



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Μελέτη της έκφρασης και επίδρασης του μεταγραφικού ρυθμιστή NFRKB  
στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία»

“Study of the expression and the effect of the transcriptional factor NFRKB  
in the hypoxia response pathway”

Λακάκη Ελευθερία του Κωνσταντίνου

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Γεωργία Χαχάμη (επιβλέπουσα):** Επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Αντώνιος Γιακουντής (συνεπιβλέπων):** Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ηλίας Μυλωνής (μέλος):** Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γεωργία Χαχάμη, Επίκουρη καθηγήτρια στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με την ίδια και την ομάδα της και που με εμπιστεύτηκε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» χρωστάω στους κ. Αντώνιο Γιακουντή, Επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ. και συνεπιβλέπων καθηγητή της εργασίας, και κ. Ηλία Μυλωνή, Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον κ. Γεώργιο Σίμο, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ., για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοχημείας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στην υποψήφια διδάκτωρ κ. Χρύσα Φιλιππούλου, της οποίας η καθοδήγηση σε κάθε βήμα της εργασίας ήταν ιδιαιτέρως πολύτιμη και η οποία έδειξε τεράστια υπομονή μαζί μου. Επίσης ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. που δεν δίστασαν να με βοηθήσουν όποτε χρειαζόταν.

Τέλος, δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω τους φίλους μου αλλά κυρίως την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη και αγάπη τους, δίχως τους οποίους δεν θα κατάφερνα να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
1. Υποξία.....	10
1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες HIF.....	11
1.2 Γονίδια – στόχοι του παράγοντα HIF και καρκίνος.....	12
1.3 Ρύθμιση των παραγόντων HIF .....	15
1.4 Μη O <sub>2</sub> -εξαρτώμενη ρύθμιση του παράγοντα HIF.....	16
2. Σουμοϋλίωση .....	18
2.1 SUMO πρωτεΐνες.....	19
2.2 Ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης - αποσουμοϋλίωσης πρωτεϊνών .....	20
2.3 Σουμοϋλίωση – Ένζυμα E1, E2 και E3 .....	20
2.4 Λυσίνη - Στόχος .....	21
2.5 Αποσουμοϋλίωση – SUMO πρωτεάσες .....	22
2.6 Η σουμοϋλίωση κατά την απόκριση στο κυτταρικό στρες και την υποξία .....	23
3. NFRKB: Nuclear Factor Related to KappaB Binding Protein.....	26
3.1 Χαρακτηριστικά γονιδίου και πρωτεΐνης του NFRKB .....	26
3.2 Λειτουργίες NFRKB.....	27
3.3 Σημασία του NFRKB σε παθολογικές καταστάσεις και στον καρκίνο .....	30
ΣΚΟΠΟΣ .....	34
ΥΛΙΚΑ .....	35
1. Πλασμιδιακοί φορείς .....	35
1.1 pcDNA3.1-HA.....	35
1.2 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB wt .....	35
1.3 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R .....	36
1.4 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R .....	36

1.5 pcDNA GALT RFP.....	37
2. Εκκινητές .....	37
3. Βακτηριακά στελέχη.....	37
4. Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες .....	38
4.1 Υγρό LB .....	38
4.2 Στερεό LB .....	38
5. Κυτταρικές σειρές.....	38
6. Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων .....	38
6.1 DMEM +FBS/+PS.....	38
6.2 DMEM -/-:.....	38
6.3 DMEM +5% FBS/+PS.....	39
7. Αντιβιοτικά .....	39
8. Ένζυμα .....	39
9. Αντισώματα.....	39
10. Χημικά Διαλύματα.....	40
10.1 Διάλυμα PCR.....	40
10.2 Καθαρισμός προϊόντων PCR – Κατακρήμιση με αιθανόλη .....	41
10.3 Ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης .....	41
10.4 Διαλύματα Κυτταροκαλλιιεργειών.....	41
10.5 Διαλύματα Ανοσοκατακρήμισης .....	42
10.6 Διαλύματα Ανοσοαποτύπωσης κατά Western .....	42
10.7 Διαλύματα Έμμεσου Ανοσοφθορισμού .....	43
11. Αντιδραστήρια.....	43
12. Σφαιρίδια σεφαρόζης.....	43
ΜΕΘΟΔΟΙ .....	43
1. Κυτταροκαλλιέργειες HeLa κυττάρων .....	43
1.1 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών σειρών – Κατεργασία κυττάρων με θρυψίνη .....	43

1.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακό DNA με το αντιδραστήριο PEI.....	44
1.3 Επώαση σε συνθήκες υποξίας .....	45
2. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας.....	45
2.1 Δημιουργία μεταλλαγμένου πλασμιδιακού φορέα pcDNA FLAG-HA-NFRKB .....	45
2.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακών φορέων από βακτηριακές καλλιέργειες.....	47
2.3 Έλεγχος ύπαρξης των πλασμιδιακών φορέων με τις επιθυμητές μεταλλάξεις .	48
2.4 Έλεγχος ύπαρξης των μεταλλάξεων στα πλασμίδια pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R.....	50
3. Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών .....	51
3.1 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών.....	51
3.2 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) .....	54
3.3 Ηλεκτρομεταφορά και Ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	56
4. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	58
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
1. Χαρακτηρισμός της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης NFRKB στην υποξία.....	60
1.1 Μελέτη της έκφρασης του NFRKB σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....	60
1.2 Μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού του NFRKB σε νορμοξία και υποξία.....	61
1.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του παράγοντα NFRKB με την HIF-1α υπομονάδα ...	63
2. Μελέτη της σουμοϋλίωσης του παράγοντα NFRKB .....	66
2.1 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης NFRKB οι οποίες στερούνται την ικανότητα σουμοϋλίωσης.....	66
2.2 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών του NFRKB σε νορμοξία και υποξία:	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	76
ΠΗΓΕΣ.....	80

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε συνθήκες υποξίας (χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου) τα κύτταρα ενεργοποιούν το μονοπάτι απόκρισης στην υποξία με σκοπό την επιβίωση τους, το οποίο ενορχηστρώνεται κατά το μεγαλύτερο μέρος του από τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF. Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η σουμοϋλίωση, έχουν αξιοσημείωτη επίδραση στην δράση των HIF αλλά και στην δράση πολλών παραγόντων που εμπλέκονται στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία. Η σουμοϋλίωση είναι η αντιστρεπτή σύζευξη πρωτεϊνών SUMO (**S**mall **U**biquitin-like **M**odifiers) με την πρωτεΐνη-υπόστρωμά τους. Στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης [*Chachami et al, Mol Cell Prot (2019)*] της επίδρασης της υποξίας στην σουμοϋλίωση πρωτεϊνών ξεχώρισε μία ομάδα στόχων, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης ήταν σταθερά στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία, ενώ τα επίπεδα σουμοϋλίωσής τους μεταβάλλονταν. Σε αυτήν την ομάδα πρωτεϊνών ανήκει ο μεταγραφικός ρυθμιστής NFRKB (**N**uclear **F**actor **R**elated to **K**appa-**B**-binding protein), ο οποίος ανιχνεύεται σουμοϋλιωμένος από την πρωτεΐνη SUMO2/3 και του οποίου ο βαθμός σουμοϋλίωσης μειώνεται στην υποξία. Ο NFRKB αποτελεί υπομονάδα του πρωτεϊνικού συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης hINO80. Προκαταρκτικά δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν πιθανή εμπλοκή του στην μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της υποξίας. Ο ρόλος του NFRKB και της σουμοϋλίωσής του στην υποξία σε καρκινικά κύτταρα αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Από τα αποτελέσματά της εργασίας επιβεβαιώθηκε πως η υποξία δεν επιδρά στην έκφραση και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του NFRKB αφού η ενδογενής πρωτεΐνη εμφάνισε σταθερά επίπεδα, όπως και σταθερό ενδοκυττάριο εντοπισμό στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων σε νορμοξία και υποξία. Επίσης δείχθηκε ότι ο NFRKB δεν αλληλεπιδρά άμεσα με την υπομονάδα του παράγοντα HIF-1 δείχνοντας πως ο NFRKB μπορεί να επηρεάζει το μονοπάτι της υποξίας αλλά όχι μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με τον HIF. Με σκοπό την μελέτη της σουμοϋλίωσής του NFRKB δημιουργήθηκαν δύο μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης με μεταλλάξεις σε λυσίνες σε πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης. Περαιτέρω χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που προέκυψαν έδειξε πως οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν επηρέασαν την έκφραση της πρωτεΐνης αφού τα επίπεδα των μεταλλαγμάτων K488R και K1083R που ανιχνεύθηκαν σε κυτταρικά λύματα ήταν παρόμοια σε νορμοξία και υποξία και με αυτά του αγρίου-τύπου. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις δεν φαίνεται να επηρέασαν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό αφού παρέμεινε ίδιος με αυτόν που παρουσίασε ο NFRKB αγρίου-τύπου. Τέλος, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών φάνηκε ότι

και οι δύο λυσίνες K488 και K1083 συμβάλλουν εξίσου στην σουμοϋλίωση του NFRKB. Η διαλεύκανση του ρόλου της σουμοϋλίωσης του NFRKB στην υποξία και των επαγόμενων από την υποξία κυτταρικών γεγονότων θα συνεισφέρει στην κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε καρκινογένεση και στην πιθανή μελλοντική ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων κατά του καρκίνου.



## ABSTRACT

During hypoxia (low oxygen concentration) the cells activate the hypoxia response pathway for their survival, which is orchestrated mostly by HIF transcription factors. Post-translational modifications, such as SUMOylation, have a significant effect on HIF activity while may influence and many other factors involved in the hypoxia response pathway. SUMOylation is the reversible attachment of SUMO (Small Ubiquitin-like Modifiers) proteins to their substrate protein. In a previous study [Chachami et al, *Mol Cell Prot* (2019)] of the effect of hypoxia on the SUMOylation of proteins, a group of targets protein were identified, that even though presented stable expression levels in hypoxia compared to normoxia, their SUMOylation levels were altered. NFRKB (Nuclear Factor Related to Kappa-B-binding protein), was one of those proteins, whose degree of SUMOylation was markedly reduced in hypoxia. NFRKB is one of the subunits of the chromatin remodeling protein complex hINO80. Preliminary data from our laboratory indicate its possible involvement in the transcription of hypoxia target genes. The role of NFRKB and its SUMOylation in hypoxia in cancer cells was the subject of the present diploma thesis.

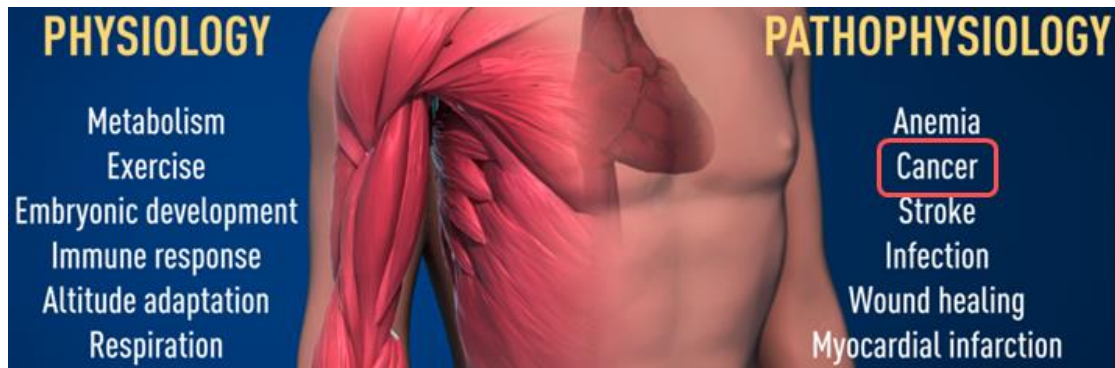
Our results confirmed that hypoxia does not affect the expression and the intracellular localization of NFRKB since the endogenous protein showed stable levels, as well as stable intracellular localization in the nucleus of cancer cells in normoxia and hypoxia. It has also been shown that NFRKB does not interact directly with the  $\alpha$  subunit of HIF-1 factor, indicating that NFRKB may affect the hypoxia pathway but not through direct interaction with HIF. In order to study the SUMOylation of NFRKB, two mutated forms of the protein were generated by mutations in lysine's residues at potential SUMOylation sites. Further characterization of the resulting mutant proteins have showed that these mutations do not affect protein expression as the levels of K488R and K1083R mutants detected in cell lysates were similar in normoxia and hypoxia to those of the wild-type protein. Finally, immunoprecipitation experiments of SUMOylated proteins have showed that both lysines K488 and K1083 contribute equally to the SUMOylation of NFRKB. Elucidating the role of NFRKB SUMOylation in hypoxia and hypoxia-induced cellular events will further help understand the mechanisms leading to carcinogenesis and could putatively lead to the development in the future of novel therapeutic approaches against cancer.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Υποξία

Η εμφάνιση του οξυγόνου ( $O_2$ ) πριν από δύο δισεκατομμύρια χρόνια ως παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης των βακτηρίων αποτέλεσε το καταλυτικό γεγονός στην εξέλιξη των ζωικών οργανισμών (1). Οι ανώτεροι οργανισμοί μέσω του μηχανισμού του αερόβιου μεταβολισμού (γλυκόλυση, κύκλος του κιτρικού οξέος και οξειδωτική φωσφορυλίωση) κατάφεραν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως μία πιο αποδοτική πηγή παραγωγής ενέργειας (2). Καθώς τα επίπεδα του  $O_2$  στο περιβάλλον των οργανισμών πρέπει να παραμένουν σταθερά, εξελικτικά αναπτύχθηκαν ομοιοστατικοί μηχανισμοί που βοηθούν τους οργανισμούς να προσαρμόζονται στις αλλαγές στα επίπεδα του  $O_2$ , σε κυτταρικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο ιστού ή και ολόκληρου του οργανισμού (3). Φυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι το μεγάλο υψόμετρο, η έντονη σωματική άσκηση και η εμβρυογένεση αλλά και παθολογικές όπως είναι ο καρκίνος οδηγούν σε μείωση του παρεχόμενου οξυγόνου (Εικόνα 1). Ειδικότερα, στον καρκίνο αναπτύσσεται υποξικό περιβάλλον λόγω του έντονου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων αλλά και λόγω των παραπροϊόντων του αναερόβιου μεταβολισμού που κυριαρχεί σε αυτά. Στις καταστάσεις αυτές προωθούνται διαδικασίες όπως είναι η αγγειοδιαστολή, η ερυθροποίηση, η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση), η προώθηση του αναερόβιου μεταβολισμού και της παραγωγής γαλακτικού οξέος (4-6). Οι διεργασίες αυτές προάγουν την προσαρμογή των μυϊκών κυττάρων στην έλλειψη των θρεπτικών κατά την άσκηση, την ανάπτυξη του πλακούντα κατά την εμβρυογένεση, την κυτταρική και ιστική προσαρμογή στις χαμηλές συνθήκες οξυγόνου και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (7).

Το μεγαλύτερο μέρος των προσαρμοστικών αλλαγών που συμβαίνουν στο κύτταρο στην υποξία ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι παράγοντες HIF σχηματίζουν ετεροδιμερή ( $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδα) σε συνθήκες έλλειψης  $O_2$  προάγοντας την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (8, 9).



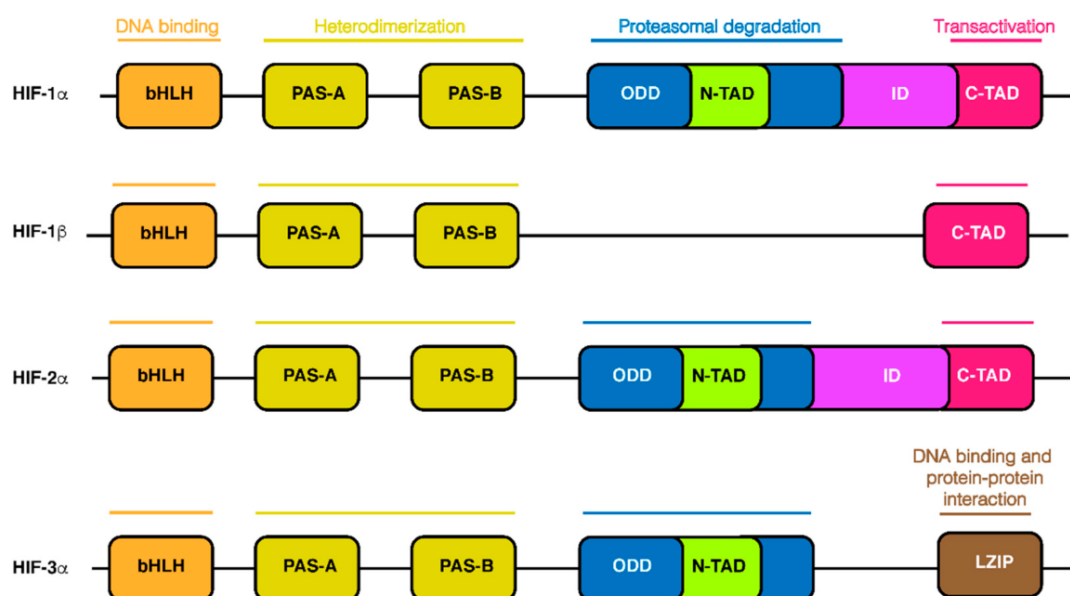
Εικόνα 1. Ο μηχανισμός απόκρισης στην υποξία συμμετέχει σε φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού όπως είναι η σωματική άσκηση αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος. Πηγή: (7)

### 1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF έχουν καθοριστικό ρόλο στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Έως σήμερα έχουν βρεθεί 4 μέλη της οικογένειας των παραγόντων HIF (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α και HIF-1β) (Εικόνα 2). Οι O<sub>2</sub>-εξαρτώμενες α υπομονάδες (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) διμερίζονται με την ανεξάρτητη του O<sub>2</sub> β υπομονάδα (HIF1β ή ARNT: **A**ryl **H**ydrocarbon **R**eceptor **N**uclear **T**ranslocator) σχηματίζοντας τα HIF-1, HIF-2 και HIF-3 ετεροδιμερή (10). Όλες οι υπομονάδες περιέχουν στο αμινο-τελικό άκρο τους την περιοχή HLH (**H**elix-**L**oop-**H**elix), που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση του παράγοντα HIF με το DNA σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE: **H**ypoxia **R**elated **E**lements) και τις περιοχές PAS-A και PAS-B, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό των α και β υπομονάδων (11). Σε όλες τις α υπομονάδες εμφανίζεται και μία αλληλουχία σχετική με την O<sub>2</sub>-εξαρτώμενη υδροξυλίωσή της και την επικείμενη αποικοδόμηση της α υπομονάδας του HIF παράγοντα, η οποία ονομάζεται ODD (**O**xxygen **D**ependent **D**egradation **D**omain). Η ODD περιοχή απουσιάζει από την β υπομονάδα, γι' αυτό και η έκφραση του HIF-1β δεν ελέγχεται από τα επίπεδα του O<sub>2</sub> (12).

Οι HIF-1α και HIF-2α υπομονάδες περιέχουν δύο περιοχές TAD (**T**ransactivation **D**omain), την N-TAD και την C-TAD, οι οποίες έχουν ρόλο στην σύνδεση με άλλους συμπαραγόντες μεταγραφής όπως ο CBP/p300 και γενικά έχουν ρόλο στην ενεργότητα των HIF υπομονάδων (13, 14). Η HIF-3α υπομονάδα στερείται την N-TAD περιοχή και στην θέση της έχει την περιοχή LZIP (**L**eucine **Z**ipper), η οποία είναι υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (15, 16). Ενδιάμεσα των δύο TAD περιοχών βρίσκεται η πεπτιδική αλληλουχία ID (**I**nhibitory

Domain), η οποία έχει ρόλο στην αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α (13).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των πεπτιδικών περιοχών των υπομονάδων του παράγοντα HIF: 1α, 1β, 2α και 3α. Πηγή: (12)

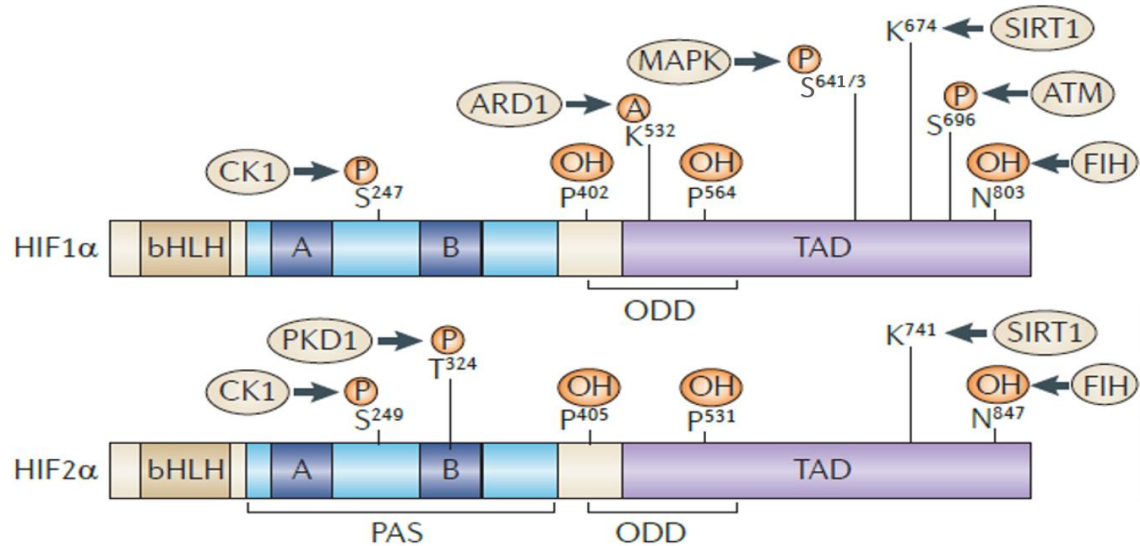
Παρ' όλο που οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην δομή τους, έχουν μεγάλες διαφορές στην έκφραση και τον λειτουργικό ρόλο τους (12). Πιο συγκεκριμένα, ενώ η 1α υπομονάδα είναι «πανταχού παρούσα» σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, η 2α υπομονάδα έχει εντοπιστεί μόνο σε συγκεκριμένους (17). Επίσης έχει δειχθεί ότι η 2α υπομονάδα συμμετέχει πιο ενεργά στην έκφραση του γονιδίου EPO, στον μεταβολισμό του σιδήρου αλλά και παίζει ρόλο στο νεφρικό καρκίνωμα (18-20). Τέλος, το γονίδιο της 3α υπομονάδας φαίνεται να παράγει πολλά διαφορετικά μεταγράφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος, το οποίο μοιάζει να επάγεται από την δράση της 1α υπομονάδας και όχι της 2α. Οι ισομορφές της HIF-3α υπομονάδας που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα φαίνεται ότι αναστέλλουν την δράση των HIF-1α και HIF-2α (21).

## 1.2 Γονίδια – στόχοι του παράγοντα HIF και καρκίνος

Τα γονίδια-στόχοι των παραγόντων HIF-1α και HIF-2α μπορεί να είναι κοινά αλλά μπορεί και να είναι ειδικά για κάθε υπομονάδα. Για παράδειγμα, η HIF-1α υπομονάδα φαίνεται να επάγει κατά το μεγαλύτερο μέρος τους την έκφραση πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση, ενώ αντίθετα η HIF-2α υπομονάδα έχει συσχετισθεί περισσότερο με την

έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Oct4, ρυθμίζοντας έτσι την πολυδυναμία των κυττάρων (22).

Αυτή η εξειδίκευση ως προς του στόχους φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω διαφορών στις περιοχές N-TAD και μέσω διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Εικόνα 3).

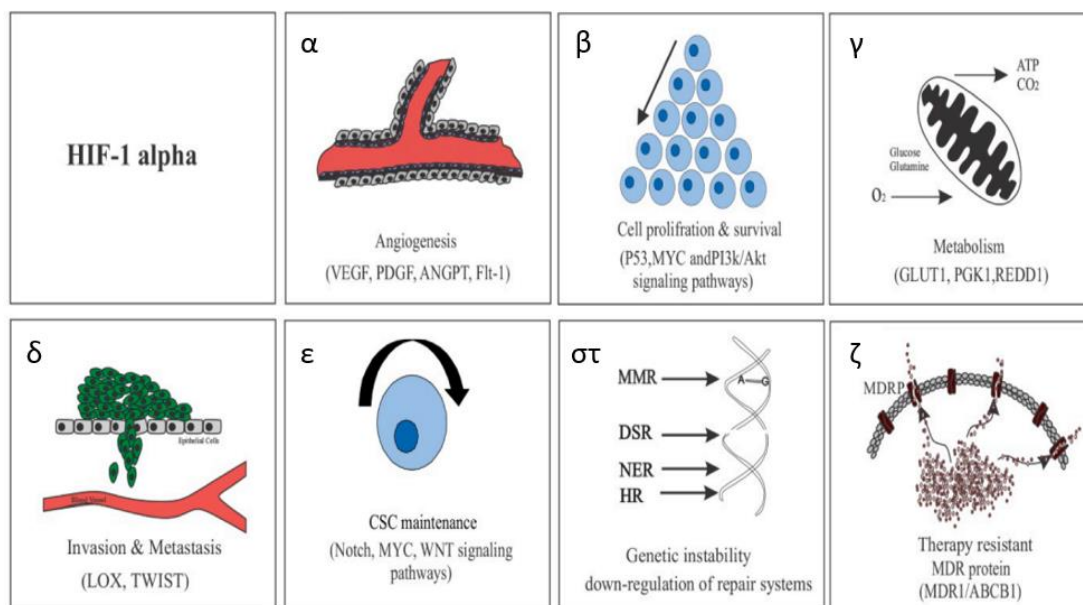


Εικόνα 3. Απεικόνιση των κύριων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υπόκειται κάθε HIF-α υπομονάδα, καθώς και των ενζύμων που τις επιτελούν. Παρουσιάζονται συνοπτικά οι φωσφορυλιώσεις (P), οι υδροξυλιώσεις (OH) και οι ακετυλιώσεις (A) σε κάθε υπομονάδα από τα ένζυμα CK1 (Casein Kinase 1), PDK1 (Protein Kinase D1), ARD1 (Arrest Defective 1), MAPK (Mitosis Associated Protein Kinase), SIRT1 (Sirtuin 1), ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) και FIH (Factor Inhibiting HIF). Πηγή: (8) (Τροποποιημένη)

Επίσης, η διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα των HIF-α υπομονάδων μπορεί να ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής, της μετάφρασης ή και της πρωτεϊνικής τους σταθερότητας. Ένας σημαντικός ρυθμιστής των διαφορετικών πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF αποτελεί το ίδιο το O<sub>2</sub>. Σε συγκέντρωση 2-5% O<sub>2</sub> φαίνεται να σταθεροποιούνται καλύτερα τα επίπεδα της HIF-2α υπομονάδας, ενώ σε συγκέντρωση 0-2% O<sub>2</sub> τα επίπεδα της HIF-1α υπομονάδας (23, 24).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, στόχοι των παραγόντων HIF αποτελούν γονίδια, των οποίων η έκφραση αποσκοπεί στην επιβίωση του κυττάρου/ιστού/οργανισμού σε συνθήκες υποξίας. Η επαγωγή της έκφρασης αυτών των γονιδίων όμως ευνοεί και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων υπό την έλλειψη O<sub>2</sub>. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος που αναπτύσσεται γύρω από έναν όγκο είναι τα χαμηλά επίπεδα του O<sub>2</sub>, τα οποία προκύπτουν από τον έντονο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ατελή αγγειογένεση (25). Είναι γνωστό πλέον ότι πολλά από τα γονίδια-στόχοι της HIF-1α

υπομονάδας συσχετίζονται με σημαντικές διαδικασίες για την επιβίωση σε υποξία και την ανάπτυξη του όγκου, όπως είναι η αγγειογένεση, η αλλαγή του μεταβολισμού, ο «ανεξέλεγκτος» κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετάσταση και η αστάθεια του γονιδιώματος (26) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Γονίδια – στόχοι της HIF1α υπομονάδας που σχετίζονται με φαινοτυπικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. α) Η HIF -1α υπομονάδα αυξάνει τα επίπεδα των γονιδίων VEGF, PDGF, ANGPT και Flt-1 επάγοντας την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). β) Η HIF -1α υπομονάδα αλληλεπιδρά με τα μονοπάτια P53, MYC και PI3K/Akt συμβάλλοντας στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. γ) Η HIF -1α υπομονάδα ρυθμίζει τα επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλυκόζης (π.χ. GLUT1, PGK1 και REDD1) επηρεάζοντας την είσοδο της γλυκόζης στο κύτταρο και των μεταβολικών μονοπατιών. δ) Η HIF -1α υπομονάδα αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών LOX και TWIST συμμετέχοντας έτσι στην επαγωγή της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT). ε) Η HIF -1α υπομονάδα προωθεί την διατήρηση της πολυδυναμίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω της επαγωγής της έκφρασής της από τα Notch, MYC και WNT μονοπάτια. στ) Η HIF -1α υπομονάδα οδηγεί σε υπορρύθμιση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA οδηγώντας σε γενωμική αστάθεια. ζ) Η HIF -1α υπομονάδα προκαλεί την υπερέκφραση της πρωτεΐνης MDRP οδηγώντας σε αντίσταση σε αντικαρκινικά φάρμακα. Πηγή: (27)

Ενδεικτικά, ο παράγοντας HIF-1 συμμετέχει στην αλλαγή του μεταβολισμού από αερόβιο σε αναερόβιο (metabolic switch). Ο HIF-1 αυξάνει τα επίπεδα γλυκολυτικών ενζύμων, όπως είναι τα ισoenζυμα της πυροσταφυλικής κινάσης M1 και M2, και τα επίπεδα των μεταφορέων της γλυκόζης στο κύτταρο (GLUT1 και GLUT3), με σκοπό να ενισχύσει την γλυκόλυση. Ταυτόχρονα, κατά την υποξία λόγω έλλειψης οξυγόνου αναστέλλεται ο κύκλος του κιτρικού

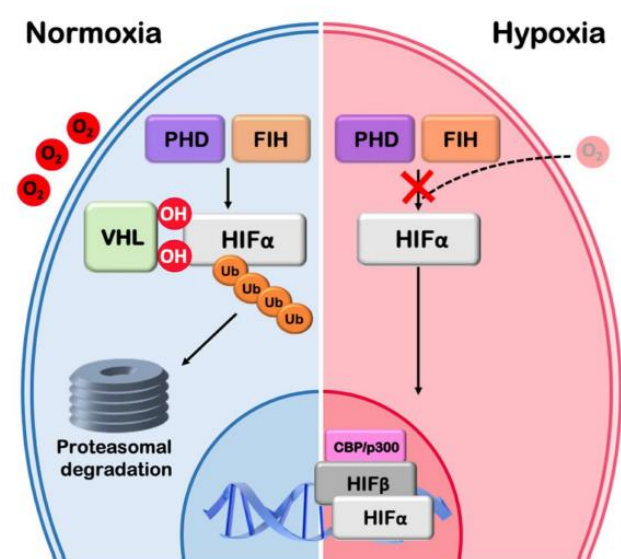
οξέος και η επακόλουθη οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μέσω της επαγόμενης από τον HIF-1 αυξημένης έκφρασης της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDK) αναστέλλεται η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος και κατά συνέπεια η μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA (27) (Εικόνα 3γ). Το πυροσταφυλικό οξύ διοχετεύεται προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος που είναι απαραίτητο για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και για το μικροπεριβάλλον του όγκου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα της συμβολής των παραγόντων HIF στην μοριακή ογκογένεση είναι η συμμετοχή του στην αγγειογένεση, διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων διότι μέσω των νεοσυντιθέμενων αιμοφόρων αγγείων τους παρέχονται τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Ένα από τα σημαντικότερα γονίδια-στόχοι του παράγοντα HIF είναι το γονίδιο του VEGF (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor), του οποίου η παραγόμενη πρωτεΐνη στρατολογεί επιθηλιακά κύτταρα από τα κοντινότερα αιμοφόρα αγγεία ώστε να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν νέα αγγεία. Ταυτόχρονα, οι παράγοντες HIF επάγουν την έκφραση κι άλλων γονιδίων, όπως είναι το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), το γονίδιο της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), της ενδοθηλίνης 1 (ET1) και της αδρενομεδουλίνης (ADM). Επίσης ο παράγοντας HIF επάγει την έκφραση και της ερυθροποιητίνης (EPO) ενισχύοντας της διαδικασία της παραγωγής ερυθροκυττάρων από τον μυελό των οστών (ερυθροποίηση) (28).

### 1.3 Ρύθμιση των παραγόντων HIF

Σε συνθήκες νορμοξίας (φυσιολογικά επίπεδα  $O_2$ ) η υπομονάδα HIF $\alpha$  υδροξυλιώνεται από την  $O_2$ -εξαρτώμενη πρόλυλο- υδροξυλάση PHD2 (**p**rolyl **h**ydroxylase **d**omain **p**rotein **2**) σε δύο συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης (P402 και P564) στην περιοχή ODD (29). Τα υδροξύλια αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη pVHL (**p**rotein **V**on **H**ippel-Lindau), η οποία προσελκύει κι άλλες πρωτεΐνες που οργανώνουν το σύμπλεγμα της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η υπομονάδα HIF- $\alpha$  ουβικιτινιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Εικόνα 5) Μία ακόμα  $O_2$ -εξαρτώμενη αντίδραση που συμβαίνει στην νορμοξία είναι η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης της HIF $\alpha$  υπομονάδας από την υδροξυλάση ασπαραγίνης FIH (**f**actor **i**nhibiting **H**IF). Η υδροξυλίωση αυτή εμποδίζει την σύζευξη της HIF $\alpha$  υπομονάδας με τους συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής CBP/p300, οδηγώντας στην αναστολή της δράσης της (30) (Εικόνα 5 - αριστερά).

Σε συνθήκες έλλειψης  $O_2$ , οι  $O_2$ -εξαρτώμενες υδροξυλάσες PHD2 και FIH αδυνατούν να υδροξυλιώσουν την υπομονάδα HIF- $\alpha$  καθώς χρειάζονται μοριακό οξυγόνο  $O_2$  για την δράση

τους, με αποτέλεσμα η τελευταία να διαφεύγει της αποικοδόμησης και να είναι ελεύθερη πλέον να μπει στον πυρήνα του κυττάρου και να σχηματίσει το ετεροδιμερές με την υπομονάδα HIF-β (31). Στην συνέχεια ο ενεργός πια παράγοντας HIF μπορεί να συζευχθεί με τους συν-ενεργοποιητές CBP/p300, ενεργοποιώντας την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του, μέσω της δέσμευσής του στις αλληλουχίες HRE (Hypoxia Response Elements) που βρίσκονται στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων αυτών (32, 33) (Εικόνα 2-δεξιά).



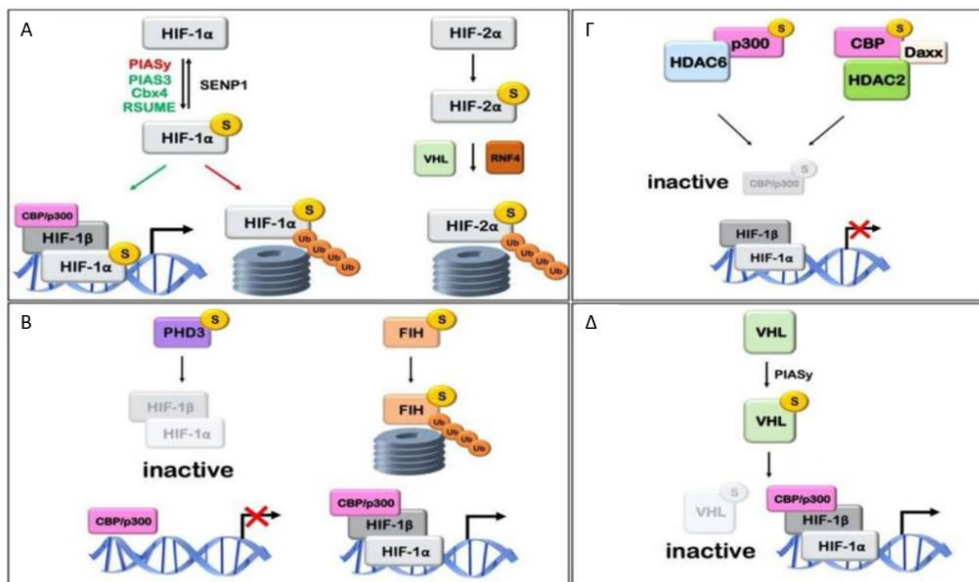
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία από το οξυγόνο σε συνθήκες νορμοξίας (αριστερά) και υποξίας (δεξιά). Πηγή: (31)

#### 1.4 Μη O<sub>2</sub>-εξαρτώμενη ρύθμιση του παράγοντα HIF

Οι παράγοντες HIF ρυθμίζονται και με άλλους μηχανισμούς, οι οποίοι δεν εξαρτώνται από τα χαμηλά επίπεδα του οξυγόνου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και φαίνεται και στην Εικόνα 3, οι HIF-α υπομονάδες μπορούν να δεχθούν κι άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δεν σχετίζονται με το O<sub>2</sub>-εξαρτώμενο μονοπάτι, όπως είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η σουμοϋλίωση, η S-νιτροσυλίωση κ.α. (8). Ενδεικτικά, έχει δειχθεί ότι όταν η HIF-α υπομονάδα φωσφορυλιωθεί από το ένζυμο p42/44 MAPK ενισχύεται η μεταγραφική της δραστηριότητα χωρίς να παρατηρείται αλλαγή στην σταθερότητά της ή/και στην ικανότητα δέσμευσής στο DNA (34). Επίσης η S-νιτροσυλίωση



στο κατάλοιπο κυστεΐνης C800 της HIF-1α υπομονάδας φαίνεται να οδηγεί στην αύξηση της συνεργατικής δραστηριότητάς της με τους συνενεργοποιητές της CBP/p300 (35). Τα δεδομένα είναι αρκετά αντιθετικά όσον αφορά τον ρόλο της ακετυλίωσης του HIF-1α. Όσον αφορά την σουμοϋλίωση, έχει δειχθεί ότι η HIF-1α υπομονάδα σουμοϋλιώνεται στις θέσεις K391 και K477 ενώ η υπομονάδα HIF-2α στην θέση K394, χωρίς να είναι ξεκάθαρη η επίδρασή της: τα δεδομένα του Cheng και των συνεργατών του υποδεικνύουν ότι με την σουμοϋλίωση μειώνεται η σταθερότητα της HIF1α υπομονάδας μέσω της ανεξάρτητης από την pVHL αποικοδόμησής της (36). Άλλα δεδομένα δείχνουν ότι η σουμοϋλίωση φαίνεται να σταθεροποιεί την HIF1α υπομονάδα (37, 38) ενώ τα δεδομένα της τρίτης ερευνητικής ομάδας υποστηρίζουν ότι η σουμοϋλίωση δεν επηρεάζει τα επίπεδα της HIF-1α υπομονάδας αλλά την μεταγραφική της δραστηριότητα (39). Όσον αφορά την περίπτωση της σουμοϋλίωσης της HIF-2α υπομονάδας τα δεδομένα δείχνουν ότι οδηγεί σε αύξηση της ουβικιτίνωσής της από την pVHL και κατά συνέπεια στην αύξηση της αποικοδόμησής από το πρωτεάσωμα, ενώ η σουμοϋλίωση της HIF-1β υπομονάδας οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφικής της ικανότητας (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της σουμοϋλίωσης σε μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία. Α) Η σουμοϋλίωση της HIF-1α υπομονάδας οδηγεί στην αυξημένη μεταγραφική της δραστηριότητα και στην μειωμένη αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα, ενώ αντίστροφα η σουμοϋλίωση της HIF-2α υπομονάδας οδηγεί στην αυξημένη αποικοδόμησή της. Β) Η σουμοϋλίωση της PHD3 αναστέλλει την μεταγραφική δράση του HIF-1 παράγοντα, ενώ η σουμοϋλίωση της FIH οδηγεί στην αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα και στην επακόλουθη αυξημένη δράση

του παράγοντα HIF με τους συνενεργοποιητές CBP/p300. Γ) Η σουμοϋλίωση των συνενεργοποιητών CBP/p300 οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφικής δράσης του παράγοντα HIF-1 λόγω της αδυναμίας του να σχηματίσει τα κατάλληλα μεταγραφικά σύμπλοκα. Δ) Η σουμοϋλίωση της pVHL αναστέλλει την δράση της κι έτσι η υπομονάδα HIF-1α διαφεύγει την αποικοδόμηση και σταθεροποιείται, οδηγώντας στην έκφραση των γονιδίων-στόχων της. Πηγή: (31)

Η μελέτη της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας και παραγόντων του μηχανισμού της υποξίας αποτελεί κύρια ερευνητική γραμμή στο Εργαστήριο της Βιοχημείας στο Τμήμα Ιατρικής Π. Θ. και αποτελεί και βασικό κομμάτι της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

## 2. Σουμοϋλίωση

Η σουμοϋλίωση είναι μία αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, κατά την οποία πραγματοποιείται η σύζευξη της SUMO πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη-στόχο μέσω του σχηματισμού ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ ενός καταλοίπου γλυκίνης της SUMO πρωτεΐνης με ένα κατάλοιπο λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου (40).

Από το 1995 που έγινε η πρώτη αναφορά στις SUMO πρωτεΐνες από τους Meluh και Koshland (41) η σουμοϋλίωση έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς φαίνεται να επηρεάζει την ρύθμιση πρωτεϊνών με σημαντική κλινική σημασία υποδεικνύοντας έτσι την σημασία της σε διάφορες ασθένειες όπως είναι διάφορες μορφές καρκίνου, καρδιακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές νόσοι (νόσος του Huntington, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer) (42). Η σουμοϋλίωση αποτελεί ρυθμιστή της λειτουργίας των πρωτεϊνών επιδρώντας στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και την σταθερότητα του ενδοκυττάριου εντοπισμού τους επηρεάζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η επιδιόρθωση βλαβών του DNA, η επεξεργασία του RNA και η ρύθμιση της κυτταρικής ταυτότητας. Οι SUMO πρωτεΐνες έχει αποδεχθεί ότι είναι πολύ σημαντικές για την ομαλή λειτουργία των οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η SUMO1 πρωτεΐνη επιβιώνουν μεν αλλά παρουσιάζουν έναν πολύ επιβαρυσμένο φαινότυπο (43). Ποντίκια knockout για την SUMO2 πρωτεΐνη εμφάνισαν σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα και θνησιμότητα με αποτέλεσμα να χαρακτηριστούν μη βιώσιμα, ενώ, αντίστοιχα, ποντίκια knockout για την SUMO3 πρωτεΐνη δεν παρουσίασαν αλλαγές στον φαινότυπο. Επιπλέον, αποσιώπηση των AtSUMO1 και -2 πρωτεϊνών (ορθόλογα με τα ανθρώπινα γονίδια των SUMO2/3 πρωτεϊνών) στο φυτό *Arabidopsis thaliana* οδηγεί σε θάνατο σε εμβρυικό στάδιο (44).

## 2.1 SUMO πρωτεΐνες

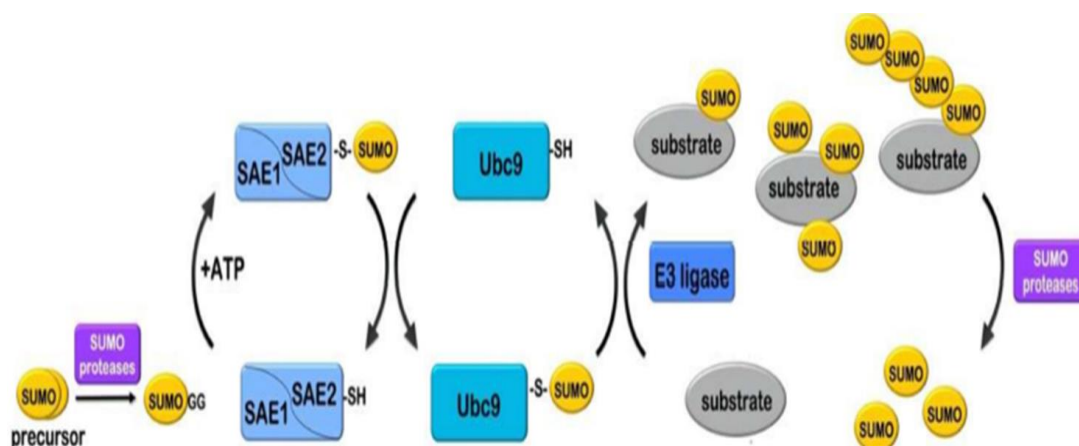
Οι SUMO πρωτεΐνες (**S**mall **U**biquitin-related **M**odifiers) ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που ομοιάζουν με την ουβικιτίνη (Ubls: Ubiquitin-like proteins) και απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Παρ' όλο που η ομοιότητα στην πεπτιδική αλληλουχία της SUMO1 πρωτεΐνης και της ουβικιτίνης είναι μόλις 18% η τρισδιάστατη δομή τους είναι παρόμοια, με την δομή των β-πτυχωτών φύλλων γύρω από την α-έλικα και το χαρακτηριστικό μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης να είναι διατηρημένα (40). Οι SUMO πρωτεΐνες περιέχουν το μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης, το οποίο εκτίθεται μετά την πρωτεολυτική ωρίμανση της SUMO πρωτεΐνης (45), στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους και ένα εύκαμπτο αμινο-τελικό άκρο (20αα), το οποίο χρησιμεύει στον σχηματισμό SUMO αλυσίδων. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί 5 ισομορφές της πρωτεΐνης SUMO (SUMO1, 2/3, 4 και 5). Οι πρωτεΐνες SUMO2 και 3, παρ' όλο που εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια αναφέρονται ως μία πρωτεΐνη SUMO2/3 καθώς η πεπτιδική αλληλουχία τους διαφέρει μόνο σε 3 κατάλοιπα αμινοξέων (97% ομοιότητα) καθιστώντας αδύνατο τον διαχωρισμό τους με αντισώματα (46). Η πρωτεΐνη SUMO2/3 ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα και κατά μεγάλο μέρος της ασύζευκτη με κάποιο υπόστρωμα σε όλους τους ιστούς του οργανισμού (46). Η SUMO2/3 έχει την δυνατότητα δημιουργίας αλυσίδων SUMO και φαίνεται να έχει ρόλο σε μονοπάτια απόκρισης στο κυτταρικό στρες, με την υπερθερμία να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα (46-48).

Η πρωτεΐνη SUMO1 έχει 47% ομοιότητα με τις πρωτεΐνες SUMO2/3 στην πεπτιδική τους αλληλουχία και εντοπίζεται επίσης σε όλους τους ιστούς (49). Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες SUMO2/3 η πρωτεΐνη SUMO1 ανιχνεύεται σε μικρότερες ποσότητες και συνήθως στο σύνολό της είναι συζευγμένη με κάποιο υπόστρωμα (50). Τα περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι δεν συμμετέχει στη δημιουργία αλυσίδων SUMO, πέραν ίσως του ρόλου της ως τον τελευταίο μόριο SUMO της αλυσίδας, το οποίο εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυσή της (49).

Οι πρωτεΐνες SUMO4 και 5 απαντώνται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη SUMO4 έχει 87% ομοιότητα με την πρωτεΐνη SUMO2/3 και χαρακτηριστικό της είναι ότι περιέχει το κατάλοιπο αμινοξέος Pro90 (αντί γλουταμίνης) σε θέση όπου εμποδίζει την πρωτεολυτική της ωρίμανση από τις γνωστές SUMO πρωτεάσες (51). Για την πρωτεΐνη SUMO5 δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα πέρα από την συσχέτισή του με τα πυρηνικά σωματίδια PML, τα οποία σχετίζονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις (52).

## 2.2 Ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης - αποσουμοϋλίωσης πρωτεϊνών

Όπως συμβαίνει και κατά την ουβικιτίνωση, ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης και αποσουμοϋλίωσης ενορχηστρώνεται από ειδικά E1, E2 και E3 ένζυμα σουμοϋλίωσης καθώς και από ειδικές για τις SUMO πρωτεάσες (SUMO ισοπεπτιδάσες) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ο κύκλος της (απο)σουμοϋλίωσης. Η πρωτεΐνη SUMO ωριμάζει μέσω πρωτεόλυσης από μία SUMO ισοπεπτιδάση, ώστε να αποκαλυφθεί το μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Η ώριμη πλέον SUMO πρωτεΐνη ενεργοποιείται μέσω του σχηματισμού ενός θειοεστερικού δεσμού με το E1 ένζυμο (SAE1/SAE2) που πραγματοποιείται από το ίδιο το ένζυμο με ATP-εξαρτώμενο τρόπο. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη SUMO στην συνέχεια μεταφέρεται στο E2 ένζυμο (Ubc9), με το οποίο σχηματίζει και πάλι έναν θειοεστερικό δεσμό με την καταλυτική κυστεΐνη του ενζύμου. Τέλος, το E2 ένζυμο σε συνεργασία τις περισσότερες φορές με μία E3 λιγάση καταλύει τον σχηματισμό του ισοπεπτιδικού δεσμού της γλυκίνης της SUMO πρωτεΐνης με την λυσίνη της πρωτεΐνης-στόχου. Από αυτήν την διαδικασία μπορούν να προκύψουν πρωτεΐνες με μία SUMO πρωτεΐνη, πολυσουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες σε διαφορετικές θέσεις σουμοϋλίωσης ή και πρωτεΐνες με αλυσίδες SUMO. Οι πρωτεΐνες SUMO μπορούν να απομακρυνθούν με SUMO ισοπεπτιδάσες. Πηγή: (31)

## 2.3 Σουμοϋλίωση – Ένζυμα E1, E2 και E3

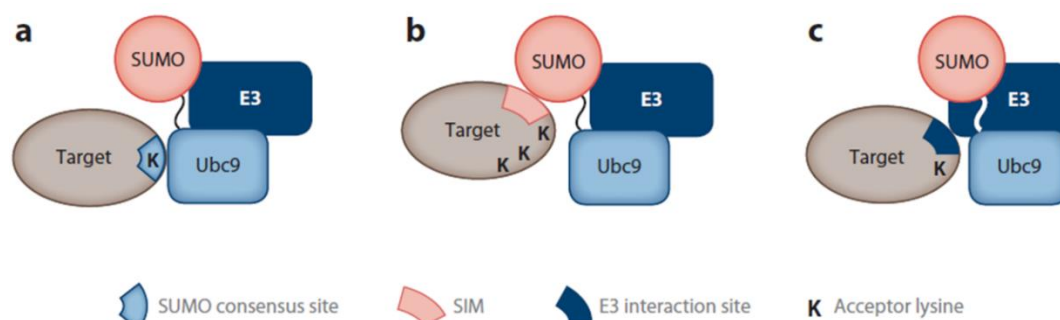
Μετά την ωρίμανση της SUMO πρωτεΐνης από ειδικές SUMO-ισοπεπτιδάσες ακολουθεί η ενεργοποίησή της από το E1 ένζυμο. Το E1 ένζυμο στα θηλαστικά είναι ένα διμερές, το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις SAE1 και SAE2 (SUMO-Activating Enzyme) (53). Κατά την ενεργοποίηση αυτήν, το E1 ένζυμο σχηματίζει έναν θειοεστερικό δεσμό με την SUMO πρωτεΐνη, ο οποίος προκύπτει με ATP-εξαρτώμενο τρόπο, και σχηματίζεται μεταξύ ενός καταλοίπου γλυκίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της SUMO πρωτεΐνης και της καταλυτικής κυστεΐνης της υπομονάδας SAE2 (54).

Στην συνέχεια η πρωτεΐνη SUMO μεταφέρεται στο E2 ένζυμο μέσω σχηματισμού νέου θειοεστερικού δεσμού αυτήν την φορά με την καταλυτική κυστεΐνη του E2 ενζύμου (55, 56). Έχει βρεθεί μόνο μία πρωτεΐνη που επιτελεί τον ρόλο του E2 ενζύμου και αυτήν είναι η Ubc9 πρωτεΐνη. Χωρίς αυτήν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί κανενός τύπου σουμοϋλίωσης, αφού η Ubc9 είναι υπεύθυνη για την σουμοϋλίωση από όλες τις ισομορφές της SUMO πρωτεΐνης (31). Έπειτα από την μεταφορά το E2 ένζυμο καταλύει τον σχηματισμό του ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ της γλυκίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης SUMO και της λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Σύμφωνα με τα περισσότερα δεδομένα, η επιλογή του υποστρώματος φαίνεται να πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από την Ubc9. Πιο συγκεκριμένα, η Ubc9 αναγνωρίζει τα υποστρώματα μέσω των συναινετικών μοτίβων και λόγω της συνήθως χαμηλής συγγένειας που έχει με αυτά επιστρατεύεται και μία E3 λιγάση (57).

Ο ρόλος της E3 λιγάσης είναι είτε να σταθεροποιήσει τον θειοεστερικό δεσμό μεταξύ Ubc9 και SUMO πρωτεΐνης είτε να προσανατολίσει σωστά την Ubc9 ως προς την πρωτεΐνη-υπόστρωμα (58). Βασική διαφορά των E3 λιγάσεων στην σουμοϋλίωση με τις E3 λιγάσες στην ουβικιτίνωση είναι ότι οι E3 λιγάσες στην σουμοϋλίωση δεν έρχονται σε άμεση σύνδεση με τις πρωτεΐνες SUMO.

## 2.4 Λυσίνη - Στόχος

Για την επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου υπεύθυνα είναι τα ένζυμα Ubc9 και μία E3 λιγάση, όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Η διαδικασία αυτή αλλά και η επιλογή της λυσίνης-στόχου που πρόκειται να σουμοϋλιωθεί πραγματοποιείται μέσω τριών μηχανισμών (40) (Εικόνα 8):



Εικόνα 8. Μηχανισμοί επιλογής της λυσίνης-στόχου: α) η Ubc9 αναγνωρίζει το συναινετικό μοτίβο σουμοϋλίωσης και η λυσίνη-στόχος βρίσκεται εσωτερικά του μοτίβου, β) το σύμπλοκο Ubc9-SUMO αναγνωρίζει το μοτίβο SIM και σουμοϋλιώνεται ένα ή περισσότερα κατάλοιπα λυσίνης δίπλα από αυτό και γ) η E3 λιγάση αναγνωρίζει κάποιο μοτίβο στο υπόστρωμα και σουμοϋλιώνεται η κοντινή λυσίνη-στόχος. Πηγή: (40)

#### A) Σουμοϋλίωση μέσω συναινετικού μοτίβου

Περίπου το 50% των πρωτεϊνών-στόχων περιέχουν ένα συναινετικό μοτίβο σουμοϋλίωσης (59). Τα συναινετικά μοτίβα σουμοϋλίωσης αναγνωρίζονται κυρίως από την Ubc9. Το πιο κοινό μοτίβο σουμοϋλίωσης είναι το ψΚΧΕ/D, όπου ψ είναι ένα μεγάλο αλειφατικό αμινοξύ, Κ είναι η λυσίνη-στόχος, Χ είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ, D είναι το γλουταμινικό οξύ και Ε είναι το ασπαραγινικό οξύ (31).

#### B) Σουμοϋλίωση εξαρτώμενη από το μοτίβο SIM

Το μοτίβο SIM (SUMO Interacting Motif) είναι ένα άλλο μοτίβο που αναγνωρίζεται και αλληλεπιδρά μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών με την SUMO πρωτεΐνη και στην συνέχεια σουμοϋλιώνεται ένα ή περισσότερα κατάλοιπα λυσίνης, τα οποία βρίσκονται εξωτερικά αλλά κοντά στο μοτίβο. Μέσω αυτού του μηχανισμού προκύπτουν οι περισσότερες πολυσουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι είναι συζευγμένες κυρίως με την πρωτεΐνη SUMO2/3 (40).

#### Γ) Σουμοϋλίωση εξαρτώμενη από την E3 λιγάση

Στην περίπτωση αυτή η σουμοϋλίωση απαιτεί την παρουσία ενός E3 ενζύμου. Ο ρόλος της E3 λιγάσης είναι να αναγνωρίσει ειδική αλληλουχία στην πρωτεΐνη-στόχο και να προσανατολίσει το σύμπλοκο σωστά (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) (40). Ενδιαφέρον έχει ότι αυτός ο μηχανισμός έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις υποστρωμάτων, τα οποία περιέχουν συναινετικό μοτίβο σουμοϋλίωσης αλλά παρ' όλα αυτά δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης που περιγράφηκε παραπάνω πιθανόν λόγω της χαμηλής συγγένειας της Ubc9 με το υπόστρωμα (60-62).

### 2.5 Αποσουμοϋλίωση – SUMO πρωτεάσες

Οι δύο κύριοι ρόλοι των SUMO πρωτεασών είναι η ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών, μέσω της υδρόλυσης ενός κομματιού στο καρβοξυ-τελικό άκρο της SUMO πρωτεΐνης ώστε να

αποκαλυφθεί το μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης, και η απομάκρυνση των SUMO πρωτεϊνών από τις πρωτεΐνες-υποστρώματα (40) ή από αλυσίδες poly-SUMO. Όλες οι SUMO πρωτεάσες που έχουν βρεθεί είναι πρωτεάσες κυστεΐνης και χωρίζονται σε 3 κατηγορίες. Η πρώτη και μεγαλύτερη κατηγορία είναι η οικογένεια Ulp/SENp πρωτεασών. Ulp πρωτεάσες (ubiquitin-like proteases) ονομάστηκαν οι πρώτες SUMO πρωτεάσες που βρέθηκαν στην ζύμη (Ulp1, Ulp2). Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 6 μέλη που ανήκουν στην οικογένεια Ulp/SENp πρωτεασών: η SENP1, 2, 3, 5, 6 και 7 (senp1-specific proteases) (40). Από αυτές η SENP1, 2, 3 και 5 φαίνεται ότι είναι υπεύθυνες για την ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών (50). Η δεύτερη κατηγορία των SUMO πρωτεασών αποτελείται από δύο μέλη: την DeSI-1 και την DeSI-2 πρωτεάση (DeSUMOylating Isopeptidases) (63). Τέλος η πρωτεΐνη USPL1, η οποία ανήκει στην οικογένεια USP (ubiquitin specific peptidases), φάνηκε ότι προτιμά την πέψη των SUMO πρωτεϊνών παρά της ουβικιτίνης και γι' αυτό χαρακτηρίστηκε ως SUMO πρωτεάση και αποτελεί την Τρίτη κατηγορία των SUMO πρωτεασών (64).

Ο αριθμός των SUMO πρωτεασών που έχουν χαρακτηριστεί είναι αρκετά μικρός σε σύγκριση με την πληθώρα των υποστρωμάτων στα οποία δρουν χωρίς να είναι πλήρως γνωστός ο τρόπος που επιλέγουν το υπόστρωμά τους. Στην ειδίκευση των υποστρωμάτων τους μεγάλο ρόλο φαίνεται να έχει ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των SUMO πρωτεασών. Πιο συγκεκριμένα, ο εντοπισμός των SENP πρωτεασών φαίνεται να ρυθμίζεται από τις πεπτιδικές αλληλουχίες στο αμινο-τελικό άκρο τους (40). Ο εντοπισμός της DeSI-1 πρωτεάσης φαίνεται να έχει επίσης σημαντικό ρόλο καθώς τα υποστρώματα της DeSI-1 είναι αποκλειστικά πρωτεΐνες που είναι συζευγμένες με τους μεταγραφικούς παράγοντες BTB-ZF ενώ όταν αυτές οι πρωτεΐνες δεν βρίσκονται σε επαφή με τους BTB-ZF δεν υπόκεινται αποσομούλιωση από την DeSI-1, υποδηλώνοντας ότι η DeSI-1 δημιουργεί σύμπλοκο με τους παράγοντες BTB-ZF για να λειτουργήσει (65).

## 2.6 Η σουμοϋλίωση κατά την απόκριση στο κυτταρικό στρες και την υποξία

Έχει αναφερθεί πολλές φορές ότι η σουμοϋλίωση έχει ρόλο στην απόκριση στο κυτταρικό στρες, όπως είναι το θερμικό στρες, το οξειδωτικό στρες και το μεταβολικό στρες. Κατά το οξειδωτικό στρες έχει παρατηρηθεί ότι τα γενικά επίπεδα της σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών (global SUMOylation levels) μειώνονται. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ελεύθερων ριζών ROS φαίνεται να αναστέλλεται η δραστηριότητα των E1 (SAE1/SAE2) και E2 (Ubc9) ενζύμων, μέσω του σχηματισμού ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και του καταλυτικού κέντρου του κάθε ενζύμου (66, 67). Αντίστροφα κατά το θερμικό

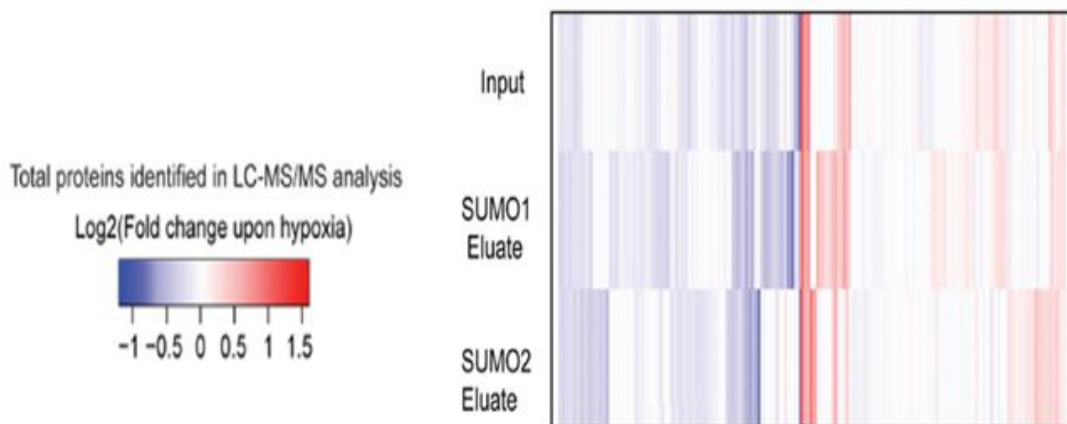
στρες τα επίπεδα σουμοϋλίωσης αυξάνονται. Μάλιστα φαίνεται ότι σουμοϋλιώνονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η επιδιόρθωση του DNA και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, βοηθώντας έτσι το κύτταρο να επιβιώσει από την υψηλή θερμοκρασία (48).

Πολύ σημαντικό ρόλο έχει η σουμοϋλίωση και σε καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών υλικών και υποξίας όπως είναι η χειμέρια νάρκη και η ισχαιμία. Και στις δύο περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση των σουμοϋλιωμένων υποστρωμάτων και συχνά υπερέκφραση του E2 ενζύμου Ubc9 (68). Σε διάφορα πειράματα μελετήθηκε η σουμοϋλίωση σε κύτταρα του εγκεφάλου ποντικών, όπου φάνηκε ότι η αυξημένη σουμοϋλίωση δρα πιθανόν προστατευτικά, βοηθώντας τα κύτταρα να επιβιώσουν από την έλλειψη θρεπτικών. Η πλειοψηφία των μελετών που έγιναν πάνω σε αυτό το αντικείμενο συμφωνεί ότι η αυξημένη σουμοϋλίωση προσδίδει στα κύτταρα του εγκεφάλου ανεκτικότητα στο ισχαιμικό στρες και ότι έχει νευροπροστατευτικό ρόλο (69).

Κατά το μεταβολικό στρες, στο οποίο εμπεριέχεται και το υποξικό στρες, έχει δειχθεί ότι η σουμοϋλίωση αρκετών πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην κυτταρική ομοίσταση καθορίζει την δράση τους. Ενδεικτικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι υπομονάδες HIF- $\alpha$  αλλά και οι παράγοντες HIF- $\beta$ , pVHL, PHD και FIH που ρυθμίζουν την δράση του σουμοϋλιώνονται και ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο (3), εμπλέκοντάς την έτσι και με τον μηχανισμό απόκρισης στην υποξία (Εικόνα 6).

Στα πλαίσια της μελέτης της ερευνητικής ομάδας της κ. Χαχάμης στο εργαστήριο Βιοχημείας ερευνώνται εκτενώς οι αλλαγές του προτύπου σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών κατά την υποξία σε καρκινικά κύτταρα (70). Για τον σκοπό αυτό έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης όλων των σουμοϋλιωμένων με τις πρωτεΐνες SUMO1 και SUMO2/3 πρωτεϊνών των κυττάρων και ποσοτικής MS-ανάλυσης των κυτταρικών εκχυλισμάτων και των εκλουσμάτων σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (Εικόνα 9) (70).

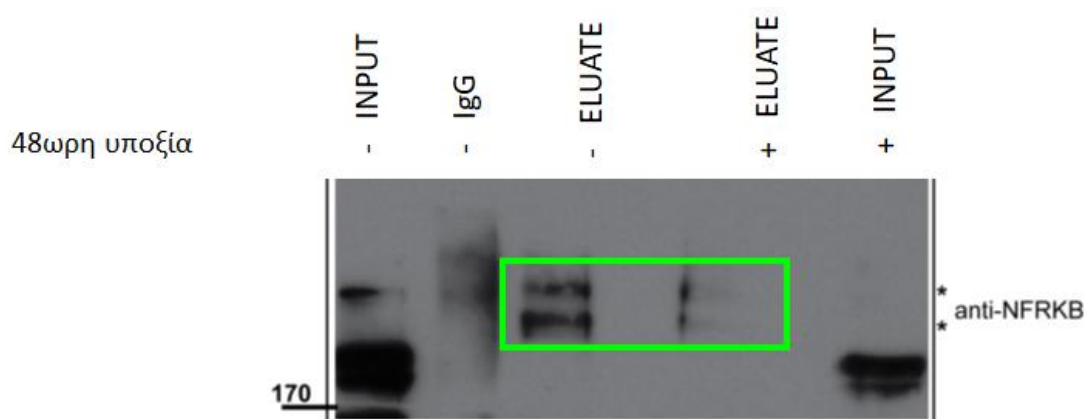




Εικόνα 9. Θερμικός χάρτης των πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υπό νορμοξικές και υποξικές συνθήκες. Στην πρώτη στήλη απεικονίζονται οι πρωτεΐνες από τα κυτταρικά εκχυλίσματα, στην δεύτερη στήλη οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν με αντίσωμα έναντι της SUMO1 και στην τρίτη στήλη πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν με αντίσωμα έναντι της SUMO2/3. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα μειώνονται στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία. Πηγή: (70)

Από την παραπάνω ανάλυση δεν παρατηρήθηκε μαζική αλλαγή στην σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών κατά την υποξία, αλλά παρατηρήθηκαν μεταβολές στην σουμοϋλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Ειδικότερα εντοπίστηκε μία ενδιαφέρουσα ομάδα πρωτεϊνών, των οποίων η σουμοϋλίωση άλλαξε ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδά τους έμειναν σταθερά ανάμεσα στις δύο συνθήκες υποξίας και νορμοξίας.

Ένας από τους στόχους που προέκυψαν, του οποίου τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μειώνονται στην υποξία, είναι ο μεταγραφικός ρυθμιστής NFRKB, ο οποίος σουμοϋλιώνεται από την πρωτεΐνη SUMO2/3 (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης NFRKB και της σουμοϋλίωσής του στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (inputs) καρκινικών κυττάρων HeLa σε νορμοξία και υποξία και στα εκλούσματα (eluates) με SDS-Page ανοσοαποτύπωση κατά Western. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ενάντι του NFRKB. Με πράσινο πλαίσιο σημειώνεται η σουμοϋλιωμένη μορφή του NFRKB. Με αστερίσκο φαίνονται οι σουμοϋλιωμένες μορφές του NFRKB, ενώ η μη τροποποιημένη ενδογενής πρωτεΐνη φαίνεται ως η κύρια ζώνη πάνω από τα 170kDa. Πηγή: (70)

Ο NFRKB είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής, ο οποίος συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες που έχουν σχέση κυρίως με τη μεταγραφή γονιδίων και φαίνεται να εμπλέκεται με διάφορες ασθένειες όπως είναι οι καρκινοπάθειες. Αδημοσίευτα και προκαταρκτικά δεδομένα της ομάδας μας δείχνουν πως ο NFRKB πιθανά ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργότητα των παραγόντων HIF.

Η σουμοϋλίωση του NFRKB και ο πιθανός του ρόλος στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία αποτελεί αντικείμενο έρευνας στο Εργαστήριο Βιοχημείας και αποτέλεσε το κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

### 3. NFRKB: Nuclear Factor Related to KappaB Binding Protein

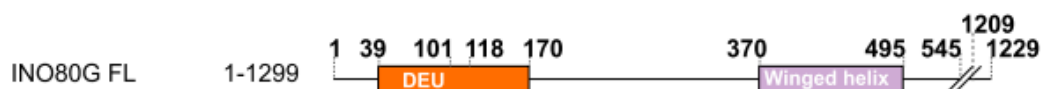
Ο παράγοντας NFRKB είναι μία μεγάλου μεγέθους πρωτεΐνη περίπου 170 kDa, η οποία αρχικά ανακαλύφθηκε ως μία πρωτεΐνη που συνδέεται σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο πάνω στο DNA όπου συνδέεται και ο NF-kappa B (kappa B site) και ελέγχει την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα α της ιντερλευκίνης-2 (IL-2R alpha) (71). Διάφορες δράσεις έχουν αποδοθεί στον NFRKB κυρίως ως μέρος του συμπλέγματος INO80, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω (72). Για τον λόγο αυτό ο NFRKB είναι επίσης γνωστός με το όνομα INO80G.

#### 3.1 Χαρακτηριστικά γονιδίου και πρωτεΐνης του NFRKB

Το γονίδιο του NFRKB βρίσκεται στο άκρο του q βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11q24 – q25) (73). Η πρωτεΐνη που παράγεται αποτελείται από 25 εξόνια και περίπου 1300 κατάλοιπα αμινοξέων (74) και το μοριακό της βάρος αρχικά υπολογίστηκε στα 107 kDa, ενώ με ειδικά αντισώματα ο NFRKB ανιχνεύεται στα 140 – 200 kDa (72).

Η δομή του NFRKB δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως καθώς το μεγάλο μέγεθός του δυσκολεύει την διαδικασία της κρυσταλλοποίησης. Παρ' όλα αυτά υπολογίζεται ότι το 65% της τριτοταγούς δομής του είναι αποδιαταγμένο. Η μεγαλύτερη αποδιαταγμένη περιοχή (650aa) καλύπτει σχεδόν όλο το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (75), το οποίο περιέχει

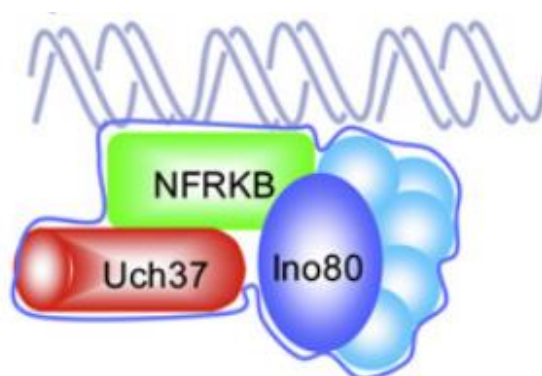
επαναλήψεις mucin-like (74). Το αμινο-τελικό άκρο του NFRKB είναι διατηρημένο σε φυτά, μετάρζωα (εκτός του *C. elegans*) καθώς και στον μικροοργανισμό *Giardia* (74) και περιέχει μία δομή έλικας (winged helix) στην περιοχή 370-495αα, πιθανόν για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (75), και μία περιοχή DEU για την πρόσδεση με την αποουβικιτινάση UCH-L5 (Εικόνα 11) (76). Ο NFRKB αλληλεπιδρά επίσης με το DNA στο στοιχείο σύνδεσης με την χρωματίνης 5'-GGGGAATCTCC-3' (75).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της δομής του παράγοντα NFRKB. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζεται η περιοχή DEU, όπου συνδέεται η UCH-L5, και η δομή winged helix για αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες. Πηγή: (76)

### 3.2 Λειτουργίες NFRKB

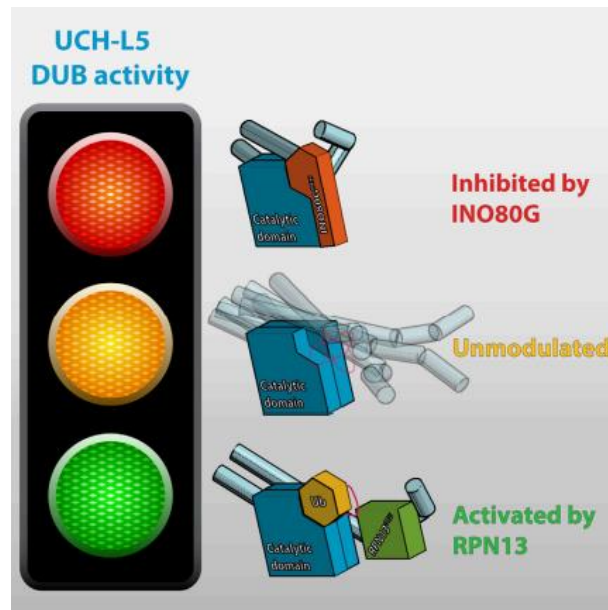
Ο NFRKB ή αλλιώς INO80G αποτελεί την υπομονάδα G του συμπλέγματος INO80. Το σύμπλεγμα INO80 ανήκει σε μία ομάδα συμπλεγμάτων αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης με σκοπό την έμμεση ρύθμιση διάφορων διαδικασιών που αφορούν την χρωματίνη (77). Το σύμπλεγμα αυτό είναι κατά μεγάλο μέρος του συντηρημένο σε πολλούς οργανισμούς και καλά μελετημένο στην ζύμη (77). Στον άνθρωπο (hINO80) αποτελείται από τουλάχιστον 15 υπομονάδες, εκ των οποίων οι 5 δεν υπάρχουν στο αντίστοιχο σύμπλοκο στην ζύμη. Μία από αυτές τις υπομονάδες είναι και ο NFRKB (Εικόνα 12) (74).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου INO80 με τον NFRKB και την Uch37. Ο NFRKB αποτελεί την υπομονάδα του συμπλόκου που συνδέεται με το DNA. Πηγή: (78)

Ο κύριος ρόλος του συμπλέγματος INO80 είναι η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων με ATP-εξαρτώμενο τρόπο ώστε να γίνουν προσβάσιμες οι επιθυμητές περιοχές της χρωματίνης σε μεταγραφικούς παράγοντες ή επιδιορθωτικά ένζυμα. Με αυτόν το τρόπο το σύμπλεγμα INO80 συμμετέχει στην ρύθμιση διαδικασιών όπως είναι η αντιγραφή του DNA, η επιδιόρθωσή του και η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι το σύμπλοκο INO80 συμμετέχει επίσης στην επιδιόρθωση DSBs (Double Stranded Breaks) (79), στην αποφυγή βλαβών του DNA κατά την αντιγραφή του (80), συμβάλλοντας έτσι στα μονοπάτια των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (81), και στην ρύθμιση μονοπατιών του μεταβολισμού σε σχέση με τα διαθέσιμα θρεπτικά υλικά (82). Το σύμπλεγμα INO80 πιθανόν εκτελεί κάποιες από τις παραπάνω λειτουργίες του συνεργατικά με το πρωτεάσωμα. Ειδικότερα, φαίνεται ότι τα δύο σύμπλοκα «μοιράζονται» κάποιες κοινές υπομονάδες, οι οποίες έχουν διαφορετική λειτουργία όταν βρίσκονται σε κάθε σύμπλοκο. Έτσι μέσω της αλληλεπίδρασης των δύο συμπλόκων επιτυγχάνεται η κατάλληλη ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών για την επιθυμητή λειτουργία κάθε φορά (83).

Με το πρωτεάσωμα αλλά και με τον NFRKB είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά η αποουβικιτινάση UCH-L5 ή αλλιώς Uch37. Η UCH-L5 είναι μία πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία ανήκει στην οικογένεια αποουβικιτινών UCHs (υδρολάσες του καρβοξυ-τελικού άκρου της ουβικιτίνης) (84) και η οποία μέσω της απομάκρυνσης της ουβικιτίνης από τα υποστρώματά της συμβάλλει στην ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA από την μετα-μεταφραστική τροποποίηση αυτή (85). Η UCH-L5 κατά κύριο λόγο αλληλεπιδρά με την ρυθμιστική υπομονάδα του πρωτεασώματος 19S ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο INO80 (83). Πιο αναλυτικά, η UCH-L5 αλληλεπιδρά μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της με το σύμπλοκο INO80 μέσω του αμινοτελικού άκρου της υπομονάδας του NFRKB. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αναστολή της ενεργότητας της UCH-L5. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση με τον NFRKB φαίνεται ότι αλλάζει την διαμόρφωση της UCH-L5 μη ευνοϊκά για την δραστηριότητά της και ταυτόχρονα μπλοκάρει άμεσα την θέση σύνδεσης της ουβικιτίνης (76). Η ρύθμιση της UCH-L5 πραγματοποιείται, επίσης, από την πρωτεΐνη RPN13 (υπομονάδα της ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος 19S), η οποία ενεργοποιεί την δραστηριότητα της αποουβικιτινάσης UCH-L5 (76) (Εικόνα 13).



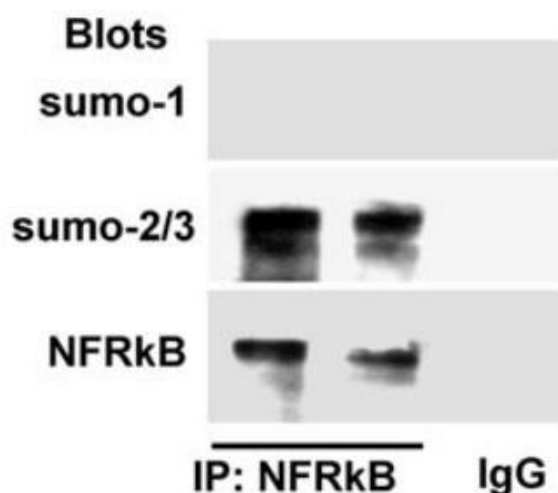
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της αποουβικιτινάσης UCH-L5. Πηγή: (76)

Ενδιαφέρον έχει, επίσης, ότι η UCH-L5 φαίνεται να ρυθμίζει την επιδιόρθωση του DNA από DSBs μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με το να προστατεύει τον NFRKB από αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Ειδικότερα, οι Nishi et al. (2014) έδειξαν ότι η UCH-L5 αφαιρεί αλυσίδες ουβικιτίνης από τον NFRKB κι έτσι αυτός διαφεύγει την αποικοδόμηση. Ο NFRKB στην συνέχεια συμμετέχει στον μηχανισμό εκτομής νουκλεοτιδίων κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό, ως μέλος του συμπλόκου INO80 (85).

Πρόσφατα επίσης ανακαλύφθηκε η συμμετοχή του NFRKB στον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών (ανεξάρτητος από την τελομεράση). Πιο συγκεκριμένα, οι Qiγao Peng et. al (2021) προτείνουν ότι ο NFRKB αποτελεί μία πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με τα τελομερή (telomere-associated protein – TAP), η οποία συμμετέχει στην εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών, διαδικασία που εμφανίζεται στο περίπου 10% των κακοηθειών (86).

Στην λειτουργία του NFRKB σημαντικό ρόλο έχει η σουμοϋλίωση. Όπως έχει γίνει ήδη γνωστό από προηγούμενη δουλειά του Εργαστηρίου Βιοχημείας και μία ακόμα μελέτη (70, 87) ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από την πρωτεΐνη SUMO2/3, σχηματίζοντας πιθανόν αλυσίδες SUMO, και όχι από την SUMO1 (Εικόνα 14). Έχει δειχτεί ότι τα επίπεδα σουμοϋλίωσης του NFRKB μειώνονται σε συνθήκες υποξίας (70) (Ενότητα 1.1.3) και ότι ο NFRKB είναι σουμοϋλιωμένος και στα αιμοσφαίρια ασθενών που πάσχουν από νεφρωσικό σύνδρομο (87) (Ενότητα 3.3). Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του τόσο στην υποξία όσο και στο νεφρωσικό

σύνδρομο παραμένει άγνωστος. Άγνωστος επίσης παραμένει ο ρόλος του NFRKB στην μεταγραφή γονιδίων-στόχων στην υποξία ή στις διαδικασίες που έχουν να κάνουν με την απόκριση και την επιβίωση των κυττάρων στην υποξία.



Εικόνα 14. Ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από την πρωτεΐνη SUMO2/3 σε αιμοσφαίρια ασθενών. Απεικόνιση αποτελεσμάτων πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της πρωτεΐνης NFRKB και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον NFRKB, την πρωτεΐνη SUMO1 και SUMO2/3 σε μονοπύρρηνα αιμοσφαίρια ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο. Φαίνονται δύο επαναλήψεις για κάθε συνθήκη. Πηγή: (87)

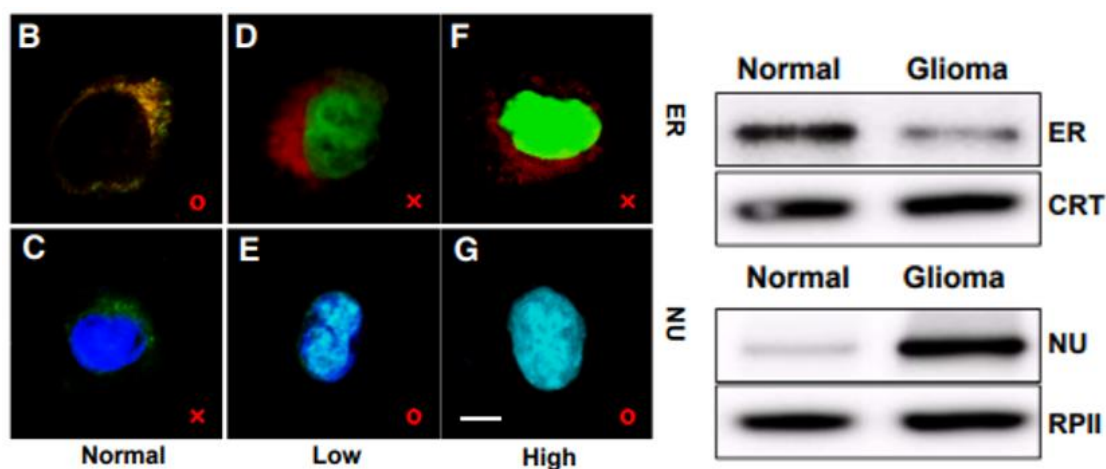
### 3.3 Σημασία του NFRKB σε παθολογικές καταστάσεις και στον καρκίνο

Ο NFRKB έχει συσχετιστεί κατά κύριο λόγο με παθολογικές καταστάσεις, που αφορούν κυρίως τον καρκίνο και το ανοσοποιητικό σύστημα. Όπως αναφέρθηκε ήδη ο NFRKB ελέγχει την έκφραση του άλφα υποδοχέα ιντερλευκίνης-2 (IL-2R alpha) επηρεάζοντας έτσι την ενεργοποίηση και την ομοίωση των T-λεμφοκυττάρων. Έχει βρεθεί επίσης ότι στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) ο NFRKB έχει υψηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα (88, 89), όπως και στην δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου (90). Σημαντικό ρόλο έχει και στην θρομβοκυτταροπενία, δηλαδή την μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων, στο σύνδρομο Jacobsen, όπου η απουσία του γονιδίου του NFRKB όπως και άλλων γονιδίων στο χρωμόσωμα 11 σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου (91, 92). Για παρόμοιο λόγο ο NFRKB έχει συσχετιστεί και με το λέμφωμα Burkitt-like MYC-negative, όπου η κύρια αιτία εμφάνισης της νόσου σε μοριακό επίπεδο φαίνεται να έχει να κάνει με αστάθεια στο τέλος του q άκρου

του χρωμοσώματος 11. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο του NFRKB βρέθηκε ότι είχε μεταλλάξεις και παρουσιάστηκαν μειωμένα επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης (93).

Το 2010 βρέθηκε ότι σε κακοήγη μεσοθηλιώματα του υπεζωκότα πολλά γονίδια εμφανίζουν μεταλλάξεις. Μεταξύ αυτών ήταν και ο NFRKB, ο οποίος εμφάνισε διάφορες σημειακές μεταλλάξεις σε εξόνια (94). Έχει φανεί επίσης ότι ο NFRKB αλλάζει τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του στα γλοιώματα, σε σύγκριση με τον εντοπισμό του σε φυσιολογικά κύτταρα του εγκεφάλου (95).

Συγκεκριμένα σε πειράματα ανοσοφθορισμού η ενδογενής πρωτεΐνη του NFRKB εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε φυσιολογικά εγκεφαλικά κύτταρα ποντικού (Εικόνα 15B και C), ενώ σε καρκινικά εγκεφαλικά κύτταρα που προήλθαν από γλοιώματα ποντικού ο NFRKB εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 15, D και E χαμηλού βαθμού κακοήθειας (low) και F και G υψηλού βαθμού κακοήθειας (high)). Ταυτόχρονα, στα πλαίσια της ίδιας ερευνητικής μελέτης πειράματα κυτταρικής κλασμάτωσης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 15) (95).



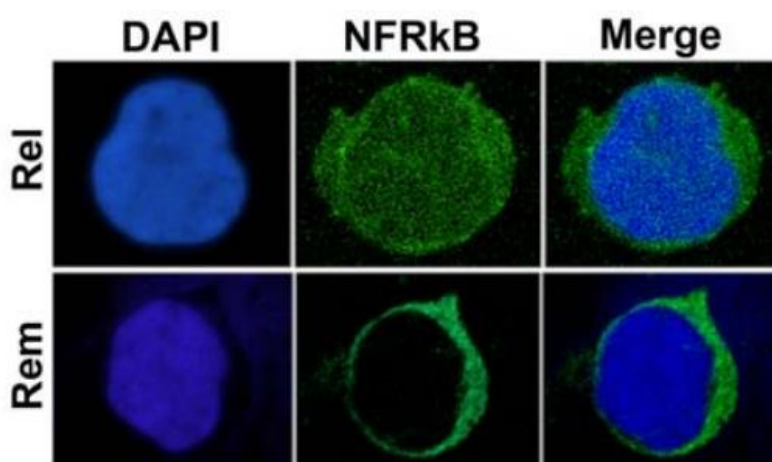
Εικόνα 15. Ο NFRKB εντοπίζεται στο ΕΔ σε φυσιολογικά κύτταρα ποντικού ενώ φαίνεται να είναι πυρηνικός σε αντίστοιχα καρκινικά κύτταρα, Απεικόνιση αποτελεσμάτων από πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την πρωτεΐνη του NFRKB σε φυσιολογικά νευρικά κύτταρα και σε κύτταρα που προήλθαν από γλοιώματα (low: χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, high: υψηλού βαθμού αλλοιώσεις). Πηγή: (95)

Στην έκβαση των γλοιωμάτων φαίνεται επίσης να έχει ρόλο και η UCHL5, συσχετίζοντας έτσι τον NFRKB με αυτήν την ασθένεια ακόμα περισσότερο (96). Εκτός αυτού ρόλο φαίνεται να

έχει ο NFRKB με την UCHL5 στον γαστρικό καρκίνο, όπου προάγουν συνεργατικά την αναπαραγωγή και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Μάλιστα με την δέσμευση του IncDRAIC στον NFRKB και την επικείμενη αποικοδόμησή του η αναπαραγωγή και η μετάσταση των κυττάρων αυτών φάνηκε ότι μειώνεται (97). Όλα τα παραπάνω παραδείγματα υποδηλώνουν ότι ο NFRKB πιθανόν να έχει έναν αρκετά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται ακόμα περισσότερο από το ερευνητικό έργο των Qiyaο Peng et. (2021). Εκεί αναφέρεται ότι στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα όπου λαμβάνει χώρα η εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών, τα επίπεδα του NFRKB (TAP πρωτεΐνη) είναι υψηλά, κάτι που αποτελεί κακή πρόγνωση για την έκβαση της υγείας του ασθενή και καθιστά τον NFRKB έναν πιθανό δείκτη της ασθένειας αυτής (86).

Εκτός από τον καρκίνο όμως ο NFRKB έχει συσχετιστεί και με το «νεφρωσικό σύνδρομο ελάχιστης αλλαγής» (στάδιο πριν το νεφρωσικό σύνδρομο). Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του NFRKB βρέθηκε να είναι αυξημένα στα CD4+ T λεμφοκύτταρα αλλά και στα B λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με το σύνδρομο. Στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι ο ενδοκυττάριος εντοπισμός του NFRKB σε υγιή αιμοσφαίρια είναι κυτταροπλασματικός ενώ σε αιμοσφαίρια ασθενών ο NFRKB βρέθηκε στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 16). Τέλος δύο ακόμα ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που έγιναν σχετικά ήταν ότι ο NFRKB είναι σουμοϋλιωμένος από τις πρωτεΐνες SUMO2/3 στο σύνδρομο χωρίς να είναι σαφής η επίδραση της σουμοϋλίωσης αυτής, καθώς επίσης ότι ο NFRKB προωθεί την υπομεθυλίωση του DNA υποδηλώνοντας την σχέση του με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.





*Εικόνα 16. Ο NFRKB εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε μονοπύρρηνα αιμοσφαίρια ατόμου με υποτροπή του συνδρόμου, ενώ φαίνεται να είναι πυρηνικός σε μονοπύρρηνα αιμοσφαίρια ατόμου με ύφεση του συνδρόμου. Πηγή: (87)*

## ΣΚΟΠΟΣ

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο NFRKB φαίνεται να έχει ενεργό ρόλο σε μία πληθώρα ασθενειών όπως ο καρκίνος. Η υποξία, μία κατάσταση που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να αλλάζει δραστικά την σουμοϋλίωση του NFRKB. Προκαταρκτικά δεδομένα δείχνουν πως ο NFRKB έχει εμπλοκή στην ρύθμιση της μεταγραφικής ικανότητας των παραγόντων HIF. Για τους παραπάνω λόγους ξεκίνησε η μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης του NFRKB και της λειτουργίας του στην κυτταρική απόκριση στην υποξία, μέρος της οποίας αποτελεί και η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους τμήματα:

1. Προκαταρκτική μελέτη της έκφρασης και του ενδοκυττάρου εντοπισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης του NFRKB, καθώς και μελέτη της αλληλεπίδρασής της με την υπομονάδα  $\alpha$  του βασικού μεταγραφικού παράγοντα της υποξίας HIF σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.
2. Μελέτη της σουμοϋλίωσης του NFRKB μέσω της δημιουργίας μεταλλαγμένων μορφών του σε πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης, οι οποίες στην συνέχεια θα χαρακτηριστούν ως προς την έκφραση, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό και την ικανότητα σουμοϋλίωσής τους σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Με την παρούσα εργασία στοχεύουμε στην διερεύνηση της λειτουργίας του NFRKB γενικότερα αλλά και στην δημιουργία εργαλείων για την περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας της σουμοϋλίωσής του στην επιβίωση και απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Καθώς τόσο ο NFRKB όσο και η υποξία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, η ταυτοποίηση των μονοπατιών αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

## ΥΛΙΚΑ

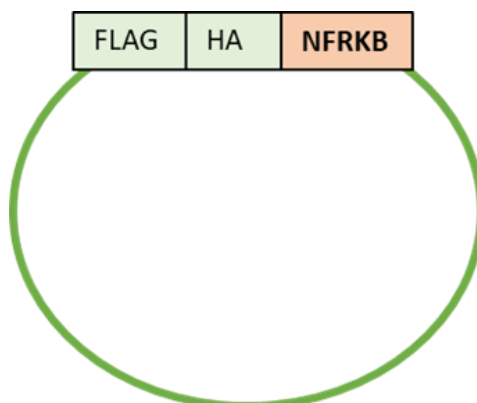
### 1. Πλασμιδιακοί φορείς

#### 1.1 pcDNA3.1-HA

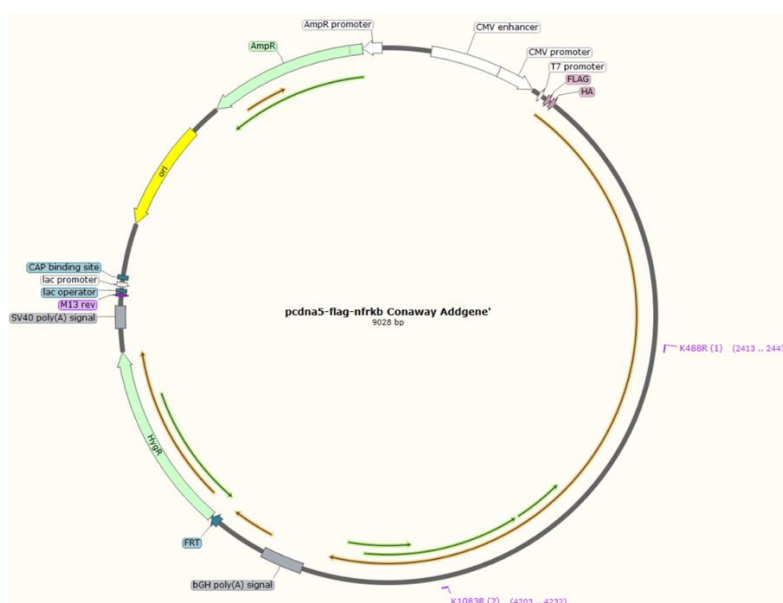
Ο φορέας pcDNA3.1 χρησιμοποιείται για υπερέκφραση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από θηλαστικά, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη όπως επίσης και τον υποκινητή CMV (Cytomegalovirus), υπό τον έλεγχο του οποίου μεταγράφεται το κλωνοποιημένο γονίδιο. Το πλασμίδιο είναι τροποποιημένο ώστε να περιέχει τον επίτοπο HA (YPYDVPDYA από την πρωτεΐνη Human influenza hemagglutinin), ο οποίος χρησιμοποιείται ως ετικέτα (tag) ανίχνευσης της πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται από το πλασμίδιο χωρίς να επηρεάζει την δραστηρότητά της. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της κυρίας F. Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Γερμανία).

#### 1.2 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB wt

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA5 περιέχει τον υποκινητή CMV (Cytomegalovirus) για υπερέκφραση σε κύτταρα θηλαστικών και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Ο φορέας pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB φέρει το cDNA της ισομορφής 2 του μεταγραφικού ρυθμιστή NFRKB, η οποία είναι και η κύρια ισομορφή που παρατηρείται. Περιέχει τις αλληλουχίες για τους επίτοπους FLAG (DYKDDDDK) και HA (YPYDVPDYA) στο N-τελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας κατασκευάστηκε από το Stowers Institute for Medical Research (Κάνσας, ΗΠΑ) και ήταν εμπορικά διαθέσιμος από την εταιρία Addgene.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA5-FLAG-NFRKB. Φαίνονται οι αλληλουχίες του cDNA του NFRKB (κόκκινο) και των επιτόπων FLAG και HA (πράσινο) πάνω στον πλασμιδιακό φορέα.



Εικόνα 18. Λεπτομερειακή σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA5-FLAG-NFRKB της εταιρίας Addgene (#19789). Πάνω στον πλασμιδιακό φορέα φαίνονται με την σειρά: ο CMV ενισχυτής, ο CMV υποκινητής και ο T7 υποκινητής, οι επίτοποι FLAG και HA (μοβ), το cDNA του NFRKB (πορτοκαλί βέλος – δεξιά), η αλληλουχία της bGH πολύ(A) ουράς, η FRT αλληλουχία, το γονίδιο της υγρομυκίνης, η αλληλουχία της SV40 πολύ(A) ουράς, ο M13 ανάστροφος εκκινητής, η αλληλουχία για καταστολή του lac οπερονίου, ο υποκινητής του lac οπερονίου, η αλληλουχία CAP (Catabolite Gene Activator), αλληλουχία ori, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και ο υποκινητής του.

### 1.3 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαγμένης με μήτρα τον φορέα pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB wt που περιγράφεται στην ενότητα 1.2. Για την μεταλλαγμένη χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 1.

### 1.4 pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαγμένης με μήτρα τον φορέα pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB wt που περιγράφεται στην

ενότητα 1.2. Για την μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 1.

### 1.5 pcDNA GALT RFP

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA GALT RFP παραχωρήθηκε από το Ινστιτούτο ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Γερμανία και περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης ουριδυλυλτρανσφεράσης της 1-φωσφορικής γαλακτόζης (GALT) και τον επίτοπο RFP (Red Fluorescent Protein) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης GALT. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του ενδοπλασματικού δικτύου σε πειράματα ανοσοφθορισμού.

## 2. Εκκινητές

Κατά την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που αναγράφονται στον πίνακα 1:

Πλασμίδιο	Πρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R	5'-AAAGATCAGGCCTTCTGTAGGCAAGAAAATGAAGA -3'	5'- TCTTCATTTTCTTGCCCTACAGAAGGCCTGATCTTT -3'
pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R	5'- CTCTTCAGAAGCAAGACCAGCTGCCACGAT -3'	5'- ATCGTGGCAGCTGGTCTTGCTTCTGAAGAG -3'

Πίνακας 1. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB wt σε pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R (πρώτη σειρά) και σε pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R (δεύτερη σειρά).

## 3. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση των πλασμιδίων ήταν τα βακτήρια E. Coli TOP10. Τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη και προέρχονται από την εταιρία Invitrogen.

## 4. Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες

### 4.1 Υγρό LB

Το υγρό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani broth) περιέχει: 10gr Pepton from casein, 5gr Bacto Yeast Extract, 5gr Sodium Chloride και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 500ml. Ακολουθεί αποστείρωση και προσθήκη 500μL του αντιβιοτικού αμικιλίνη.

### 4.2 Στερεό LB

Το στερεό θρεπτικό μέσο LB περιέχει τα ίδια συστατικά με το υγρό (ενότητα 4.1.1) συν 20gr άγαρ. Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου προστίθενται και 500μL του αντιβιοτικού αμικιλίνη και ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία petri.

## 5. Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η σειρά HeLa (Henrietta Lacks, ATCC) και προέρχεται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας.

## 6. Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

### 6.1 DMEM +FBS/+PS

Το κύριο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ομαλή ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι το DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), το οποίο προέρχεται από την εταιρία Gibco με υψηλή γλυκόζη, πυροσταφυλικό και γλουταμίνη. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται 10% απενεργοποιημένος βόειος εμβρυικός ορός FBS και 1000U/l από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

### 6.2 DMEM -/-:

Το DMEM -/- έχει την κύρια σύσταση του θρεπτικού μέσου που περιγράφεται παραπάνω, δηλαδή δεν περιέχει τον βόειο εμβρυικό ορό και τα αντιβιοτικά.

### 6.3 DMEM +5% FBS/+PS

Στην κύρια σύσταση του DMEM έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα βόειου εμβρυικού ορού +5% FBS, ενώ δεν περιέχει αντιβιοτικά.

### 7. Αντιβιοτικά

Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη (1000U/ml).

### 8. Ένζυμα

- Για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Phusion high fidelity polymerase (2000 U/ml) και το περιοριστικό ένζυμο DpnI (20000 U/ml)
- Για την πραγματοποίηση της διαγνωστικής πέψης pcDNA χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

XhoI (20000 U/ml)

EcoRV (20000 U/ml)

Όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρίας New England Biolabs.

### 9. Αντισώματα

Τα πρώτα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 2:

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Προέλευση
Anti-NFRKB	κουνέλι	1:2000, 1:1000	πολυκλωνικό	Bethyl
Anti-HIF1α	κουνέλι	1:2000, 1:1000	πολυκλωνικό	(Lyberopoulou et al, 2007)
Anti-HIF1α	ποντίκι	1:500	μονοκλωνικό	BD Biosciences

Anti-HA	κουνέλι	1:5000, 1:2000	πολυκλωνικό	Cell Signaling
Anti-flag	ποντίκι	1:1000	μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich
Anti-tubulin	ποντίκι	1:10.000	μονοκλωνικό	Cell Signaling Biotechnology
Anti-SUMO2/3	κουνέλι	1:2000	πολυκλωνικό	Chachami et al, (2019)

Πίνακας 2. Περιγράφονται με την σειρά: το όνομα του αντισώματος, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθε, η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε, ο τύπος του αντισώματος και η προέλευσή του

Για την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα έναντι των IgG αλυσίδων κουνελιού (αραίωση 1:5000) και ποντικίου (αραίωση 1:3000), συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (αγριορέπανου) (HRP), τα οποία είναι της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology και Cell Signaling.

Για την μέθοδο ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα δεύτερα αντισώματα έναντι των IgG αλυσίδων κουνελιού Alexa 488-πράσινο και Alexa 647-υπέρυθρο και ποντικού Alexa 594-κόκκινο της εταιρείας Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), συζευγμένα με φθοριοχρώματα, τα οποία ανιχνεύτηκαν με τα αντίστοιχα χρώματα.

## 10. Χημικά Διαλύματα

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για τα οποία δεν αναφέρεται εταιρία προέλευσης ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich και AppliChem.

### 10.1 Διάλυμα PCR

Για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- dNTPs 10mM
- Buffer Phusion high fidelity polymerase (της εταιρείας New England Biolabs)



## 10.2 Καθαρισμός προϊόντων PCR – Κατακρήμνιση με αιθανόλη

Για την κατακρήμνιση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- 100% αιθανόλη
- Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 75%
- 1M CH<sub>3</sub>COOK

## 10.3 Ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 50x  
Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης του DNA με τελικό όγκο 1L περιέχει 100ml EDTA (0,5M), 242 g Tris Base, 57,1 υγρού οξικού οξέος και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο. Κατά την χρήση του το διάλυμα αραιώνεται από 50x σε 1x.
- Διάλυμα φόρτωσης 6x  
Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 0.2% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.2% κυανό του ξυλενίου, 60% γλυκερόλη, 60mM EDTA
- Μάρτυρας μοριακού βάρους Fermentas GeneRuler 1kb DNA ladder
- Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml)

## 10.4 Διαλύματα Κυτταροκαλλιιεργειών

- Βόειος εμβρυικός ορός  
Ο βόειος εμβρυικός ορός χρησιμοποιείται ευρύτατα για την *in vitro* καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς περιέχει απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες και πολύ χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων. (της εταιρίας Gibco)
- Διάλυμα θρυψίνης 0,2% για την αποκόλληση των κυττάρων κατά την ανακαλλιέργεια. (της εταιρίας Biowest)
- PBS 10x

Το PBS περιέχει 40gr NaCl, 1gr KCl, 8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2H<sub>2</sub>O, 1.2gr KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 500ml.

### 10.5 Διαλύματα Ανοσοκατακρήμνισης

- Διάλυμα λύσης 2x τελικού όγκου 1ml: 100μl 10x PBS, 100μl SDS 20%, 20 μl EDTA (0,5M), 200μl EGTA (0,05M), 10μl PI mix, 10μl NEM
- RIPA Buffer: 20mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 7,4), 150mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο
- Co-IP Buffer: 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA pH 8, 0.2 mM ορθοβαναδικό νάτριο ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), PI mix, 20mM NEM
- Διάλυμα NEM: 0,125 gr N-αιθυλομαλεϊμίδιου σε 1ml DMSO για αναστολή SUMO-ισοπεπτιδασών
- Υδατικό διάλυμα 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- DTT 100mM
- Αναστολείς πρωτεασών-PI mix G: AEBSF, απροτινίνη, E-64, leupeptin, EDTA της εταιρίας SERVA
- EDTA 0,5M pH 8: για απενεργοποίηση μέταλλο-εξαρτώμενων ενζύμων, καθώς δεσμεύει ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου
- EGTA 0,5M pH 8: για απενεργοποίηση μέταλλο-εξαρτώμενων ενζύμων, καθώς δεσμεύει κυρίως ιόντα ασβεστίου και λιγότερο μαγνησίου
- SDS Laemmli Loading buffer 1x: 0mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη
- Αντιδραστήριο Bradford: αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue -R250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης.

### 10.6 Διαλύματα Ανοσοαποτύπωσης κατά Western

- 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: 0,375 Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης: 0,125 Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,3
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς: 125 mM Tris-Borate (pH 8,5), 0,2% SDS, 0,5 mM DTT
- Διάλυμα χρωστικής Ponceau S 2%
- Διάλυμα γάλακτος κορεσμού: 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween
- Εμφανιστικό μέσο: Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore)

## 10.7 Διαλύματα Έμμεσου Ανοσοφθορισμού

- Διάλυμα μονιμοποίησης κυττάρων στην καλυπτρίδα: 3.7% φορμαλδεΐδης διαλυμένη σε PBS 1x
- Διάλυμα διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης: 0,2% Triton X-100 σε PBS 1x
- Διάλυμα κορεσμού: 3% BSA σε PBS-tween 0,1%
- Διάλυμα μονιμοποίησης καλυπτρίδας στην αντικειμενοφόρο πλάκα: περιέχει MOWIOL (διάλυμα διατήρησης) και DAPI για την χρώση της χρωματίνης

## 11. Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο για επιμόλυνση κυττάρων HeLa: PEI (1μg/μl) της εταιρείας abm Inc
- Αντιδραστήρια για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια: kit “NucleoSpin® plasmid” της εταιρείας Macherey-Nagel

## 12. Σφαιρίδια σεφαρόζης

- Protein A σφαιρίδια της εταιρείας Sigma Aldrich
- HA-protein A σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα ενάντι του επιτόπου HA της εταιρείας Sigma Aldrich
- SUMO2/3 protein G σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα ενάντι της πρωτεΐνης SUMO2/3 (Becker et al 2013)

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Κυτταροκαλλιέργειες HeLa κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί που περιγράφονται στις μεθόδους των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες σε θαλάμους κάθετης νηματικής ροής χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα υλικά.

#### 1.1 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών σειρών – Κατεργασία κυττάρων με θρυψίνη

Τα κύτταρα HeLa ξεπαγώνουν σε υδατόλουτρο στους 37 °C και με φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του DMSO, μεγαλώνουν σε πιάτα των 10cm με θρεπτικό υλικό το DMEM +/-

έως ότου φτάσουν σε 100% πληρότητα. Η κατεργασία θρυψινοποίησης των κυττάρων χρησιμοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καταλάβει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του πιάτου (90-100%) και ακολουθεί ανακαλλιέργεια, δηλαδή το ξεκίνημα νέας καλλιέργειας. Το ένζυμο που συμμετέχει στην αποκόλληση των κυττάρων είναι η θρυψίνη, η οποία είναι μια πρωτεάση σερίνης που βρίσκεται στο πεπτικό σύστημα πολλών σπονδυλωτών, όπου υδρολύει πρωτεΐνες στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη ή αργινίνη.

Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα με αναρρόφηση και ακολουθεί πλύση με PBS 1x για να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό υλικό ώστε να μην απενεργοποιηθεί το ένζυμο στο επόμενο βήμα. Προστίθεται το διάλυμα θρυψίνης (1ml) και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 4 λεπτά έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του πιάτου. Η δράση της θρυψίνης απενεργοποιείται με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε ίση ή μεγαλύτερη ποσότητα από αυτήν του διαλύματος του ενζύμου. Η απενεργοποίηση αυτή θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή βλάβης ή και θανάτου των κυττάρων. Το αιώρημα των κυττάρων αραιώνεται κατάλληλα και ξεκινάει νέα καλλιέργεια σε πιάτο των 10cm με αραιώση 1/10 ή σε πιάτο 6cm με αραιώση 1/20.

## 1.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακό DNA με το αντιδραστήριο PEI

Ως «διαμόλυνση» ή “transfection” ορίζεται η ενδοκυτταρική μεταφορά γενετικού υλικού, στην προκειμένη περίπτωση ενός πλασμιδιακού φορέα. Διαμόλυνση μπορούμε να πετύχουμε με διάφορους τρόπους και με διαφορετικά αποτελέσματα. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία η διαμόλυνση επιτεύχθηκε με την χρήση της πολυαιθυλενοϊμίνης ή αλλιώς PEI. Το PEI είναι ένα μη λιπιδικό πολυμερές που προκύπτει μέσω κατιονικού πολυμερισμού. Το θετικό του φορτίο του δίνει την ικανότητα να προσελκύει αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως είναι το DNA δημιουργώντας έτσι συμπλέγματα με θετικό φορτίο. Χάρη σε αυτό το φορτίο τα συμπλέγματα αυτά αλληλεπιδρούν και συνδέονται στην μεμβράνη των κυττάρων διευκολύνοντας έτσι την ενδοκυτταρική μεταφορά του DNA. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία η αναλογία DNA : PEI είναι 1:2.

Το πιάτο καλλιέργειας την ημέρα της διαμόλυνσης πρέπει να είναι σε 60-80% κορεσμό. Για την διαμόλυνση πιάτου 10cm παρασκευάζεται το μίγμα DNA-PEI-DMEM που περιέχει 15μg πλασμιδιακού DNA, 30μL PEI και 1,5mL θρεπτικού υλικού DMEM/-/. Το μίγμα επώαζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα φορτισμένα σύμπλοκα DNA-PEI. Έπειτα προστίθενται στο μίγμα 4,5mL DMEM +5% FBS ορού. Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το πιάτο καλλιέργειας και αντικατάστασή του θρεπτικού με μίγμα των

6ml. Έγινε επώαση των κυττάρων για 4 ώρες στον κλίβανο στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>. Στην συνέχεια απομακρύνεται το μίγμα και προστίθεται θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά και ορό DMEM+/+ και ακολούθησε περαιτέρω επώαση για 24 ώρες.

### 1.3 Επώαση σε συνθήκες υποξίας

Η επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας 1% O<sub>2</sub> για 24 ώρες πραγματοποιούνται σε θάλαμο υποξίας Ruskin INVIVO<sub>2</sub>.

## 2. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

### 2.1 Δημιουργία μεταλλαγμένου πλασμιδιακού φορέα pcDNA FLAG-HA-NFRKB

Σε αυτήν την τεχνική χρησιμοποιήθηκε ένα ολιγονουκλεοτίδιο, που περιείχε την επιθυμητή σημειακή μετάλλαξη και το οποίο λειτούργησε ως εκκινήτης για την έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ολόκληρου του πλασμιδιακού φορέα. Τα νεοσυντιθέμενα πλασμίδια, προϊόντα της PCR, περιείχαν την επιθυμητή μετάλλαξη. Για την απομάκρυνση των μητρικών αλυσίδων που δεν περιείχαν την μετάλλαξη ακολούθησε επώαση και πέψη των προϊόντων με την περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI, η οποία πέπτει μεθυλιωμένες και ημιμεθυλιωμένες θέσεις στο DNA. Έτσι τα μόρια που περιείχαν μητρικό κλώνο καταστράφηκαν και τα νεοσυντιθέμενα πλασμίδια με την μετάλλαξη έμειναν άθικτα. Τέλος, ακολούθησε κατακρήμιση με αιθανόλη ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA.

#### 2.1.1 Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω ολιγονουκλεοτιδίου

Στην παρούσα εργασία δημιουργήθηκαν τα δύο μεταλλάγματα pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-K488R pcDNA5 και FLAG-HA-NFRKB-K1083R μέσω PCR με μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA5 flag-HA-NFRKB-WT (ΥΛΙΚΑ ενότητα 1.2). Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο Phusion Polymerase υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 ενώ οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στον Πίνακα 4.

<b>Συνθήκες Αντίδρασης PCR</b>
--------------------------------

Αρχική αποδιάταξη	98 °C για 30 δευτερόλεπτα
Αποδιάταξη	98 °C για 10 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	60 °C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 °C για 5 λεπτά
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 λεπτά

Πίνακας 3. Περιγραφή των συνθηκών της αντίδρασης PCR μεταλλαξιγένεσης, Τα βήματα αποδιάταξη, υβριδισμός εκκινητών και επιμήκυνση επαναλήφθηκαν με αυτήν την σειρά 35 φορές.

<b>Συγκεντρώσεις και ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση πολυμεράσης</b>	
10μM πρόσθιος εκκινητής	2,5μL
10μM ανάστροφος εκκινητής	2,5μL
dNTPs (10mM)	1μL
5x Pfu Buffer	10μL
pcDNA5-flag-HA-NFRKB-WT	50ngr → 1μL
πολυμεράση Phusion	0,5μL
Νερό	32,5μL
Τελικός όγκος	50μL

Πίνακας 4. Αναλυτική περιγραφή της σύστασης κάθε αντίδραση PCR μεταλλαξιγένεσης.

### 2.1.2 Απομάκρυνση μητρικών κλώνων με πέψη των προϊόντων PCR με το ένζυμο DpnI

Οι μητρικοί κλώνοι χωρίς την επιθυμητή μετάλλαξη απομακρύνθηκαν με την χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης DpnI. Πιο συγκεκριμένα τα προϊόντα της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, που περιγράφεται στην ενότητα 2.1.1, επώαστηκαν με 1μl του ενζύμου DpnI για κάθε αντίδραση για 5 ώρες στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης τα προϊόντα

της πέψης μπορούν να αποθηκευτούν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ή μπορεί να ακολουθήσει άμεσα η κατακρήμνιση με αιθανόλη (Ενότητα 2.1.3).

### *2.1.3 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη*

Η κατακρήμνιση του DNA στηρίζεται στην εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων του νουκλεϊκού οξέος, κάτι που το καθιστά αδιάλυτο σε υδατικά διαλύματα. Για αυτόν τον σκοπό στα μόρια DNA προστέθηκαν άλατα, των οποίων τα κατιόντα εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίου του DNA, και αιθανόλη, η οποία διευκολύνει την αλληλεπίδραση αυτήν.

Στο διάλυμα (50μl) με τα προϊόντα πέψης που προκύπτει (Ενότητα 2.1.2) προστέθηκαν 125μl αιθανόλης (100%) και 5μl  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (1M). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Την επομένη το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 12000xg στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 500μl υδατικού διαλύματος αιθανόλης (75%). Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου, ώστε να μην μείνει καθόλου αιθανόλη. Τέλος, στο ίζημα με το πλασμιδιακό DNA προστέθηκαν 10μl ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απευθείας για μετασχηματισμό βακτηρίων (Ενότητα 2.2.1).

## 2.2 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακών φορέων από βακτηριακές καλλιέργειες

### *2.2.1 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli με θερμικό σοκ με τους πλασμιδιακούς φορείς*

Η ξαφνική και σύντομη εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας ή αλλιώς θερμικό σοκ είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων με κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Κατά το θερμικό σοκ το εξωτερικό περιβάλλον του κάθε κυττάρου έχει πιο υψηλή θερμοκρασία σε σχέση με το εσωτερικό του κυττάρου κάτι που προκαλεί διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο υδατικών διαλυμάτων. Λόγω αυτού δημιουργούνται οπές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων καθιστώντας έτσι την ενδοκυτταρική μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα εφικτή μέσω των οπών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί επίσης ότι το διάλυμα με τα βακτήρια E.coli και τους φορείς πρέπει να έχουν προηγουμένως επωαστεί σε κατιονικό διάλυμα ώστε να περιοριστούν τα αρνητικά φορτία

των μεμβρανών και των πλασμιδίων και να επιτραπεί στην συνέχεια η μεταξύ τους προσέγγιση.

10μL από το κάθε προϊόν της PCR (Ενότητα 2.2.1) επώαστηκε με τα κύτταρα E.coli (50μL) που είχαν υποστεί ειδική κατεργασία ώστε να γίνουν δεκτικά (competent) για 30 λεπτά στον πάγο. Μετά το πέρας της επώασης εφαρμόστηκε θερμικό σοκ στους 42 °C για 50 δευτερόλεπτα. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα στον πάγο για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση στους 37 °C παρουσία 1ml LB θρεπτικού υλικού (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 4.2). Ακολούθησε φυγοκέντρηση 4000rpm για 5 λεπτά, απομάκρυνση 800μL από το υπερκείμενο, επαναιώρηση του ιζήματος και επίστρωση των μετασηματισμένων κυττάρων σε πιάτα με στερεό θρεπτικό υλικό LB παρουσία αμπικιλίνης. Οι νέες καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα αξιολογήθηκε η ανάπτυξη ή μη των μικροοργανισμών.

## 2.3 Έλεγχος ύπαρξης των πλασμιδιακών φορέων με τις επιθυμητές μεταλλάξεις

### 2.3.1 Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες

Για την απομόνωση και τον διαχωρισμό πλασμιδιακού DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου και κυρίως από το χρωμοσωμικό βακτηριακό DNA πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να ανασχηματίζεται γρήγορα στην δίκλωνη μορφή του ενώ τα μεγαλύτερα σε μέγεθος τμήματα DNA (χρωμοσωμικά) δεν διαθέτουν αυτήν την ικανότητα και κατακρημνίζονται.

Από τις βακτηριακές αποικίες που αναπτύχθηκαν (Ενότητα 2.2.1) επιλέχθηκαν 5 για κάθε μετάλλαγμα (K488R και K1083R) ώστε να αναπτυχθούν ολονύκτια σε καλλιέργεια παρουσία υγρού θρεπτικού υλικού LB (ΥΛΙΚΑ Ενότητα 4.1) με αμπικιλίνη στους 37 °C υπό ανάδευση. 3ml από κάθε καλλιέργεια που αναπτύχθηκε φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων. Για την απομόνωση και τον διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA και σύμφωνα με το πρωτόκολλο Isolation of high-copy plasmid DNA from E.coli του παρασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα για την αλκαλική λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε SDS ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Το διάλυμα λύσης περιείχε επίσης NaOH, το οποίο σπάει τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις του DNA, κι έτσι από τα δίκλιωνα μόρια DNA προέκυψαν μονόκλιωνα. Στην συνέχεια προστέθηκε διάλυμα με χαμηλό pH ώστε επιτευχθεί



η εξουδετέρωση, δηλαδή να μειωθεί η αλκαλικότητα για να επανασηματιστούν οι δεσμοί υδρογόνου στα μονόκλινα μόρια DNA. Τα πλασμιδιακά μόρια ανασχηματίστηκαν, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια όχι. Το διάλυμα εξουδετέρωσης περιείχε επίσης υψηλή συγκέντρωση αλάτων τα οποία βοηθούν το DNA να δεσμευτεί σε silica στήλη. Οι προσμίξεις του μείγματος απομακρύνθηκαν με την πλύση της στήλης με αιθανόλη. Τέλος το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε από την στήλη με την προσθήκη 50μl υπερκαθαρού αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O ή ειδικού για έκλυση διαλύματος.

### 2.3.2 Διαγνωστική πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε στην ενότητα 2.3.1 ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του σωστού ενθέματος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI και EcoRV. Η ενδονουκλεάση XhoI πέπτει εσωτερικά του ενθέματος ενώ η EcoRV εκατέρωθεν. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση του εν λόγω πειράματος αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 5:

Αντίδραση 20μl	(μl)
Buffer 3	2
pcDNA	1
XhoI (20000 U/ml)	0,2
EcoRV (20000 U/ml)	0,2
H <sub>2</sub> O	16,6

Πίνακας 5. Περιγραφή της σύστασης αντίδραση με πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και EcoRV.

Η πέψη διήρκησε 2 ώρες στους 37 °C.

### 2.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία τεχνική, με την οποία μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν πόρους συγκεκριμένου μεγέθους, που εξαρτάται από την συγκέντρωση της

αγαρόζης, και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μορίων DNA και RNA. Τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα, επομένως κινούνται προς το θετικό πόλο με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Για την απεικόνιση αλλά και την παρακολούθηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται η ουσία βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), η οποία σχηματίζει δεσμούς van der Waals με τα ζεύγη των αζωτούχων βάσεων του DNA. Όταν είναι συζευγμένο με το DNA το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει περίπου 20 φορές περισσότερο σε σχέση με την ασύζευκτη μορφή του, καθιστώντας έτσι εφικτή την ανίχνευση των τμημάτων DNA σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Για την ανάλυση των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα με περιεκτικότητα 1% αγαρόζης (0,6gr σε 60ml TAE - ΥΛΙΚΑ Ενότητα 10.3). Το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και τοποθετήθηκε στο κατάλληλο εκμαγείο έως ότου πήξει. Έγινε προετοιμασία των δειγμάτων DNA με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης (ΥΛΙΚΑ Ενότητα 10.3) και τοποθέτησή του στις εσοχές του πηκτώματος. Ακολούθησε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 120V για περίπου 30 λεπτά. Η πηκτική ηλεκτροφόρηση φωτογραφήθηκε με την συσκευή Imager Uvitec Cambridge υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

## 2.4 Έλεγχος ύπαρξης των μεταλλάξεων στα πλασμίδια pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R

### 2.4.1 Αλληλούχιση δειγμάτων πλασμιδιακού DNA

Οι πλασμιδιακοί φορείς που απομονώθηκαν σύμφωνα με την ενότητα 2.3.1 στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό την επιβεβαίωση ύπαρξης της επιθυμητής μετάλλαξης καθώς και για την επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας του ενθέματος. Η αλληλούχιση έγινε στην εταιρία Eurofins. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 6.

Νεοσυντιθέμενοι πλασμιδιακοί φορείς	Εκκινητής
pcDNA5 flag-HA-NFRKB- <u>K488R</u>	5' - ATC AGA GGC AGA GGA CCT G -3'

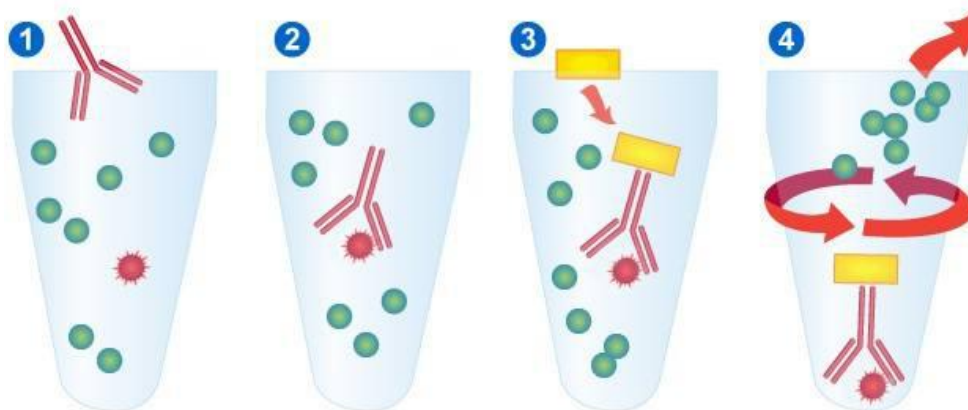
pcDNA5 flag-HA-NFRKB- <u>K1083R</u>	5'- ATT CCA CTC ACA GCC ACT AAC -3'

Πίνακας 6. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των μεταλλαγμάτων pcDNA5 flag-HA-NFRKB-K488R και pcDNA5 flag-HA-NFRKB-K1083R

### 3. Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών

#### 3.1 Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών είναι μία μέθοδος κατακρήμισης της πρωτεΐνης-στόχου μέσω της δέσμευσής της με ειδικό για αυτήν αντίσωμα. Ο διαχωρισμός της από τα υπόλοιπα προϊόντα της κυτταρικής λύσης έγινε μέσω της έμμεσης ή άμεσης δέσμευσης του συμπλόκου πρωτεΐνη-αντίσωμα με σφαιρίδια σεφαρόζης, τα οποία προσθέτουν μοριακό βάρος στο σύμπλοκο καθιστώντας έτσι δυνατή την απομόνωσή του μέσω φυγοκέντρησης. Η ανοσοκατακρημισμένη πρωτεΐνη εκλούεται από τα σφαιρίδια και στην συνέχεια αναλύθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.



Εικόνα 19. Βήματα ανοσοκατακρήμισης: (1) Προσθήκη ειδικού για την πρωτεΐνη αντισώματος, (2) Δέσμευση αντισώματος με πρωτεΐνη, (3) Δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνη-αντίσωμα-σφαιρίδιο σεφαρόζης, (4) Διαχωρισμός συμπλόκου από άλλα προϊόντα μέσω φυγοκέντρησης. Πηγή: (98)

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών: η ανοσοκατακρήμνιση σε αποδιατακτικές συνθήκες IP (Ενότητα 3.1.1) και η ανοσοκατακρήμνιση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες Co-IP (Ενότητα 3.1.2).

### *3.1.1 Ανοσοκατακρήμνιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες*

Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες αφορά στην κατεργασία των εκχυλισμάτων με ισχυρά απορρυπαντικά (SDS), τα οποία αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες και καταργούν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η απομόνωση των πρωτεϊνών-στόχων με ειδικό αντίσωμα και όχι και πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-στόχο. Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η απομόνωση όλων των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών από τα κυτταρικά λύματα με αντισώματα anti-SUMO2/3 (99).

#### **- Προετοιμασία κυτταρικών λυμάτων**

Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό DMEM+/+ από το πιάτο καλλιέργειας και ακολούθησε πλύση των κυττάρων HeLa με αποστειρωμένο PBS 1x με 20mM NEM, του οποίου ρόλος ήταν η αναστολή των SUMO-ισοπεπτιδασών. Απομακρύνθηκε το PBS, προστέθηκαν 150μl του διαλύματος λύσης 2x – 2% SDS (ΥΛΙΚΑ-Ενότητα 10.5) σε κάθε 10cm πιάτο καλλιέργειας και συλλέχθηκαν τα κυτταρικά λύματα, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θερμό υδατόλουτρο ώστε να μην κατακρημνιστεί το απορρυπαντικό SDS. Τα κυτταρικά λύματα υπέστησαν κατεργασία με υπερήχους για να διασπαστεί η χρωματίνη τους. Στην συνέχεια προστέθηκε διάλυμα DTT (1M) με τελική αραιώση 1:20 και το δείγμα θερμάνθηκε στους 95 °C για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος RIPA με PI mix και NEM 0,1% (1ml διαλύματος για κάθε 100μl δείγματος), ώστε η τελική συγκέντρωση του SDS να είναι 0,1%. Συλλέχθηκαν 100μl από το δείγμα για ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Ενότητα 3.3), στα οποία έγινε προσθήκη 33,3μl διάλυμα SDS Laemmli Loading buffer 4x (πιο αναλυτικά στην Ενότητα 3.2), θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 95 °C και αποθηκεύονται στους -20 °C. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα με την μέθοδο Bradford, όπως περιγράφεται παρακάτω.

#### **- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Με την μέθοδο Bradford προσδιορίζεται η συγκέντρωση όλων των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Η μέθοδος βασίζεται στην σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 σε

πρωτεϊνικά μόρια υπό όξινες συνθήκες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος της χρωστικής. Η αλλαγή αυτή ανιχνεύτηκε με την χρήση φασματοφωτομέτρου, στα 595 nm.

200 μL Bradford αραιώθηκαν έως το 1ml με υπερκάρθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Προστέθηκαν 5μl νερό ως αρνητικό control και 5μl δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595 nm. Τέλος, η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς της αλβουμίνης.

#### - Προετοιμασία σφαιριδίων, δέσμευση και τελική έκλυση των πρωτεϊνών

Με την παρούσα μέθοδο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση όλων των σουμοϋλιωμένων -από την SUMO2/3- πρωτεϊνών με στόχο την περαιτέρω ανάλυση της σουμοϋλίωσης του NFRKB και έτσι τα σφαιρίδια G που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συζευγμένα με αντίσωμα ενάντι της πρωτεΐνης SUMO2/3. Για την προετοιμασία των σφαιριδίων προστέθηκε περίπου ίσος όγκος με αυτόν του διαλύματος των σφαιριδίων από το διάλυμα RIPA + 0.1% SDS. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση των εξισορροπημένων σφαιριδίων με τα δείγματα.

Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000xg για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Τα σφαιρίδια συζευγμένα με τις σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες ξεπλύθηκαν τέσσερις φορές με διάλυμα RIPA που περιείχε 0,1% SDS, NEM και αναστολείς πρωτεασών. Η κάθε μία από αυτές τις πλύσεις περιλάμβανε ήπια ανάδευση των δειγμάτων με το διάλυμα RIPA, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν παρουσία 2x SDS (χωρίς DTT) για 15 λεπτά στους 37 °C. Με φυγοκέντρηση και προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου παραλήφθηκαν οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, ενώ τα σφαιρίδια απομακρύνθηκαν με το ίζημα. Τέλος προστέθηκε DTT με τελική συγκέντρωση 10mM και τα δείγματα βράστηκαν για 5 λεπτά, πριν την αποθήκευσή τους στους -20 °C.

#### *3.1.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες*

Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες αφορά στην κατεργασία των εκχυλισμάτων με μη ισχυρά απορρυπαντικά, τα οποία δεν προκαλούν την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διατήρηση και η κατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων μαζί με την πρωτεΐνη-στόχο. Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η απομόνωση του πιθανού συμπλόκου NFRKB – HIF1α.

#### - Προετοιμασία κυτταρικών λυμάτων

Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων μέσω αναρρόφησης και ακολούθησε πλύση με 5ml κρύο PBS 1x ώστε να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα. Μετά την πλήρη απομάκρυνση του PBS πραγματοποιήθηκε η λύση των κυττάρων με την προσθήκη του Co-IP-Buffer (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 10.5) στο πιάτο καλλιέργειας. Έγινε απόξεση των κυττάρων, συλλογή σε erpendorf και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12,000 xg στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε από το οποίο 5μL χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Ενότητα 3.1.1) στο κάθε δείγμα και άλλα 30 μL για την ανοσοαποτύπωση κατά Western (Ενότητα 3.3) που ακολούθησε. Για την τελευταία στα 30 μL δείγματος προστέθηκαν 10μl από το διάλυμα SDS Laemmli Loading buffer 4x (πιο αναλυτικά στην Ενότητα 3.2), το μείγμα θερμάνθηκε για πέντε λεπτά στους 95 °C και αποθηκεύτηκε στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση.

#### - Προετοιμασία σφαιριδίων, δέσμευση και τελική έκλυση των πρωτεϊνών

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία 10 μL σφαιριδίων εξισορροπήθηκαν με το Co-IP-Buffer στους 4 °C και επώαστηκαν με τα κυτταρικά λύματα για 3 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 1000xg για 5 λεπτά στους 4 °C και 4 πλύσεις των σφαιριδίων με το IP-Buffer. Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με την προσθήκη 50 μL διαλύματος SDS 2x και επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 37 °C. Ακολούθησαν φυγοκεντρήσεις του 1 λεπτού ώστε να συλλεχθεί σε νέο erpendorf το υπερκείμενο (εκλούσματα – ELUATES). Στα εκλούσματα προστέθηκαν 12 μL DTT 10mM και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά πριν αποθηκευτούν στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση.

#### 3.2 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η μέθοδος SDS-PAGE είναι μία μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο. Περιλαμβάνει το απορρυπαντικό SDS (θειικό δωδεκύλιο νάτριο), το οποίο αποδιατάσσει πρωτεΐνες και τις υπομονάδες τους και τους δίνει αρνητικό φορτίο όταν θερμανθεί μαζί τους. Έτσι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι βάσει του φορτίου τους.

### 3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται το διάλυμα SDS Laemmli Loading buffer 4x (ΥΛΙΚΑ-Ενότητα 10.5 και 10.6) το οποίο περιέχει το απορρυπαντικό SDS και το DTT (DL-Dithiothreitol), σκοπός των οποίων είναι η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε η τριτοταγής δομή τους να μην επηρεάσει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό βάρος. Πιο συγκεκριμένα το DTT σταθεροποιεί ένζυμα και πρωτεΐνες ενώ ταυτόχρονα διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς στις πρωτεΐνες.

### 3.2.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πρωτεϊνών πηκτώματα με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 7%. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο μέρη. Το πήκτωμα διαχωρισμού, που αποτελεί περίπου τα  $\frac{3}{4}$  του συνολικού πηκτώματος και η σύστασή του φαίνεται στον Πίνακα 7 και το πήκτωμα επιστοιίβαξης, το οποίο αποτελεί το υπόλοιπο  $\frac{1}{4}$  του πηκτώματος, του οποίου η σύσταση φαίνεται στον πίνακα 8.

Πήκτωμα Διαχωρισμού	Τελικός Όγκος = 5 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	1,25 mL
Ακρυλαμίδιο	0,875 mL
0,04% v/v APS	20 $\mu$ L
0,1% v/v TEMED	10 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2,845 mL

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού.

Πήκτωμα Επιστοιίβαξης	Τελικός Όγκος = 4 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	1 mL
Ακρυλαμίδιο	0,45 mL

0,04% v/v APS	25 $\mu$ L
0,1% v/v TEMED	12,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2,5 mL

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοίβαξης

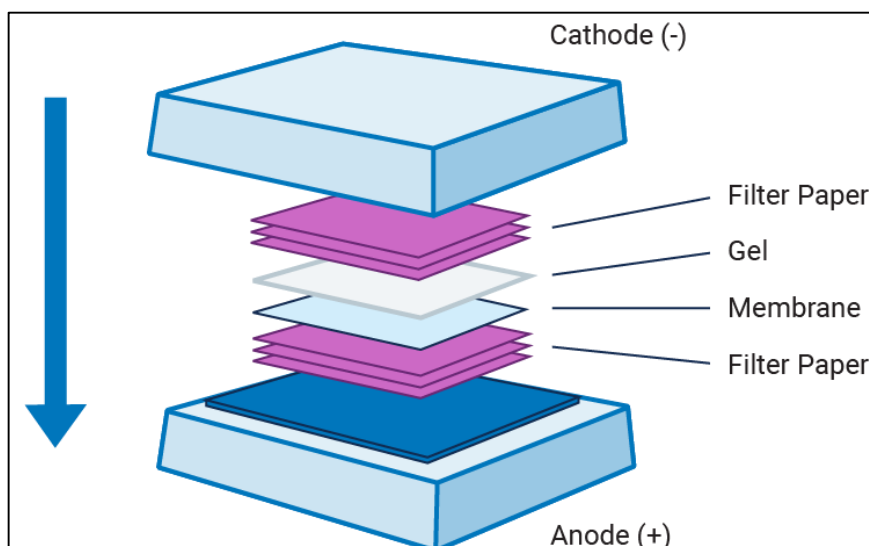
Οι θέσεις εισαγωγής των πρωτεϊνών σχηματίζονται στο πήκτωμα επιστοίβαξης με την χρήση ειδικής «χτένας» που παρέχεται με την συσκευή της BioRad.

Μετά την παρασκευή και τον πολυμερισμό του πηκτώματος αυτό μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με το Running Buffer 1x. Στην συνέχεια 10-20 $\mu$ g (αναλόγως την περίπτωση) πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα εισάγονται στις ειδικές θέσεις και ακολουθεί ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός, ο οποίος πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 100 Volt για 70 λεπτά. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αναλύεται περαιτέρω με ηλεκτρομεταφορά και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

### 3.3 Ηλεκτρομεταφορά και Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Στην συγκεκριμένη τεχνική επιτυγχάνεται μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η μεμβράνη που χρησιμοποιείται είναι η μεμβράνη PVDF, η οποία επιτρέπει την ισχυρή δέσμευση των πρωτεϊνών και την καθαρότητα του σήματος κατά την επικείμενη εμφάνιση. Πριν την χρήση της η μεμβράνη ενεργοποιείται με καθαρή μεθανόλη για 5 λεπτά. Η διάταξη των υλικών που χρησιμοποιούνται φαίνεται στην εικόνα 4 και είναι η εξής: 3 χαρτιά Whatman, μεμβράνη PVDF, πήκτωμα ακρυλαμιδίου, 3 χαρτιά Whatman (Εικόνα 20). Τοποθετούνται αρχικά όλα τα υλικά σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 10.6) το οποίο περιέχει 10% μεθανόλη. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή στα 80mA για 70 λεπτά.





Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών

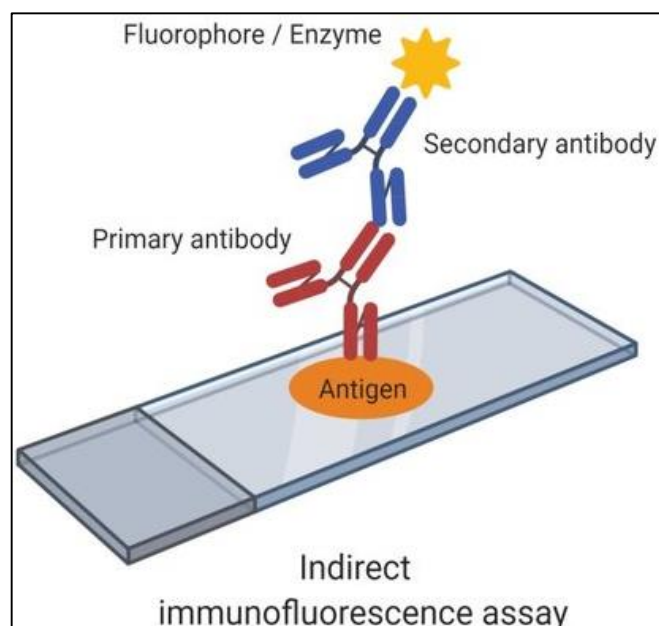
### 3.3.1 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Μετά την ηλεκτροαποτύπωση στην μεμβράνη που περιγράφεται παραπάνω η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS 1x και επώαζεται σε γάλα 5% σε PBS-tween ώστε η καζεΐνη του γάλακτος να μπλοκάρει μη ειδικές θέσεις δέσμησης πρωτεϊνών. Στην συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα με το πρώτο αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη ενδοαφέροντος) σε γάλα ή σε PBS-tween, υπό ανάδευση ολονύκτια στους 4 °C για την ειδική δέσμηση του αντισώματος στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται 3 δεκάλεπτες πλύσεις με PBS-tween και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, ειδικό ενάντι του πρώτου αντισώματος, διαλυμένο σε γάλα 5% για μία ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το 2ο αντίσωμα είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση του χρένου HRP. Μετά το πέρας της δεύτερης επώασης πραγματοποιούνται 3 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS-tween.

Η ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης γίνεται με την προσθήκη του διαλύματος Luminata Crescendo Western HRP substrate, το οποίο περιέχει λουμινόλη. Η λουμινόλη παρουσία  $H_2O_2$  και του ενζύμου HRP διασπάται σε μόριο με κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας απελευθερώνοντας φωτόνια και επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης οπτικοποιούνται με την χρήση του Imager Uvitec Cambridge.

#### 4. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Κατά την τεχνική αυτή τα κύτταρα αναπτύσσονται και μονιμοποιούνται πάνω σε γυάλινη καλυπτρίδα, ακολουθεί η διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών και στην συνέχεια επωάζονται αρχικά με το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη αντίσωμα και έπειτα με το δεύτερο αντίσωμα (ειδικό για το πρώτο αντίσωμα) συζευγμένο με το φθοριόχρωμα (Εικόνα 21) Ακολουθεί ανίχνευση του φθοριοχρώματος, δηλαδή έμμεσα ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης, με ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 21. Απεικόνιση της αρχής του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το αντιγόνο δεσμεύεται ειδικά με το πρώτο αντίσωμα. Ακολουθεί σύνδεση με δεύτερο αντίσωμα ειδικό ενάντι του πρώτου αντισώματος και ανίχνευση με φθορισμό.

Μία μέρα πριν το πείραμα κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν έως ότου καλύψουν το περίπου 70% της επιφάνειας του πιάτου και των γυάλινων καλυπτρίδων. Έγινε πλύση των πιάτων με PBS 1x και αφαίρεση των καλυπτρίδων. Σε κάθε καλυπτρίδα προστέθηκε 1ml 3.7% φορμαλδεΐδης διαλυμένη σε PBS 1x για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στις καλυπτρίδες. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS 1x και προσθήκη 1ml 0,2% Triton X-100 σε PBS 1x για πέντε λεπτά στον πάγο ώστε να επιτευχθεί η διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS 1x και προστέθηκε 3% BSA σε PBS-tween 0,1% (αποστειρωμένο μέσω φιλτραρίσματος) για μία ώρα με σκοπό το μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων δέσμευσης. Έγινε αφαίρεση του

διαλύματος για το μπλοκάρισμα και οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με 40μl του διαλύματος του πρώτου αντισώματος αραιωμένο σε BSA 1%, ολονύκτια (η αραιώση του κάθε αντισώματος αναφέρεται στον Πίνακα 2).

Την επόμενη μέρα οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με 1% BSA σε PBS-tween 0,1% και επωάστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα (αντισώματα Alexa 488, 594 και 647) με αραιώση 1:1000 σε 1% BSA σε PBS-tween 0,1% για μία ώρα. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 1% BSA σε PBS-tween 0,1%, μία πλύση με PBS 1x και μία τελευταία πλύση με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια προστέθηκε σε κάθε καλυπτρίδα 7μl από διάλυμα που περιέχει MOWIOL και DAPI και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Η ουσία MOWIOL χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό ενός μόνιμου δεσμού μεταξύ καλυπτρίδας και πλάκας, ενώ το μόριο 4',6-diamidino-2-phenylindole ή αλλιώς DAPI είναι μια φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται ισχυρά με περιοχές πλούσιες στις βάσεις αδενίνη – θυμίνη στο DNA και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της χρωματίνης και εμμέσως του πυρήνα των κυττάρων. Έγινε παρατήρηση των καλυπτρίδων και ελήφθησαν φωτογραφίες με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss και με το πρόγραμμα Zen, οι οποίες επεξεργάστηκαν περαιτέρω με το πρόγραμμα Fiji.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

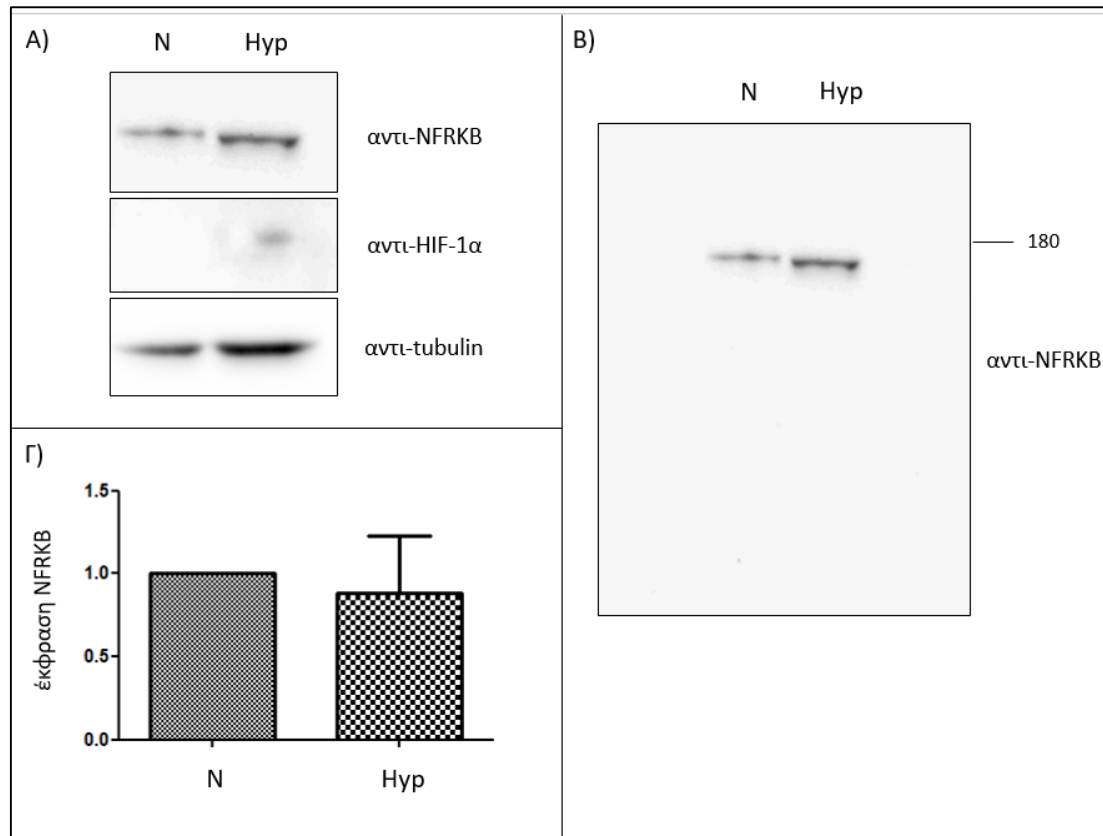
### 1. Χαρακτηρισμός της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης NFRKB στην υποξία

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Ενότητα 2.3) προηγούμενα δεδομένα του Εργαστηρίου Βιοχημείας [72] υποστηρίζουν πως η πρωτεΐνη NFRKB ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών, των οποίων το πρότυπο σουμοϋλίωσης αλλάζει σε συνθήκες υποξίας (1% O<sub>2</sub>, 48h). Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου του NFRKB στην κυτταρική απόκριση στην υποξία (ερευνητική γραμμή του εργαστηρίου) κρίθηκε αρχικά σκόπιμο να χαρακτηριστεί η έκφραση του ενδογενούς NFRKB σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας σε πρωτεϊνικό επίπεδο, να μελετηθεί η επίδραση της υποξίας στον ενδοκυττάριο εντοπισμό του καθώς και η πιθανότητα αλληλεπίδρασής του με την HIF-1α υπομονάδα.

#### 1.1 Μελέτη της έκφρασης του NFRKB σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό του παράγοντα NFRKB ήταν η μελέτη της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) ή υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 24 ώρες, λύθηκαν και τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε κατάλληλη επεξεργασία ώστε να ακολουθήσει SDS ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western (ΜΕΘΟΔΟΙ – Ενότητα 3.2 και 3.3).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22Α και 22Β η ενδογενής πρωτεΐνη NFRKB εκφράζεται σε νορμοξία και υποξία στο αναμενόμενο μοριακό βάρος τα 170 kDa. Η αναγνώριση της από το αντίσωμα έναντι του NFRKB φαίνεται να είναι ειδική καθώς δεν εμφανίζονται περαιτέρω ζώνες αλλά μόνο μία στο αναμενόμενο μέγεθος (Εικόνα 22Β, όπου φαίνεται όλη η μεμβράνη). Η έκφρασή του NFRKB παρέμεινε σταθερή ανάμεσα σε νορμοξία και υποξία, όπως φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση κατά Western αλλά και από την ποσοτικοποίηση (Εικόνα 22Γ) της έκφρασης του NFRKB σε σχέση με την τουμπουλίνη από τρία πειράματα. Η έκφραση του παράγοντα HIF (Εικόνα 22Α) είναι εμφανής μόνο στην υποξία όπως αναμενόταν και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τις υποξικές συνθήκες του πειράματος.



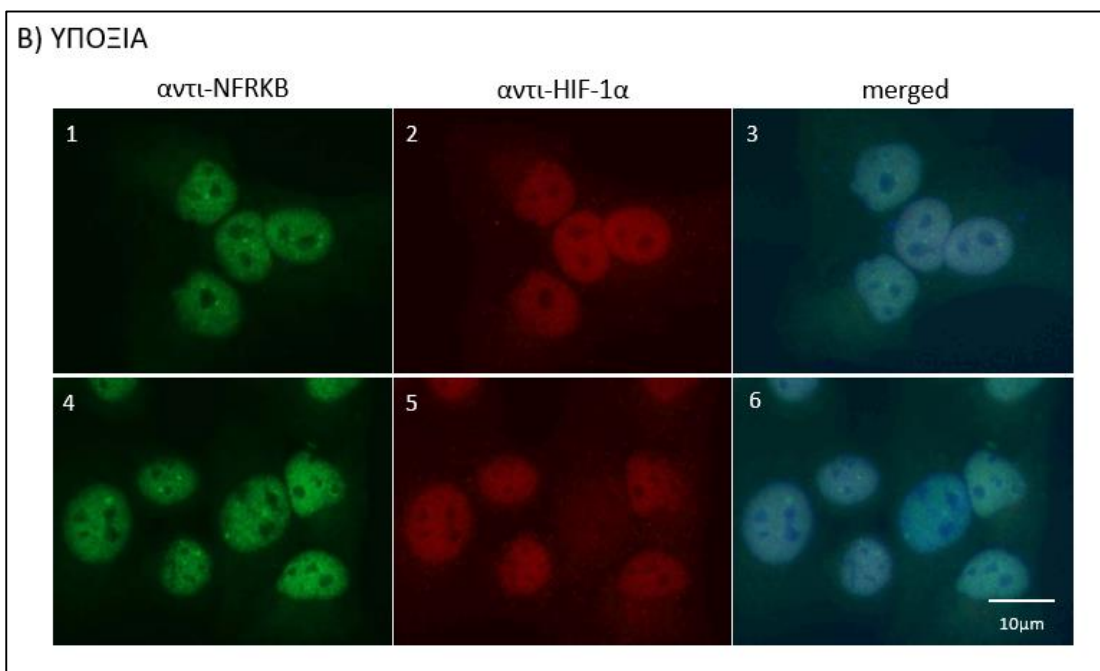
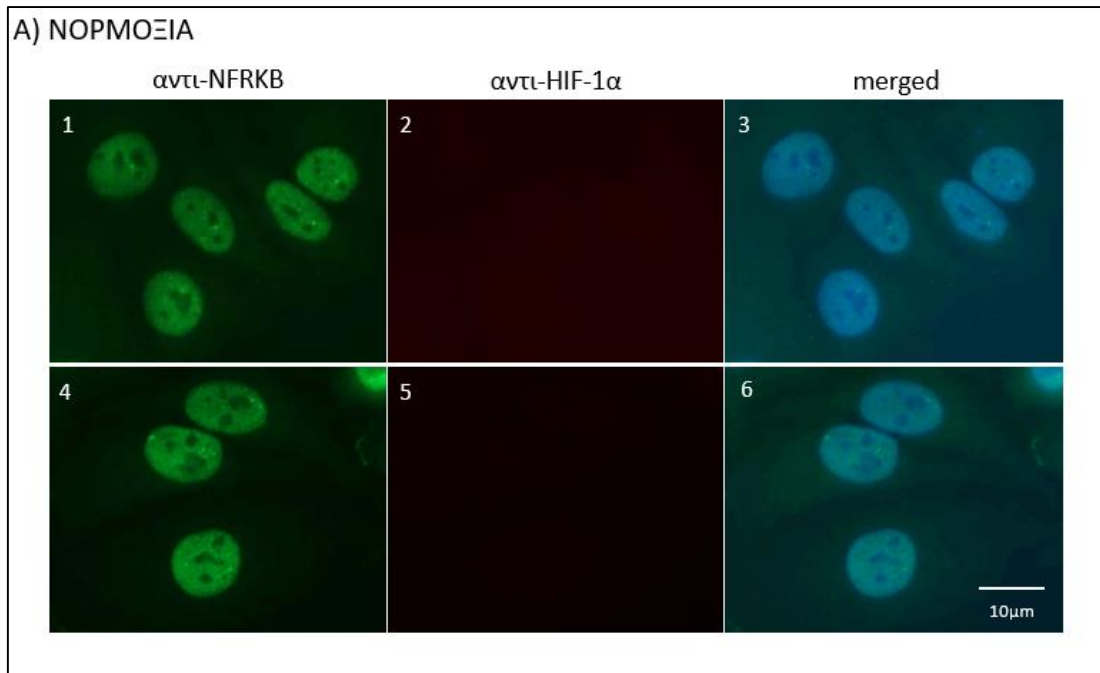
Εικόνα 22. Προσδιορισμός της έκφρασης του ενδογενούς NFRKB με ανοσοαποτύπωση κατά Western. A) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα ειδικά για τον NFRKB, για την υπομονάδα HIF-1α και για την τουμπουλίνη. B) Ανοσοανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης NFRKB με αντίσωμα ειδικό για αυτήν, όπου φαίνεται η πλήρης μεμβράνη. Γ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του NFRKB από δύο πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφορτώματος. Δεξιά εμφανίζονται τα μοριακά βάρη.

## 1.2 Μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού του NFRKB σε νορμοξία και υποξία

Επόμενο βήμα για τον χαρακτηρισμό του NFRKB ήταν να μελετηθεί ο εντοπισμός του σε καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα του NFRKB που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενη ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 1) και επιβεβαιώνει ότι αναγνωρίζει ειδικά τον NFRKB. Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες και επωάστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες. Ακολούθησε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4 (ΜΕΘΟΔΟΙ).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στην Εικόνα 23. Παρατηρήθηκε ότι η ενδογενής πρωτεΐνη NFRKB εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα

23A1, A4) , κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο για μεταγραφικό παράγοντα. Σε συνθήκες υποξίας ο εντοπισμός δεν άλλαξε και παρέμεινε πυρηνικός (Εικόνα 23B1, B4). Επίσης τα επίπεδα έκφρασης του NFRKB δεν μεταβλήθηκαν πιστοποιώντας τα προηγούμενα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης. Η έκφραση της υπομονάδας HIF-1α εντοπίζεται όπως αναμένεται μόνο σε υποξία (Εικόνα 23B2, B5) και πιστοποιεί ότι επιτεύχθηκαν οι συνθήκες υποξίας στα αντίστοιχα πειράματα.



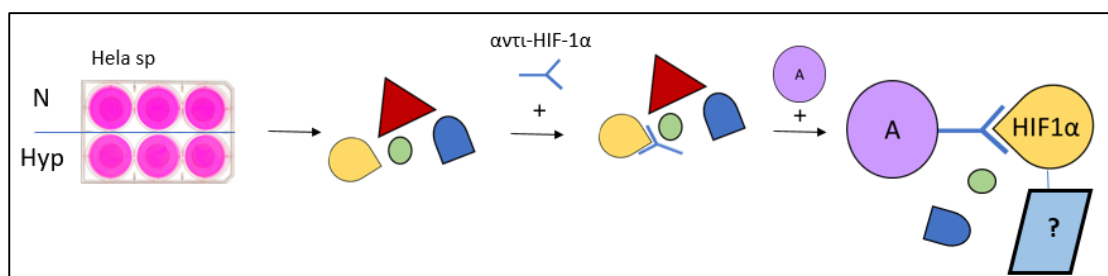
Εικόνα 23. Έλεγχος ενδοκυττάριου εντοπισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης NFRKB σε νορμοξία και υποξία με ανοσοφθορισμό σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Με πράσινο σημαίνεται η υποκυτταρική κατανομή του NFRKB (A1, A4, B1, B4), με κόκκινο του HIF-1α (A2, A5, B2, B5) και με μπλε έχουν σημειωθεί οι πυρήνες με χρώση DAPI (A3, A6, B3, B6)

### 1.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του παράγοντα NFRKB με την HIF-1α υπομονάδα

Προκαταρκτικά δεδομένα (αδημοσίευτα αποτελέσματα) του Εργαστηρίου δείχνουν πως ο NFRKB επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων στόχων της υποξίας και του HIF-1α. Για την μελέτη της ύπαρξης αλληλεπίδρασης του παράγοντα NFRKB με την α υπομονάδα του HIF-1 πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, κατά τα οποία ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις:

#### 1.3.1 Ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α σε μη αποδιατακτικές συνθήκες για την ανίχνευση της σύνδεσης του ενδογενή NFRKB σε υποξία

Αρχικά κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας για 24 ώρες και στην συνέχεια έγινε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα ειδικό για τον HIF-1α (Εικόνα 24). Ακολούθησε ανάλυση των συνολικών εκχυλισμάτων των κυττάρων (INPUTS) και των εκλουσμάτων (ELUATES) ανοσοκατακρήμνισης με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

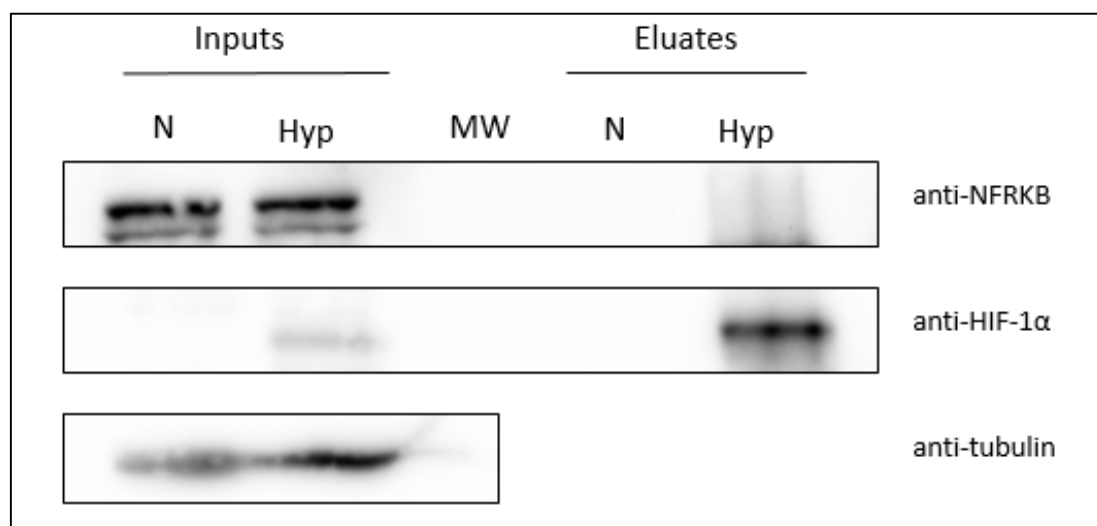


Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της ανοσοκατακρήμνισης του ενδογενούς HIF-1α σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε νορμοξία και υποξία.

Ανάλυση INPUTS: Ο NFRKB φάνηκε να ανιχνεύεται στα inputs, παρουσιάζοντας παρόμοια επίπεδα έκφρασης μεταξύ νορμοξίας και υποξίας, στα περίπου 180kDa. Η υπομονάδα α του HIF ανιχνεύτηκε μόνο στις συνθήκες υποξίας (inputs, eluates) επιβεβαιώνοντας την επίτευξη της συνθήκης έλλειψης οξυγόνου (Εικόνα 25, αριστερά).

Ανάλυση ELUATES: Ο HIF-1α φαίνεται να κατακρημνίστηκε επιτυχώς μόνο στις συνθήκες της υποξίας όπου και εκφράζεται, δείχνοντας έτσι ότι η ειδική ανοσοκατακρήμνιση επιτεύχθει

(Εικόνα 25, δεξιά). Ο NFRKB δεν ανιχνεύθηκε στα εκλούσματα όπου ο HIF-1α ήταν παρών και, δείχνοντας πως πιθανά δεν αλληλεπιδρά με τον HIF-1α ή η αλληλεπίδραση, αν υπάρχει, είναι αρκετά ασθενής για να ανιχνευθεί με τις παρούσες συνθήκες του πειράματος.

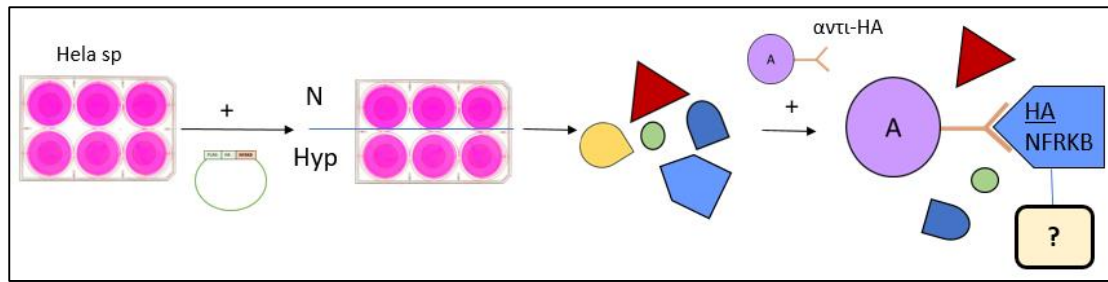


Εικόνα 25. Αποτελέσματα ανοσοκατακρήμνισης του ενδογενούς HIF-1α σε μη αποδιατακτικές συνθήκες για την ανίχνευση της σύνδεσης του ενδογενή NFRKB: σε συνθήκες νορμοξίας (N) και υποξίας (Hyp). Δεξιά φαίνεται η ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και αριστερά η ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντίσωμα ειδικό για τον NFRKB, αντίσωμα ειδικό για τον HIF-1α και αντίσωμα ειδικό για την τουμπουλίνη

### 1.3.2 Ανοσοκατακρήμνιση με FLAG-HA-NFRKB για την ανίχνευση του ενδογενή HIF1α σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Σε μία δεύτερη προσέγγιση έγινε επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB wt (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 1.2), ο οποίος φέρει cDNA για την έκφραση ανασυνδυασμένου NFRKB, συζευγμένου με τους επίτοπους FLAG και HA. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες, κυτταρική λύση και ανοσοκατακρήμνιση με σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα ενάντι του επιτόπου HA (Εικόνα 26). Τα εκχυλίσματα και τα εκλούσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν περαιτέρω με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

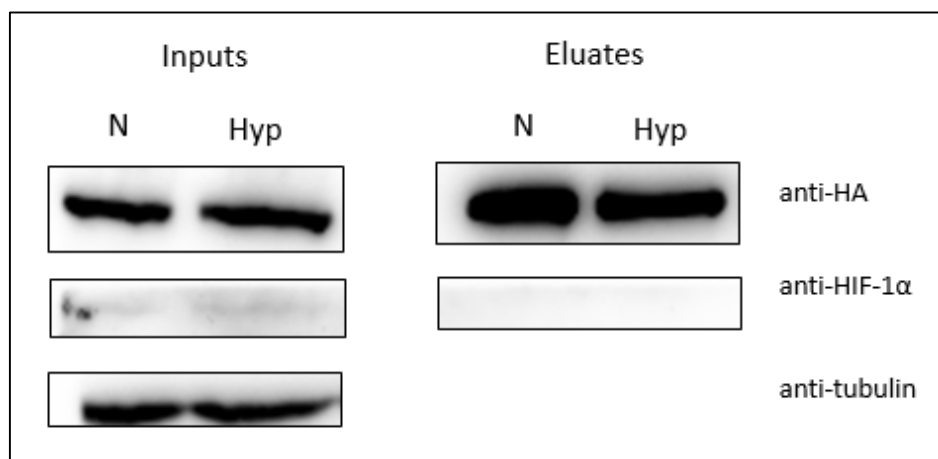




Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της ανοσοκατακρήμνισης του FLAG-HA-NFRKB σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε νορμοξία και υποξία

Ανάλυση INPUTS: Ο υπερεκφρασμένος NFRKB, που ανιχνεύεται μέσω του επιτόπου HA, φαίνεται να εκφράζεται σε ίση ποσότητα και στις δύο συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Κατά την ανίχνευση της υπομονάδας α του HIF εμφανίστηκε μία αχνή ζώνη στην συνθήκη της υποξίας στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (Εικόνα 27, αριστερό πάνελ).

Ανάλυση ELUATES: Ο NFRKB φαίνεται να έχει κατακρημνιστεί επιτυχώς σε νορμοξία και υποξία, επιβεβαιώνοντας ότι η ειδική ανοσοκατακρήμνιση επιτεύχθει (Εικόνα 27, δεξί πάνελ). Ο HIF-1α δεν ανιχνεύτηκε στα εκλούσματα ούτε σε νορμοξία ούτε σε υποξία. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει σύνδεση μεταξύ των δύο παραγόντων ή η σύνδεση αν υπάρχει είναι αρκετά ασθενής για να ανιχνευθεί και επιβεβαιώνει το προηγούμενο αποτέλεσμα (Εικόνα 25).



Εικόνα 27. Αποτελέσματα ανοσοκατακρήμνισης του FLAG-HA-NFRKB wt σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: σε συνθήκες νορμοξίας (N) και υποξίας (Hyp). Δεξιά φαίνεται η ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και αριστερά των εκλουσμάτων (ELUATES). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν α) αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο HA, β) αντίσωμα ειδικό για τον HIF-1α και γ) αντίσωμα ειδικό για την τουμπουλίνη.

## 2. Μελέτη της σουμοϋλίωσης του παράγοντα NFRKB

Όπως αναφέρθηκε ήδη στην ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Ενότητα 2.3 από προηγούμενη δουλειά του Εργαστηρίου Βιοχημείας μέσω πρωτεομικής ανάλυσης [72] βρέθηκε πως ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από την πρωτεΐνη SUMO2/3 και μάλιστα η σουμοϋλίωση αυτή μειώνεται σε συνθήκες υποξίας. Παρ' όλα αυτά ο ρόλος της σουμοϋλίωσης τόσο στην νορμοξία όσο και σε υποξικές συνθήκες παραμένει άγνωστος. Για την διεξοδική μελέτη της σουμοϋλίωσης του NFRKB σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης σε πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης με σκοπό την εύρεση μίας μορφής του NFRKB που δεν μπορεί να σουμοϋλιωθεί (SUMO deficient form). Τα μεταλλάγματα που θα προκύψουν θα χαρακτηριστούν όσον αφορά την έκφρασή τους, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους και τον βαθμό σουμοϋλίωσής τους και θα χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως εργαλεία έρευνας.

### 2.1 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης NFRKB οι οποίες στερούνται την ικανότητα σουμοϋλίωσης

Για την εύρεση πιθανών θέσεων σουμοϋλίωσης για την πρωτεΐνη NFRKB και για την επιλογή των αμινοξέων που πρόκειται να μεταλλαχθούν έγινε αρχικά έρευνα σε δεδομένα πρωτεομικών αναλύσεων σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών ή μοτίβων σουμοϋλίωσης (Εικόνα 28). Εμφανίστηκαν δύο πιθανές λυσίνες και υποψήφιες θέσεις για σουμοϋλίωση του NFRKB, η K488 και η K1083.

ID	Gene	Sites	Position (Sites)	Uniprot	Uniprot per positio	Protein	Synonyms
642	FOXC2	2	214;227	Q99958		Forkhead box protein C2 (Forkhead-related prot	FKHL14;MF
650	FOXP4	2	175;246	Q81VH2		Forkhead box protein P4 (Fork head-related prot	FKHLA
689	GDI2	2	173;269	P50395		Rab GDP dissociation inhibitor beta (Rab GDI b	RABGDIB
704	GNB2L1	2	130;271	P63244		Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Cell	
758	HDGF	2	11;80	P51858		Hepatoma-derived growth factor (HDGF) (High n	HMG1L2
942	KLF3	2	10;198	P57682		Kruppel-like factor 3 (Basic krueppel-like factor	BKLF
1219	NFRKB	2	488;1083	Q6P4R8		Nuclear factor related to kappa-B-binding protein	INO80G
1224	NKAP	2	283;305	Q8N5F7		NF-kappa-B-activating protein	
1267	NSRP1	2	210;239	Q9H0G5		Nuclear speckle splicing regulatory protein 1 (Co	CCDC55;NS
1487	PSMC1	2	175;430	P62191		26S protease regulatory subunit 4 (P26s4) (26S	proteasome
1760	SF3B6	2	7;29	Q9Y3B4		Splicing factor 3B subunit 6 (Pre-mRNA branch	εSAP14;SF3
1904	SUPT7L	2	271;276	O94864		STAGA complex 65 subunit gamma (Adenocarc	KIAA0764
1943	TDP1	2	111;139	Q9NUW8		Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tyr-DNA phosphodiester	
2130	WDR5	2	7;46	P61964		WD repeat-containing protein 5 (BMP2-induced	:BIG3
2239	ZMYM3	2	786;920	Q14202		Zinc finger MYM-type protein 3 (Zinc finger prote	DXS6673E;
443	DDX46	2	186;779	Q7L014		Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	KIAA0801
1000	LLPH	2	67;74	Q9BRT6		Protein LLP homolog (Protein LAPS18-like)	C12orf31

Εικόνα 28. Πίνακας πρωτεϊνών με ικανότητα σουμοϋλίωσης και πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης. Αναγράφονται το όνομα του γονιδίου, οι πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης, το κωδικό όνομα της πρωτεΐνης στην βάση δεδομένων Uniprot, το όνομα της πρωτεΐνης και συνώνυμά της. Τα δεδομένα για τον NFRKB είναι στο γκρι πλαίσιο, όπου στην τρίτη στήλη φαίνονται οι πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης K488 και K1083. Πηγή: (100)

Για περαιτέρω επιβεβαίωση των θέσεων αυτών στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του διαδικτυακού εργαλείου SUMO-GPS, το οποίο βρίσκει μοτίβα σουμοϋλίωσης και πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης βάσει της πεπτιδικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πολλές πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης, μεταξύ των οποίων βρίσκονταν και οι θέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, δίνοντας μεγάλη πιθανότητα τροποποίησης από την SUMO (Εικόνα 29).

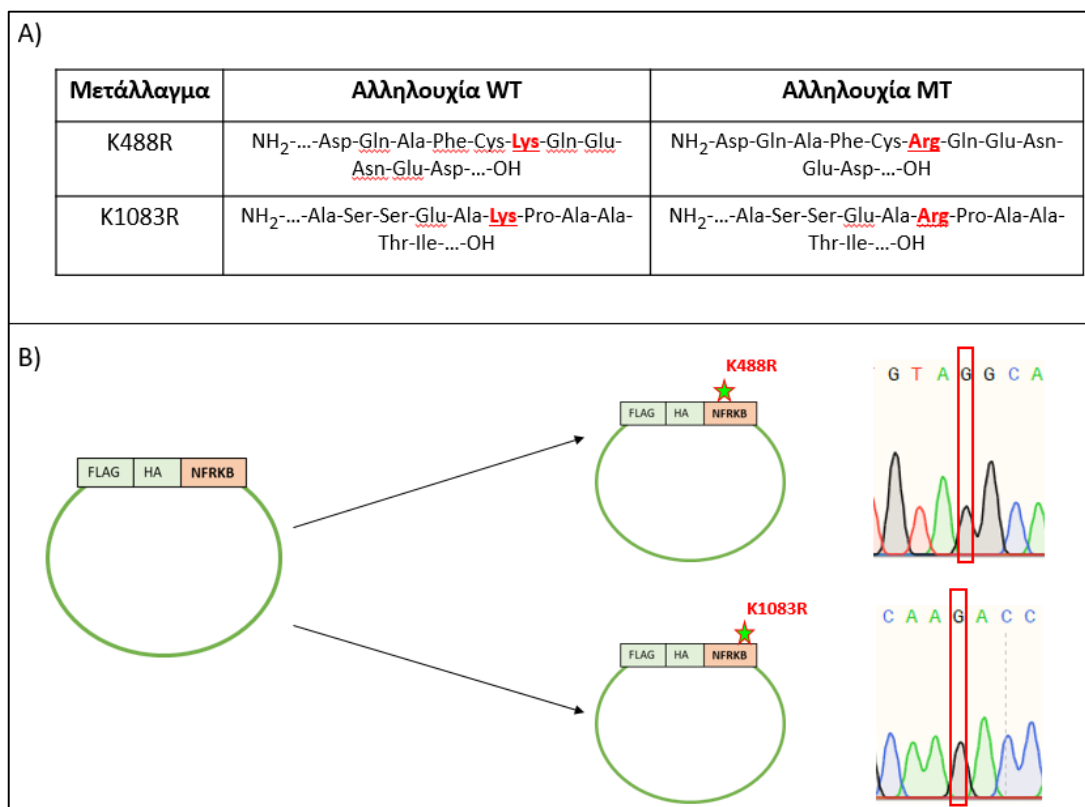
Ταυτότητα	Θέση	Πεπτιδική αλληλουχία	Score
sp Q6P4R8 NFRKB_HUMAN Nuclear factor related to kappa-B- binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NFRKB PE=1 SV=2	488	TKDQAFCKQENEDSS	4.47
sp Q6P4R8 NFRKB_HUMAN Nuclear factor related to kappa-B- binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NFRKB PE=1 SV=2	1083	TVASSEAKPAATIRI	1.691

Εικόνα 29. Πίνακας αποτελεσμάτων από το εργαλείο SUMO-GPS. Prediction of SUMOylation Sites & SUMO-binding Motifs. Αναγράφονται η ταυτότητα της πεπτιδικής αλληλουχίας που εισήχθη, η πιθανή θέση σουμοϋλίωσης και η πεπτιδική της αλληλουχία.

Η λυσίνη K488 βρίσκεται στην πεπτιδική αλληλουχία C-K-X-E που ομοιάζει το τυπικό μοτίβο ψKXE/D (ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Ενότητα 2.2.2A) σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών, ενώ η λυσίνη στην θέση σουμοϋλίωσης του K1083 δεν βρίσκεται σε κάποιο γνωστό μοτίβο σουμοϋλίωσης. Αποφασίστηκε να γίνει μετάλλαξη τόσο του K488 όσο και του K1083 και έλεγχος της ικανότητας σουμοϋλίωσης των δύο πρωτεϊνών που θα προκύψουν. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το αμινοξύ που θα αντικαθιστούσε την λυσίνη-στόχο θα έπρεπε να παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες ώστε να μην επηρεαστεί η δομή του NFRKB, επιλέχθηκε η μετάλλαξη να προκαλέσει την αλλαγή αμινοξέος σε αργινίνη. Η αργινίνη παρόλο που είναι θετικά φορτισμένη και άρα διατηρείται τοπικά το φορτίο της πρωτεΐνης, δεν μπορεί να σουμοϋλιωθεί. Οι αρχικές αλληλουχίες wt καθώς και οι αναμενόμενες αλληλουχίες K488R-mutant και K1083R-mutant παρουσιάζονται στην Εικόνα 30A.

Οι επιθυμητές μεταλλάξεις έγιναν με την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω νουκλεοτιδίου όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (ΜΕΘΟΔΟΙ – Ενότητα 2.2.1)

με εκμαγείο για την δημιουργία των μεταλλάξεων τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB wt (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 1.2) και κατάλληλους εκκινητές (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 2). Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα E.coli μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της PCR μεταλλαξιγένεσης και από τις αποικίες που προέκυψαν απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά πλασμιδιακά DNA για κάθε μετάλλαγμα από υγρή καλλιέργεια. Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης τρία δείγματα DNA από τρεις διαφορετικές αποικίες για κάθε μετάλλαγμα στάλθηκαν για αλληλούχηση (ΜΕΘΟΔΟΙ – Ενότητα 2.4.1). Τα αποτελέσματα ήταν θετικά ως προς την παρουσία των μεταλλαγμένων μορφών του NFRKB για δύο από τα τρία δείγματα για το μετάλλαγμα K488R και για όλα τα δείγματα για το μετάλλαγμα K1083R. Τα πλασμίδια που προέκυψαν από τις δύο διαφορετικές μεταλλαξιγένεσεις με PCR είναι τα pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-K1083R (ΥΛΙΚΑ – Ενότητες 1.3 και 1.4) και φαίνονται στην Εικόνα 30B. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα η αλληλούχηση έδειξε πως και στα δύο μεταλλάγματα K488R και K1083R έχει αντικατασταθεί η βάση αδενίνη με την γουανίνη στη επιθυμητή θέση.



Εικόνα 30. Α) Πεπτιδικές αλληλουχίες του NFRKB αγρίου-τύπου (wt) στην περιοχή πιθανής σουμοϋλίωσης και αναμενόμενες αλληλουχίες που θα προκύψουν από την μετάλλαξη λυσίνης στις δύο πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης K488R και K1083R. Β) Σχηματική απεικόνιση της PCR μεταλλαξιγένεσης: το pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB WT (αριστερά) χρησιμοποιήθηκε ως καλούπι και

*προέκυψαν τα μεταλλάγματα K488R και K1083R (δεξιά). Η επιβεβαίωση των μεταλλάξεων έγινε με την βοήθεια αλληλούχησης, όπου φαίνονται ενδεικτικά τα διαγράμματα των αναμενόμενων κορυφών των νουκλεοτιδίων που αντικαταστάθηκαν στις περιοχές των μεταλλάξεων.*

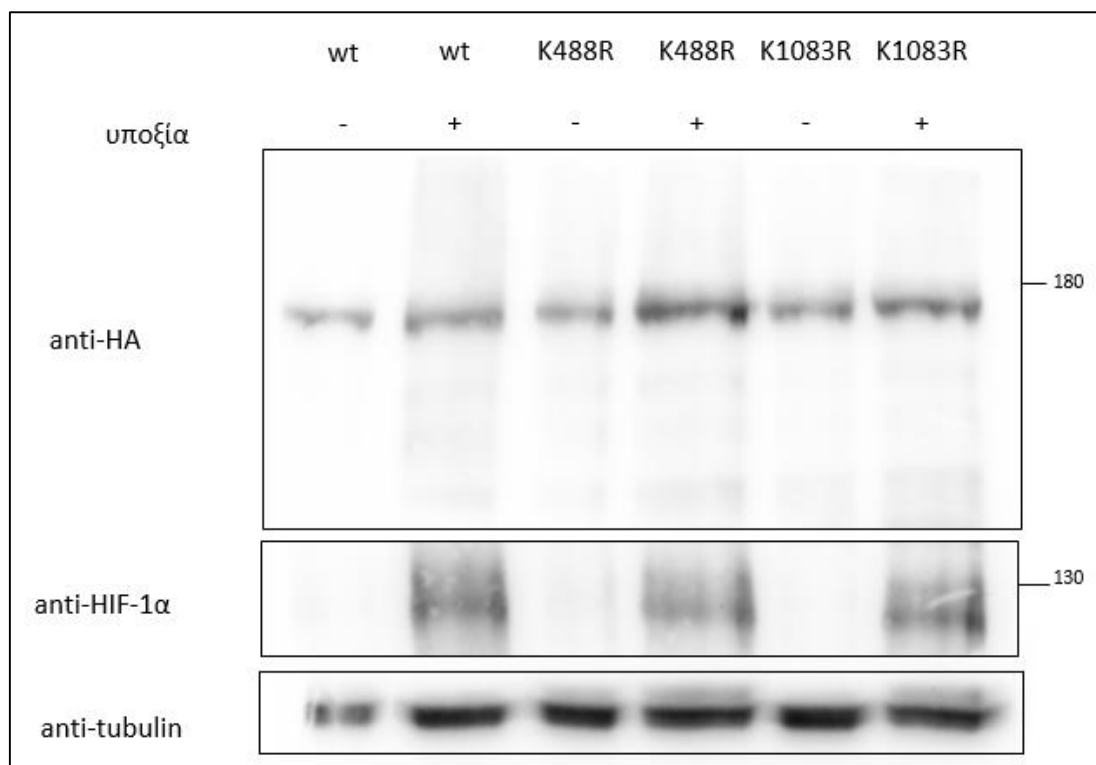
## 2.2 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών του NFRKB σε νορμοξία και υποξία:

Για τον χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που προκύπτουν από τα πλασμίδια pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-K1083R έγιναν πειράματα επιμόλυνσης των φορέων σε κύτταρα HeLa για την έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του NFRKB, ανοσοαποτύπωση κατά Western και έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης και του ενδοκυττάριου εντοπισμού τους.

### *2.2.1 Οι μεταλλαγμένες μορφές του NFRKB εκφράζονται όπως η ενδογενής πρωτεΐνη αγρίου-τύπου*

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB WT, pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K1083R, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες και ακολούθησε κυτταρική λύση, ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Με την χρήση των αντισωμάτων έναντι του επιτόπου HA ανιχνεύτηκαν οι τρεις μορφές του NFRKB (wt, K488R και K1083R) και φάνηκε ότι και οι τρεις εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε νορμοξία και υποξία (Εικόνα 31, πάνω πάνελ). Οι συνθήκες υποξίας επιτεύχθηκαν επίσης στο παραπάνω πείραμα, γεγονός που φαίνεται από την παρουσία του HIF-1α όταν χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντι του για την ανίχνευσή του (Εικόνα 31, μεσαίο πάνελ).

Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού φάνηκε ότι και οι δύο μεταλλαγμένες πλήρους μεγέθους μορφές του NFRKB FLAG-HA-NFRKB K488R και FLAG-HA-NFRKB K1083R εκφράζονται σε ίση περίπου ποσότητα με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου σε νορμοξία και υποξία στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Φαίνεται επιπλέον πως η έκφραση είναι σταθερή χωρίς ύπαρξη προϊόντων πρωτεόλυσης.



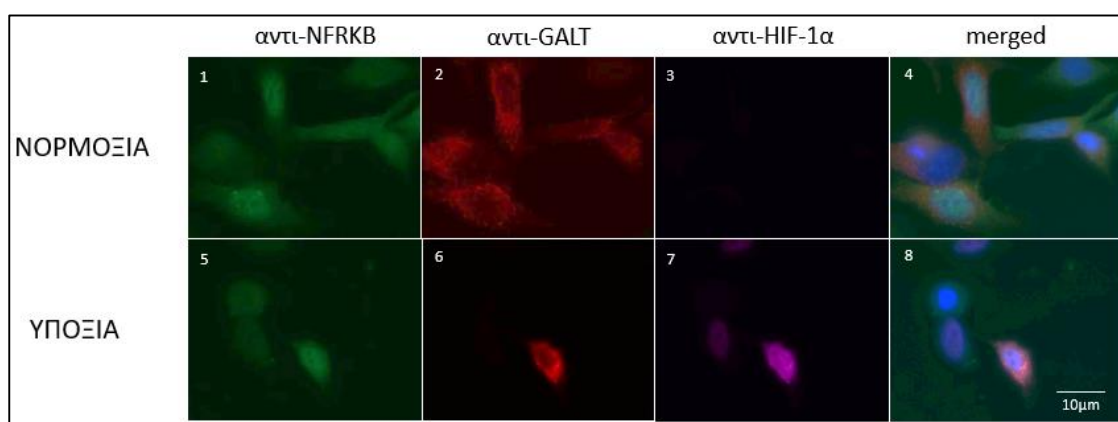
Εικόνα 31. Προσδιορισμός της έκφρασης των πρωτεϊνών NFRKB – K488R και NFRKB – K1083R σε σύγκριση με τον NFRKB wt με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Ανίχνευση των πρωτεϊνών NFRKB με αντισώμα ειδικό για τον επίτοπο HA.

### 2.2.2 Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των μεταλλαγμένων μορφών K488R και K1083R του NFRKB είναι παρόμοιος με την μορφή αγρίου τύπου σε νορμοξία και υποξία

Επόμενο βήμα ήταν η παρατήρηση του ενδοκυττάριου εντοπισμού τόσο της πρωτεΐνης NFRKB αγρίου τύπου όσο και των μεταλλαγμένων μορφών της και έτσι ακολούθησαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση του NFRKB wt σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Κατά την επιμόλυνση των κυττάρων χορηγήθηκε επιπλέον το πλασμίδιο pcDNA GALT RFP (ΥΛΙΚΑ – Ενότητα 1.5) για την έκφραση του ενζύμου ουριδυλυλτρανσφεράση της 1-φωσφορικής γαλακτόζης (GALT) και συνεντοπισμό του στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μιας και ο NFRKB έχει αναφερθεί ότι σε φυσιολογικά κύτταρα του εγκεφάλου εντοπίζεται εκεί (ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Ενότητα 3.1).

Παρατηρήθηκε ότι ο υπερεκφρασμένος NFRKB συνεντοπίζεται με την χρωστική DAPI , που σημαίνει ότι ο NFRKB βρίσκεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 32.1, 32.5 και 32.4, 32.8). Ανιχνεύεται επίσης αχνό σήμα και στο κυτταρόπλασμα, κάτι που μπορεί

να οφείλεται στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα. Λόγω του ότι δεν παρατηρήθηκε ειδικός συνεντοπισμός της πρωτεΐνης HA-NFRKB με την πρωτεΐνη RFP-GALT διεξάγεται το συμπέρασμα πως ο υπερεκφρασμένος NFRKB δεν εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά σε κυτταρικές δομές πιθανά διάχυτος στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 32.2, 32.6 και 32.4, 32.8). Επιπλέον δεν εντοπίστηκε κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στον ενδοκυττάριο εντοπισμό του υπερεκφρασμένου NFRKB μεταξύ νορμοξίας και υποξίας (Εικόνα 32.1 σε σύγκριση με 32.5). Η επιβεβαίωση των υποξικών συνθηκών έγινε με την ανίχνευση του HIF-1α (Εικόνα 32.3 σε σύγκριση με 32.7).

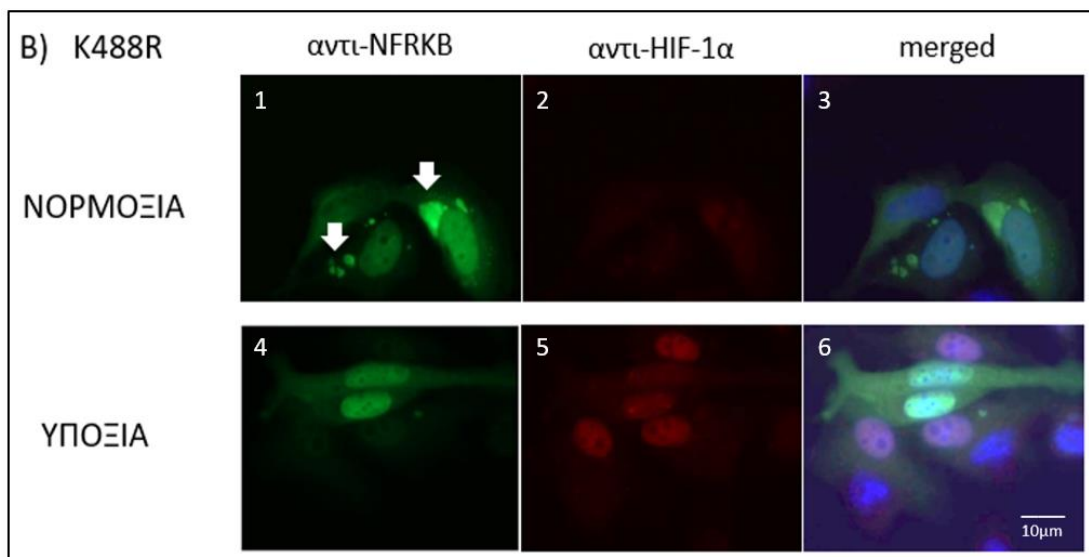
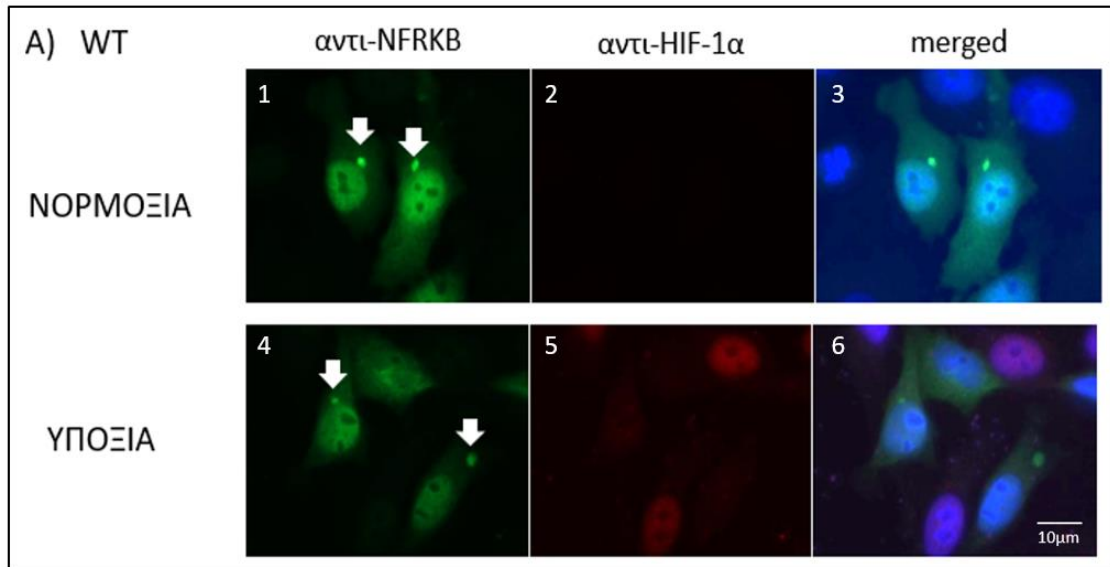


Εικόνα 32. Μελέτη ενδοκυττάριου εντοπισμού του NFRKB wt με πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού. Μελέτη έκφρασης και του πιθανού εντοπισμού του στο ενδοπλασματικό δίκτυο με χρήση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA GALT RFP. Με πράσινο φαίνεται ο NFRKB, με κόκκινο η πρωτεΐνη GALT και με μωβ ο HIF-1α.

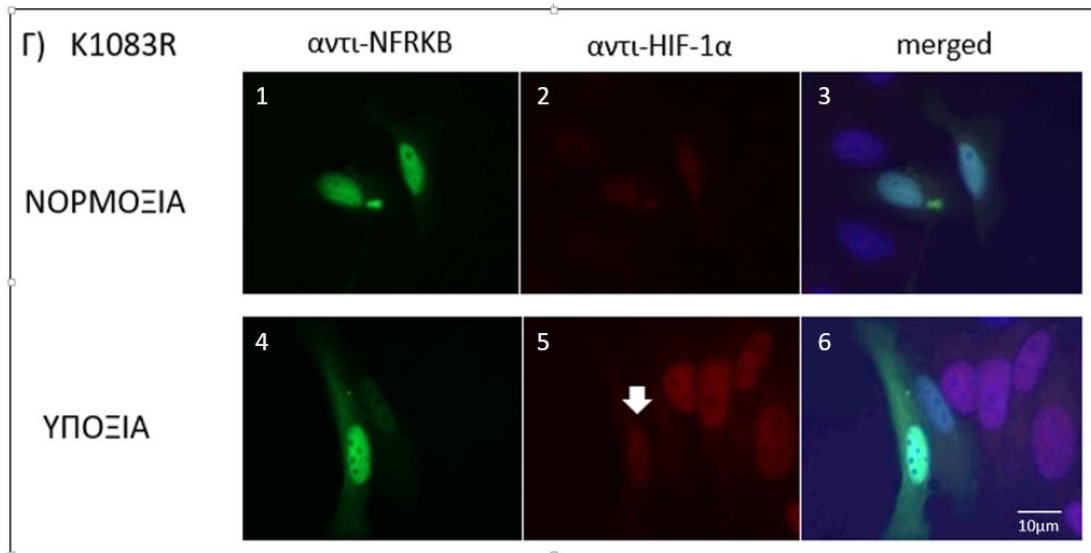
Στην συνέχεια κύτταρα επιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K1083R και έγινε προσδιορισμός του ενδοκυττάριου εντοπισμού των μεταλλαγμένων μορφών του NFRKB σε σύγκριση με τον NFRKB αγρίου τύπου σε νορμοξία και υποξία.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 33, οι μεταλλαγμένες μορφές του NFRKB K488R και K1083R εκφράζονται και εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων σε νορμοξία και υποξία, όπως έγινε και με τον υπερεκφρασμένο NFRKB αγρίου τύπου (Εικόνα 33B και 33Γ σε σύγκριση με 33A). Επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ νορμοξίας και υποξίας. Και στις δύο συνθήκες οξυγόνου όμως παρατηρήθηκε διάχυτο σήμα στο κυτταρόπλασμα όπου και σχηματίζονται κάποιου είδους συσσωματώματα του NFRKB και για τους τρεις

πλασμιδιακούς φορείς (σημειώνονται με άσπρα βέλη, Εικόνα 33A1, 4 και Εικόνα 33B1). Αυτό ίσως οφείλεται στην μεγάλη υπερέκφραση του NFRKB στα κύτταρα που ξεπερνά κατά πολύ τα φυσιολογικά επίπεδα.







Εικόνα 33. Ενδοκυττάριος εντοπισμός με πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας των πρωτεϊνών NFRKB-WT (Α), NFRKB-K488R (Β) και NFRKB-K1083R (Γ). Με άσπρα βέλη φαίνονται: Β) περιοχές συσσώρευσης του NFRKB και Γ) η έλλειψη δυνατού σήματος από τον HIF-1α.

Η επιβεβαίωση των υποξικών συνθηκών έγινε με την ανίχνευση του παράγοντα HIF-1α (Εικόνα 33Α, Β, Γ2 σε σύγκριση με Εικόνα 33Α, Β, Γ5). Μία ακόμα παρατήρηση που έγινε ήταν ότι σε κύτταρα που ο NFRKB εμφανίζει μεγάλη έκφραση σε υποξία, η αντίστοιχη έκφραση του HIF-1α δεν είναι τόσο δυνατή (Εικόνα 33Γ, άσπρο βέλος)όσο σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον NFRKB ή τον εκφράζουν σε μικρότερη ποσότητα.

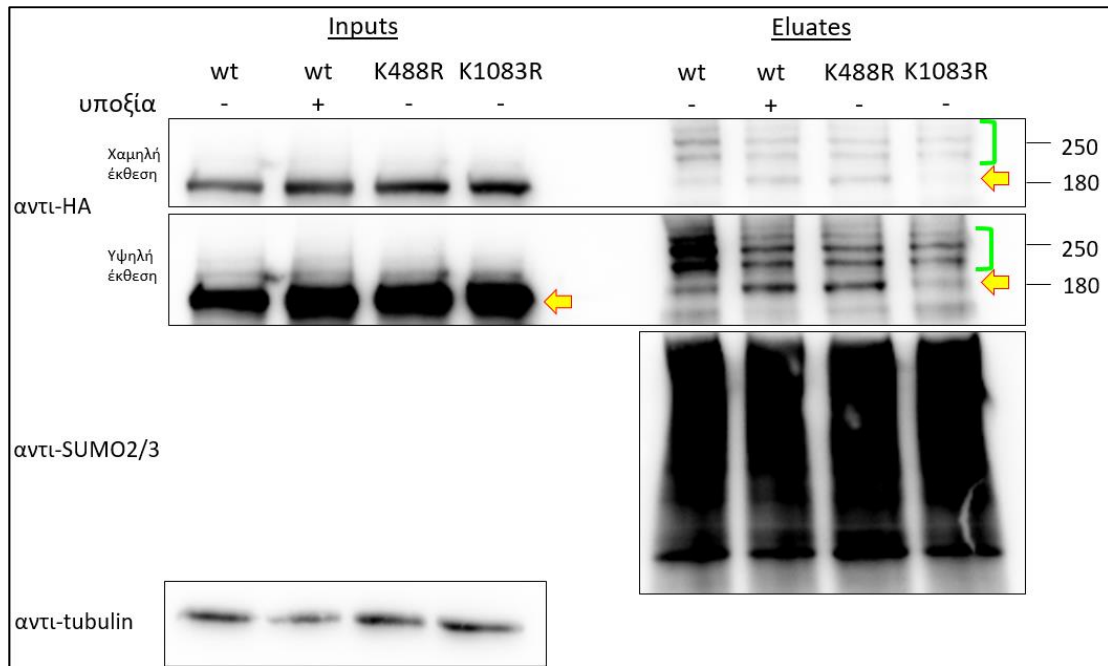
### 2.2.3 Ανίχνευση της ικανότητας σουμοϋλίωσης των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης NFRKB

Αφού από τα παραπάνω πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι από τις κατασκευές pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K1083R μπορούν και εκφράζονται με επιτυχία οι μεταλλαγμένες μορφές του παράγοντα NFRKB σε ίδια επίπεδα με του αγρίου τύπου, προχωρήσαμε στην ανίχνευση της ικανότητας σουμοϋλίωσης των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης NFRKB σε σύγκριση με αυτήν αγρίου-τύπου. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB-WT, pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K488R και pcDNA5 FLAG-HA-NFRKB K1083R, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Ακολούθησε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε αποδιατακτικές συνθήκες (ΜΕΘΟΔΟΙ – Ενότητα 3.1.1) με αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη SUMO2/3 ώστε να κατακρημνιστούν όλες οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες και στην συνέχεια να μελετηθεί η σουμοϋλίωσή του NFRKB μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Ανάλυση INPUTS: Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 34, στα 2 πάνελ επάνω απεικονίζεται σε χαμηλή και υψηλή έκθεση) φάνηκε ότι όλες οι μορφές του NFRKB εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα (σήμανση με κίτρινο βελάκι) σε όλες τις συνθήκες.

Ανάλυση ELUATES: Μέσω χρήσης αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη SUMO2/3 φάνηκε ότι κατακρημνίστηκαν παρόμοιες ποσότητες σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών, επαληθεύοντας έτσι την επιτυχία του πειράματος (Εικόνα 34 τρίτο πάνελ). Με το αντίσωμα ενάντι του επιτόπου HA στη συνθήκη έκφρασης του αγρίου τύπου NFRKB εμφανίστηκαν ζώνες σε μοριακά βάρη κυρίως 20 και 40 kDa πάνω από το αναμενόμενο μοριακό βάρος για τον μη τροποποιημένο NFRKB, δείχνοντας πως υπάρχει σουμοϋλιωμένος HA-NFRKB που έχει κατακρημνιστεί επιτυχώς με SUMO2/3 αντίσωμα. Η αλλαγή του μοριακού βάρους κατά 20 kDa είναι χαρακτηριστική πρωτεϊνών που συνδέονται με πρωτεΐνες SUMO. Επιπλέον η ύπαρξη μεγαλύτερων ζωνών 40-60 kDa παραπάνω δείχνει την ύπαρξη αλυσίδων SUMO2/3 στον NFRKB (Εικόνα 34, πρώτο και δεύτερο πάνελ, σήμανση των σουμοϋλιωμένων μορφών με πράσινη αγκύλη).

Οι σουμοϋλιωμένες μορφές του NFRKB αγρίου-τύπου φάνηκε ότι μειώνονται σε συνθήκες υποξίας σε σύγκριση με την νορμοξία (Εικόνα 34, σύγκριση wt/- και wt/+ ζωνών), επιβεβαιώνοντας προηγούμενα πειράματα του εργαστήριου με τον ενδογενή NFRKB (ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Ενότητα 2.3). Επιπλέον οι σουμοϋλιωμένες μορφές τόσο του NFRKB K488R όσο και του K1083R φάνηκε ότι μειώνονται κατά περίπου 50% σε σύγκριση με τις αγρίου-τύπου (Εικόνα 34, σύγκριση wt/- με K488R/- και K1083R/- ζωνών), παρόλα αυτά δεν εξαφανίζονται, γεγονός που δείχνει πως οι θέσεις αυτές είναι και οι δύο από κοινού θέσεις σουμοϋλίωσης.



Εικόνα 34. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε αποδιατακτικές συνθήκες της πρωτεΐνης SUMO2/3 για την μελέτη της ικανότητας σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης NFKB-WT σε νορμοξία και υποξία και των μεταλλαγμένων μορφών της K488R και K1083R σε συνθήκες νορμοξίας. Δεξιά φαίνεται η ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και αριστερά η ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA για την ανίχνευση του NFKB, αντίσωμα ειδικό έναντι της πρωτεΐνης SUMO2/3 και αντίσωμα ειδικό έναντι της τουμπουλίνης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο NFRKB είναι μία πρωτεΐνη, της οποίας οι λειτουργίες και η σημασία άρχισαν να ανακαλύπτονται πρόσφατα. Αποτελεί την G υπομονάδα του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης HINO80, για αυτό και στην βιβλιογραφία εμφανίζεται συχνά με το όνομα INO80G (72). Μέσω της συμμετοχής του στο σύμπλεγμα αυτό λαμβάνει μέρος σε διάφορες διαδικασίες που αφορούν το DNA, όπως είναι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA και η έκφραση γονιδίων (79, 82).

Μία πληθώρα ερευνητικών άρθρων έχουν συσχετίσει τον NFRKB με παθολογικές καταστάσεις και κυρίως με τον καρκίνο. Ειδικότερα, ο NFRKB έχει συσχετισθεί με τα κακοήθη μεσοθηλιώματα του υπεζωκότα (94), με τα γλοιώματα του εγκεφάλου (95), με τον γαστρικό καρκίνο (97), με τον καρκίνο του ήπατος (86) κα. Όσον αφορά τα καρκινικά ηπατοκύτταρα μάλιστα, έχει προταθεί ότι ο NFRKB παίρνει μέρος στην εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στην περίπτωση των γλοιωμάτων, ο NFRKB εντοπίζεται πυρηνικός ενώ σε φυσιολογικά κύτταρα του εγκεφάλου εμφανίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (95). Αναπόσπαστο κομμάτι ενός αναπτυσσόμενου όγκου αποτελεί το υποξικό περιβάλλον που τον χαρακτηρίζει. Η υποξία στους στερεούς όγκους προκύπτει μέσω του ταχύτατου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την μείωση της διαθεσιμότητας σε οξυγόνο και άλλα θρεπτικά στοιχεία στα κύτταρα. Λόγω των χαμηλών επιπέδων του οξυγόνου ενεργοποιούνται οι παράγοντες HIF, οι οποίοι επάγουν την μεταγραφή διάφορων γονιδίων με σκοπό την επιβίωση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες, βοηθώντας έτσι τον κακοήθη όγκο να αναπτυχθεί περαιτέρω (26). Η επίδραση της υποξίας στον παράγοντα NFRKB καθώς και ο ρόλος του στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF άρχισε να μελετάται πολύ πρόσφατα στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Π.Θ. στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης της υποξίας στο πρότυπο της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών. Σε πρόσφατη μελέτη της Ερευνητικής ομάδας της κ. Χαχάμη παρατηρήθηκε ότι ο NFRKB είναι σουμοϋλιωμένος από την πρωτεΐνη SUMO2/3 και ότι τα επίπεδα σουμοϋλίωσής του μειώνονται σε υποξικές συνθήκες (70). Επίσης δημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας υποστηρίζουν πως η αποσιώπηση του NFRKB επιδρά στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF παραγόντων της υποξίας. Λόγω των παραπάνω ευρημάτων ξεκίνησε ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργίας και της σουμοϋλίωσης του NFRKB σε συνθήκες υποξίας σε καρκινικά κύτταρα HeLa.

Αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας έδειξαν ότι ο NFRKB εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα HeLa και πως τα επίπεδα του ενδογενούς NFRKB δεν αλλάζουν σε

νορμοξία και υποξία. Επίσης, μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού δείχθηκε ότι ο εντοπισμός του ενδογενή NFRKB είναι πυρηνικός στα κύτταρα HeLa, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν σχετικά αναμενόμενο, καθώς έχει αναφερθεί κι άλλες φορές ότι ο NFRKB ως μεταγραφικός τροποποιητής εντοπίζεται στον πυρήνα σε καρκινικά κύτταρα (95) αλλά και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως το νεφρωσικό σύνδρομο (87). Ο ανοσοφθορισμός επαναλήφθηκε και σε υπερεκφρασμένο NFRKB και ο υπερεκφρασμένος NFRKB εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στον πυρήνα των κυττάρων και στις δύο συνθήκες (νορμοξία και υποξία), ενώ μικρό μέρος του φάνηκε να βρίσκεται διάχυτο στο κυτταρόπλασμα, ή σε συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα πιθανόν λόγω της αφύσικα μεγάλης ποσότητας του NFRKB μέσα στα κύτταρα που προκύπτει λόγω της υπερέκφρασης του. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου δεν επηρεάζει τη μεταγραφή, την σταθερότητα ή τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του NFRKB.

Με σκοπό την μελέτη της συσχέτισης του NFRKB με την μεταγραφική δράση των παραγόντων HIF έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και μάλιστα ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: Σε μια πρώτη προσέγγιση έγινε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της HIF-1α υπομονάδας για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης του ενδογενούς NFRKB. Σε μια δεύτερη προσέγγιση υπερεκφράστηκε και ανοσοκατακρημνίστηκε ο FLAG-HA-NFRKB και ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση με τη HIF-1α υπομονάδα σε συνθήκες υποξίας. Και στα δύο πειράματα κατακρημνίστηκαν ειδικά οι πρωτεΐνες-δολώματα (ενδογενής HIF-1α ή HA-NFRKB) παρόλα αυτά δεν βρέθηκε και με τις δύο προσεγγίσεις φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων HIF-1α και NFRKB. Ενδεχομένως να υπάρχει σύνδεση αλλά να είναι πολύ ασθενική για να ανιχνευθεί με τις συνθήκες του πειράματος. Περισσότερα πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε αυτή την κατεύθυνση για να αποκλείσουν την ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ του NFRKB και του HIF-1α.

Είναι πιθανό ο NFRKB και οι μετα-μεταφραστικές του τροποποιήσεις, όπως η σουμοϋλίωση, να ελέγχει άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα στην υποξία. Είναι γνωστό πως ο NFRKB διαθέτει κάποιο μοτίβο με το οποίο δεσμεύεται πάνω σε περιοχές DNA, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την σύνδεσή του με ένα ρυθμιστικό στοιχείο στο DNA όπου συνδέεται επίσης ο παράγοντας NF-kappa B (kappa B site) και ελέγχει την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα α της ιντερλευκίνης-2 (IL-2R alpha) (71). Επιπλέον δείχθηκε πως στην υποξία τα επίπεδα σουμοϋλίωσής του μειώνονται σε σχέση με τη νορμοξία (70) χωρίς παράλληλα να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα όπως δείχθηκε και στην παρούσα εργασία. Παρόλα αυτά ο ρόλος της σουμοϋλίωσης για τη λειτουργία του NFRKB ή τη σύνδεση του στο DNA δεν είναι γνωστός. Για την μελέτη της σουμοϋλίωσης του

NFRKB στην υποξία, αποφασίστηκε να δημιουργηθούν μεταλλάγματα του NFRKB σε πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης για την έκφραση πρωτεϊνών που δεν θα εμφανίζουν την ικανότητα σουμοϋλίωσης (sumo deficient mutants). Οι θέσεις των μεταλλάξεων αποφασίστηκαν μετά από μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του NFRKB για πρόβλεψη πιθανών μοτίβων σουμοϋλίωσης με προγράμματα βιοπληροφορικής καθώς και μελέτη σε δημοσιευμένες εργασίες μοτίβων σουμοϋλίωσης σε πρωτεΐνες στόχους (100). Οι θέσεις των μεταλλάξεων ήταν οι K488 και K1083 και η δημιουργία των μεταλλαγμάτων έγινε με την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω ολιγονουκλεοτιδίου με μήτρα τον φορέα pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB που είχε χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για την υπερέκφραση του NFRKB. Οι φορείς που προέκυψαν επιμολύνθηκαν σε κύτταρα HeLa και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους εκφράστηκαν με επιτυχία στα σωστά και αναμενόμενα μοριακά βάρη. Στα αποτελέσματα πειραμάτων Western Blot δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταλλαγμάτων συγκριτικά με την αγρίου τύπου υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη σε νορμοξία και υποξία, υπονοώντας ίσως ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν τα επίπεδα ή τη σταθερότητα του NFRKB.

Για την μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων K488R και K1083R του NFRKB στον ενδοκυττάριο εντοπισμό του ακολούθησαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα που σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Και πάλι οι μεταλλαγμένες μορφές του NFRKB εντοπίστηκαν κυρίως πυρηνικά με μικρή του ποσότητα να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ή και σε χαρακτηριστικά συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα, πιθανά λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε ιδιαίτερα μεγάλα ποσά, πολύ μεγαλύτερα των φυσιολογικών.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία έγινε μια προκαταρκτική μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση και στον ενδοκυττάριο εντοπισμό του παράγοντα NFRKB και κατασκευάστηκαν εργαλεία που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της σουμοϋλίωσής του.

Στο μέλλον κρίνεται σκόπιμο να δημιουργηθεί το διπλό μετάλλαγμα του NFRKB (K488R/ K1083R) που αναφέρθηκε και παραπάνω και να μελετηθεί η συμπεριφορά του SUMO deficient NFRKB καθώς και η επίδρασή του στην μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων-στόχων των παραγόντων HIF. Σημαντικό επίσης είναι να εξετασθούν και άλλοι πιθανοί ρόλοι της σουμοϋλίωσης στην πρωτεΐνη NFRKB όσον αφορά την ενεργότητα του HIF ή την αλληλεπίδρασή του με γνωστές πρωτεΐνες, π.χ. ο NFRKB είναι το μόριο-κλειδί για την αναστολή της δράσης της UCH-L5, επηρεάζοντας έτσι την αποικοδόμηση διάφορων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα (76).

Η διασαφήνιση του ρόλου της σουμοϋλίωσης του NFRKB καθώς και η μελέτη του ρόλου της κατά την απόκριση των κυττάρων στην υποξία θα βοηθήσει στην κατανόηση του ρόλου του στην ανάπτυξη του καρκίνου μιας και η υποξία παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό περιβάλλον θα βοηθήσει μελλοντικά στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και θα συνεισφέρει στην παγκόσμια μάχη ενάντι του καρκίνου.

## ΠΗΓΕΣ

1. Taylor CT, Pouyssegur J. Oxygen, hypoxia, and stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1113:87-94.
2. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *The Biochemical journal*. 2008;409(1):19-26.
3. Agbor TA, Taylor CT. SUMO, hypoxia and the regulation of metabolism. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 3):445-8.
4. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.
5. Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Experimental cell research*. 2017;356(2):116-21.
6. Wilson JW, Shakir D, Batie M, Frost M, Rocha S. Oxygen-sensing mechanisms in cells. *The FEBS journal*. 2020;287(18):3888-906.
7. Prabhakar NR. 2019 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2020;35(2):81-3.
8. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer*. 2011;12(1):9-22.
9. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(1):617-26.
10. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews*. 2012;92(3):967-1003.
11. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17771-8.
12. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(11).
13. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(31):19253-60.
14. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*. 2002;16(12):1466-71.
15. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$ . *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;287(4):808-13.
16. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3  $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11032-40.
17. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(2):271-3.
18. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(24):9361-74.



19. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(13):5675-86.
20. Qiu B, Ackerman D, Sanchez DJ, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, et al. HIF2 $\alpha$ -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer discovery*. 2015;5(6):652-67.
21. Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  variants in the hypoxia response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(23):3885-901.
22. Cavello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*. 2006;20(5):557-70.
23. Nilsson H, Jögi A, Beckman S, Harris AL, Poellinger L, Pählman S. HIF-2 $\alpha$  expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Experimental cell research*. 2005;303(2):447-56.
24. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 $\alpha$  promotes an aggressive phenotype. *Cancer cell*. 2006;10(5):413-23.
25. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3664-71.
26. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010;29(5):625-34.
27. Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, et al. Up-down regulation of HIF-1 $\alpha$  in cancer progression. *Gene*. 2021;798:145796.
28. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*. 2003;9(6):677-84.
29. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402.
30. Pappalardi MB, McNulty DE, Martin JD, Fisher KE, Jiang Y, Burns MC, et al. Biochemical characterization of human HIF hydroxylases using HIF protein substrates that contain all three hydroxylation sites. *The Biochemical journal*. 2011;436(2):363-9.
31. Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells*. 2020;9(11).
32. Semenza GL. The Genomics and Genetics of Oxygen Homeostasis. *Annual review of genomics and human genetics*. 2020;21:183-204.
33. Semenza GL. A compendium of proteins that interact with HIF-1 $\alpha$ . *Experimental cell research*. 2017;356(2):128-35.
34. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(44):33095-106.
35. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 $\alpha$  protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters*. 2003;549(1-3):105-9.
36. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 $\alpha$  during hypoxia. *Cell*. 2007;131(3):584-95.
37. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1 $\alpha$  stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):394-400.

38. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell*. 2007;131(2):309-23.
39. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouysségur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;360(3):646-52.
40. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:357-85.
41. Meluh PB, Koshland D. Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Molecular biology of the cell*. 1995;6(7):793-807.
42. Yang Y, He Y, Wang X, Liang Z, He G, Zhang P, et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open biology*. 2017;7(10).
43. Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 24):4106-13.
44. Saracco SA, Miller MJ, Kurepa J, Vierstra RD. Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant physiology*. 2007;145(1):119-34.
45. Lima CD, Reverter D. Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(46):32045-55.
46. Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(9):6252-8.
47. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(38):35368-74.
48. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science signaling*. 2009;2(72):ra24.
49. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET. Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(18):11349-53.
50. Celen AB, Sahin U. Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *The FEBS journal*. 2020;287(15):3110-40.
51. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, et al. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7(1):132-44.
52. Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Scientific reports*. 2016;6:26509.
53. Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, Blobel G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *The EMBO journal*. 1997;16(18):5509-19.
54. Olsen SK, Capili AD, Lu X, Tan DS, Lima CD. Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature*. 2010;463(7283):906-12.
55. Wang J, Taherbhoy AM, Hunt HW, Seyedin SN, Miller DW, Miller DJ, et al. Crystal structure of UBA2(ufd)-Ubc9: insights into E1-E2 interactions in Sumo pathways. *PloS one*. 2010;5(12):e15805.

56. Lois LM, Lima CD. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *The EMBO journal*. 2005;24(3):439-51.
57. Lin D, Tatham MH, Yu B, Kim S, Hay RT, Chen Y. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(24):21740-8.
58. Pichler A, Knipscheer P, Saitoh H, Sixma TK, Melchior F. The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(10):984-91.
59. Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Körner R, Olsen JV, et al. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(3):264-9.
60. Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 2002;419(6903):135-41.
61. Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, et al. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Molecular cell*. 2005;19(1):123-33.
62. Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoegge C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*. 2005;436(7049):428-33.
63. Shin EJ, Shin HM, Nam E, Kim WS, Kim JH, Oh BH, et al. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO reports*. 2012;13(4):339-46.
64. Schulz S, Chachami G, Kozaczekiewicz L, Winter U, Stankovic-Valentin N, Haas P, et al. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO reports*. 2012;13(10):930-8.
65. Suh HY, Kim JH, Woo JS, Ku B, Shin EJ, Yun Y, et al. Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a putative isopeptidase superfamily. *Proteins*. 2012;80(8):2099-104.
66. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Molecular cell*. 2006;21(3):349-57.
67. Stankovic-Valentin N, Drzewicka K, König C, Schiebel E, Melchior F. Redox regulation of SUMO enzymes is required for ATM activity and survival in oxidative stress. *The EMBO journal*. 2016;35(12):1312-29.
68. Lee YJ, Mou Y, Maric D, Klimanis D, Auh S, Hallenbeck JM. Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *PloS one*. 2011;6(10):e25852.
69. Bernstock JD, Yang W, Ye DG, Shen Y, Pluchino S, Lee YJ, et al. SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2018;38(1):5-16.
70. Chachami G, Stankovic-Valentin N, Karagiota A, Basagianni A, Plessmann U, Urlaub H, et al. Hypoxia-induced Changes in SUMO Conjugation Affect Transcriptional Regulation Under Low Oxygen. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2019;18(6):1197-209.
71. Adams BS, Leung KY, Hanley EW, Nabel GJ. Cloning of R kappa B, a novel DNA-binding protein that recognizes the interleukin-2 receptor alpha chain kappa B site. *The New biologist*. 1991;3(11):1063-73.
72. Vander Linden RT, Hemmis CW, Schmitt B, Ndoja A, Whitby FG, Robinson H, et al. Structural basis for the activation and inhibition of the UCH37 deubiquitylase. *Molecular cell*. 2015;57(5):901-11.
73. Adams BS, Leung K, Meltzer PS, Lewis KA, Wagner-McPherson C, Evans GA, et al. Localization of the gene encoding R kappa B (NFRKB), a tissue-specific DNA binding protein, to chromosome 11q24-q25. *Genomics*. 1992;14(2):270-4.

74. Jin J, Cai Y, Yao T, Gottschalk AJ, Florens L, Swanson SK, et al. A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(50):41207-12.
75. Kumar A, Möcklinghoff S, Yumoto F, Jaroszewski L, Farr CL, Grzechnik A, et al. Structure of a novel winged-helix like domain from human NFRKB protein. *PloS one*. 2012;7(9):e43761.
76. Sahtoe DD, van Dijk WJ, El Oualid F, Ekkebus R, Ovaa H, Sixma TK. Mechanism of UCH-L5 activation and inhibition by DEUBAD domains in RPN13 and INO80G. *Molecular cell*. 2015;57(5):887-900.
77. Bao Y, Shen X. Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(2):126-31.
78. Zediak VP, Berger SL. Hit and run: transient deubiquitylase activity in a chromatin-remodeling complex. *Molecular cell*. 2008;31(6):773-4.
79. van Attikum H, Gasser SM. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2005;4(8):1011-4.
80. Falbo KB, Shen X. Function of the INO80 chromatin remodeling complex in DNA replication. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17:970-5.
81. Morrison AJ. Genome maintenance functions of the INO80 chromatin remodeller. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2017;372(1731).
82. Morrison AJ. Chromatin-remodeling links metabolic signaling to gene expression. *Molecular metabolism*. 2020;38:100973.
83. Yao T, Song L, Jin J, Cai Y, Takahashi H, Swanson SK, et al. Distinct modes of regulation of the Uch37 deubiquitinating enzyme in the proteasome and in the Ino80 chromatin-remodeling complex. *Molecular cell*. 2008;31(6):909-17.
84. Deol KK, Crowe SO, Du J, Bisbee HA, Guenette RG, Strieter ER. Proteasome-Bound UCH37/UCHL5 Debranches Ubiquitin Chains to Promote Degradation. *Molecular cell*. 2020;80(5):796-809.e9.
85. Nishi R, Wijnhoven P, le Sage C, Tjeertes J, Galanty Y, Forment JV, et al. Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nature cell biology*. 2014;16(10):1016-26, 1-8.
86. Peng Q, Zhou M, Zuo S, Liu Y, Li X, Yang Y, et al. Nuclear Factor Related to KappaB Binding Protein (NFRKB) Is a Telomere-Associated Protein and Involved in Liver Cancer Development. *DNA and cell biology*. 2021;40(10):1298-307.
87. Audard V, Pawlak A, Candelier M, Lang P, Sahali D. Upregulation of nuclear factor-related kappa B suggests a disorder of transcriptional regulation in minimal change nephrotic syndrome. *PloS one*. 2012;7(1):e30523.
88. Crossen PE, Morrison MJ, Rodley P, Cochrane J, Morris CM. Identification of amplified genes in a patient with acute myeloid leukemia and double minute chromosomes. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1999;113(2):126-33.
89. Tyybäkinoja A, Saarinen-Pihkala U, Elonen E, Knuutila S. Amplified, lost, and fused genes in 11q23-25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes, chromosomes & cancer*. 2006;45(3):257-64.
90. Joshi N, Johnson LL, Wei WQ, Abnet CC, Dong ZW, Taylor PR, et al. Gene expression differences in normal esophageal mucosa associated with regression and progression of mild and moderate squamous dysplasia in a high-risk Chinese population. *Cancer research*. 2006;66(13):6851-60.
91. Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Liu X, Bernier FP, McGillivray B, et al. Submicroscopic deletions of 11q24-25 in individuals without Jacobsen syndrome: re-examination of the critical region by high-resolution array-CGH. *Molecular cytogenetics*. 2008;1:23.

92. Trkova M, Becvarova V, Hynek M, Hnykova L, Hlavova E, Kreckova G, et al. SNP array and phenotype correlation shows that FLI1 deletion per se is not responsible for thrombocytopenia development in Jacobsen syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158a(10):2545-50.
93. Wagener R, Seufert J, Raimondi F, Bens S, Kleinheinz K, Nagel I, et al. The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma. *Blood*. 2019;133(9):962-6.
94. Pagano M, Ceresoli LG, Zucali PA, Pasello G, Garassino M, Grosso F, et al. Mutational Profile of Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) in the Phase II RAMES Study. *Cancers*. 2020;12(10).
95. Lee K, Byun K, Hong W, Chuang HY, Pack CG, Bayarsaikhan E, et al. Proteome-wide discovery of mislocated proteins in cancer. *Genome research*. 2013;23(8):1283-94.
96. Ge J, Hu W, Zhou H, Yu J, Sun C, Chen W. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 inhibits human glioma cell migration and invasion via downregulating SNRPF. *Oncotarget*. 2017;8(69):113635-49.
97. Zhang Z, Hu X, Kuang J, Liao J, Yuan Q. LncRNA DRAIC inhibits proliferation and metastasis of gastric cancer cells through interfering with NFRKB deubiquitination mediated by UCHL5. *Cellular & molecular biology letters*. 2020;25:29.
98. Immunoprecipitation Protocol: Leinco Technologies; [Available from: [https://www.leinco.com/immunoprecipitation/.](https://www.leinco.com/immunoprecipitation/)]
99. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(4):525-31.
100. Hendriks IA, D'Souza RC, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Vertegaal AC. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(10):927-36.