ, et al. (1997) Hypoxia response elements. *Oncol Res* 9:327-32.
101. Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X (2015) Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep* 12:2411-6.
102. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-8.
103. Nytko KJ, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH, Stiehl DP (2007) Regulated function of the prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) oxygen sensor proteins. *Antioxid Redox Signal* 9:1329-38.
104. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 40:294-309.
105. Zhang N, Fu Z, Linke S, Chicher J, Gorman JJ, Visk D, et al. (2010) The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* 11:364-78.
106. Ortmann B, Druker J, Rocha S (2014) Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci* 71:3569-82.
107. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S (2016) NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J* 283:413-24.
108. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:755-61.
109. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κ B in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 18:4691-7.
110. Movafagh S, Crook S, Vo K (2015) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 116:696-703.

111. Mohlin S, Hamidian A, von Stedingk K, Bridges E, Wigerup C, Bexell D, et al. (2015) PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res* 75:4617-28.
112. Borsi E, Terragna C, Brioli A, Tacchetti P, Martello M, Cavo M (2015) Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha in multiple myeloma. *Transl Res* 165:641-50.
113. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 17:1-9.
114. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. (2004) Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 324:394-400.
115. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131:309-23.
116. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC (2007) SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 360:646-52.
117. Kang X, Li J, Zou Y, Yi J, Zhang H, Cao M, et al. (2010) PIASy stimulates HIF-1Aalpha SUMOylation and negatively regulates HIF-1Aalpha activity in response to hypoxia. *Oncogene* 29:5568-78.
118. Nunez-O'Mara A, Berra E (2013) Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biol Chem* 394:459-69.
119. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:1-15.
120. Kuo HY, Chang CC, Jeng JC, Hu HM, Lin DY, Maul GG, et al. (2005) SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16973-8.
121. Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, et al. (2009) SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J* 28:2748-62.
122. Cai Q, Robertson ES (2010) Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. *PLoS One* 5.
123. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, et al. (2004) Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 95:146-53.
124. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005:re12.
125. Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, et al. (2006) Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 3:e47.
126. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. (2009) Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284:16767-75.
127. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, et al. (2017) Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol* 157:79-91.
128. Janoff A (1964) Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) during Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. *Int Anesthesiol Clin* 2:251-69.
129. Bernstock JD, Yang W, Ye DG, Shen Y, Pluchino S, Lee YJ, et al. (2018) SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *J Cereb Blood Flow Metab* 38:5-16.

130. Yang W, Sheng H, Thompson JW, Zhao S, Wang L, Miao P, et al. (2014) Small ubiquitin-like modifier 3-modified proteome regulated by brain ischemia in novel small ubiquitin-like modifier transgenic mice: putative protective proteins/pathways. *Stroke* 45:1115-22.
131. Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, et al. (2007) Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:950-62.
132. Comerford KM, Leonard MO, Karhausen J, Carey R, Colgan SP, Taylor CT (2003) Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:986-91.
133. Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjolund H, et al. (2004) Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett* 569:293-300.
134. Kunz K, Wagner K, Mendler L, Holper S, Dehne N, Muller S (2016) SUMO Signaling by Hypoxic Inactivation of SUMO-Specific Isopeptidases. *Cell Rep* 16:3075-86.
135. Chachami G, Stankovic-Valentin N, Karagiota A, Basagianni A, Plessmann U, Urlaub H, et al. (2019) Hypoxia-induced Changes in SUMO Conjugation Affect Transcriptional Regulation Under Low Oxygen. *Mol Cell Proteomics* 18:1197-209.
136. Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev* 13:2148-58.
137. Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* 91:457-66.
138. Allmang C, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* 28:1684-91.
139. Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG, Anderson J (2004) Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 18:1227-40.
140. Ogami K, Chen Y, Manley JL (2018) RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: mechanisms and significance. *Noncoding RNA* 4.
141. Makino DL, Conti E (2013) Structure determination of an 11-subunit exosome in complex with RNA by molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69:2226-35.
142. Januszyk K, Lima CD (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol* 24:132-40.
143. Schneider C, Tollervey D (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* 38:485-93.
144. Thoms M, Thomson E, Bassler J, Gnadig M, Griesel S, Hurt E (2015) The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. *Cell* 162:1029-38.
145. Kinoshita N, Goebel M, Yanagida M (1991) The fission yeast *dis3+* gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Mol Cell Biol* 11:5839-47.
146. Hou C, Li L, Qin ZS, Corces VG (2012) Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains. *Mol Cell* 48:471-84.
147. Pefanis E, Wang J, Rothschild G, Lim J, Chao J, Rabadan R, et al. (2014) Noncoding RNA transcription targets AID to divergently transcribed loci in B cells. *Nature* 514:389-93.
148. Wan J, Yourshaw M, Mamsa H, Rudnik-Schoneborn S, Menezes MP, Hong JE, et al. (2012) Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet* 44:704-8.

149. Boczonadi V, Muller JS, Pyle A, Munkley J, Dor T, Quartararo J, et al. (2014) EXOSC8 mutations alter mRNA metabolism and cause hypomyelination with spinal muscular atrophy and cerebellar hypoplasia. *Nat Commun* 5:4287.
150. Di Donato N, Kuechler A, Vergano S, Heinritz W, Bodurtha J, Merchant SR, et al. (2016) Update on the ACTG1-associated Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome. *Am J Med Genet A* 170:2644-51.
151. Fabre A, Charroux B, Martinez-Vinson C, Roquelaure B, Odul E, Sayar E, et al. (2012) SKIV2L mutations cause syndromic diarrhea, or trichohepatoenteric syndrome. *Am J Hum Genet* 90:689-92.
152. Fabre A, Martinez-Vinson C, Roquelaure B, Missirian C, Andre N, Breton A, et al. (2011) Novel mutations in TTC37 associated with tricho-hepato-enteric syndrome. *Hum Mutat* 32:277-81.
153. Morton DJ, Kuiper EG, Jones SK, Leung SW, Corbett AH, Fasken MB (2018) The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *RNA* 24:127-42.
154. Januszyk K, Liu Q, Lima CD (2011) Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA* 17:1566-77.
155. Briggs MW, Burkard KT, Butler JS (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J Biol Chem* 273:13255-63.
156. Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* 18:5399-410.
157. Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, et al. (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* 29:2342-57.
158. Feigenbutz M, Jones R, Besong TM, Harding SE, Mitchell P (2013) Assembly of the yeast exoribonuclease Rrp6 with its associated cofactor Rrp47 occurs in the nucleus and is critical for the controlled expression of Rrp47. *J Biol Chem* 288:15959-70.
159. Wasmuth EV, Januszyk K, Lima CD (2014) Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature* 511:435-9.
160. Copenhaver GP, Putnam CD, Denton ML, Pikaard CS (1994) The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 22:2651-7.
161. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, et al. (2016) Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol* 17:19.
162. Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, et al. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* 42:W325-30.
163. Knight JR, Bastide A, Peretti D, Roobol A, Roobol J, Mallucci GR, et al. (2016) Cooling-induced SUMOylation of EXOSC10 down-regulates ribosome biogenesis. *RNA* 22:623-35.
164. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. (2013) Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol* 20:525-31.
165. Barysch SV, Dittner C, Flotho A, Becker J, Melchior F (2014) Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. *Nat Protoc* 9:896-909.
166. Carnero A, Leonart M (2016) The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays* 38 Suppl 1:S65-74.
167. Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA (2016) Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5:e190.

168. Hendriks IA, Vertegaal AC (2015) SUMO in the DNA damage response. *Oncotarget* 6:15734-5.
169. Rosonina E, Akhter A, Dou Y, Babu J, Sri Theivakadadcham VS (2017) Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* 8:220-31.
170. Andreou AM, Tavernarakis N (2009) SUMOylation and cell signalling. *Biotechnol J* 4:1740-52.
171. Webster KA (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol* 206:2911-22.
172. Jin M, Fuller GG, Han T, Yao Y, Alessi AF, Freeberg MA, et al. (2017) Glycolytic Enzymes Coalesce in G Bodies under Hypoxic Stress. *Cell Rep* 20:895-908.
173. Zinder JC, Lima CD (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev* 31:88-100.
174. Davidson L, Francis L, Cordiner RA, Eaton JD, Estell C, Macias S, et al. (2019) Rapid Depletion of DIS3, EXOSC10, or XRN2 Reveals the Immediate Impact of Exoribonucleolysis on Nuclear RNA Metabolism and Transcriptional Control. *Cell Rep* 26:2779-91 e5.