



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Υπερέκφραση και μελέτη της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης NFRKB σε συνθήκες υποξίας σε καρκινικά κύτταρα»

«Overexpression and study of the sumoylation of protein NFRKB under hypoxic conditions on cancer cells»

Βελλιανίτη Δήμητρα, του Δημητρίου

Λάρισα, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπουσα την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας κα. Γεωργία Χαχάμη και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου κα. Γεωργία Χαχάμη που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με την ίδια και την ομάδα της και που με εμπιστεύτηκε σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Η καθοδήγησή της και οι υποδείξεις της ήταν πολύτιμες και με βοήθησαν να εξελιχθώ και να βελτιώσω τις ικανότητες μου ως ερευνήτρια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Αντώνιο Γιακουντή, Επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ. και συνεπιβλέπων καθηγητή της εργασίας, και τον κ. Ηλία Μυλωνή, Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και στον 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.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» αξίζει και στην υποψήφια διδάκτωρ Χρύσα Φιλιππούλου, για την συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια και στήριξη σε κάθε βήμα της εργασίας μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτωρ Αμαλία Κάνουρα για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη της, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής τα οποία δεν δίστασαν να με βοηθήσουν όποτε χρειαζόταν.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους μου αλλά κυρίως την οικογένειά μου, καθώς δίχως την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη και την αγάπη τους, θα μου ήταν αδύνατο να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

Βελλιανίτη Δήμητρα

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Abstract	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Σουμοϋλίωση	11
1.1.1 Οι πρωτεΐνες SUMO	11
1.1.2 Ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών	13
1.1.3 Ο μηχανισμός της απο-σουμοϋλίωσης – Οι ισοπεπτιδάσες SENP	16
1.1.4 Η σουμοϋλίωση σε καταστάσεις στρες και την υποξία	17
1.1.5 Σουμοϋλίωση κατά το θερμικό και οξειδωτικό στρες	18
1.1.6 Σουμοϋλίωση και ιική προσβολή.....	19
1.1.7 Σουμοϋλίωση και υποξία	19
1.2 Υποξία.....	20
1.2.1 Γενικά.....	20
1.2.2 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF	22
1.2.3 Γονίδια στόχοι των HIFs.....	23
1.2.5 Η υποξία ως ρυθμιστής της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών	28
1.3 NFRKB (Nuclear Factor Related to KappaB Binding Protein).....	30
1.3.1 Δομή και λειτουργία του NFRKB	30
1.3.2 Η σημασία του NFRKB στη νόσο και τον καρκίνο	33
2. Σκοπός	36
3. Υλικά	37
1. Πλασμιδιακοί φορείς	37
2. Βακτηριακά Στελέχη	40
3. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιέργειών.....	40
4. Κυτταρικές σειρές.....	40
5. Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων	40
6. Αντιβιοτικά	41
7. Αντισώματα	41
8. Διαλύματα	42
8.1 Στις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν:.....	42
8.2 Αντιδραστήρια και διαλύματα ανοσοκατακρήμνισης:.....	43
8.3 Στα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:	43
8.4 Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:.....	44
9. Αντιδραστήρια.....	45

9.1	Χημικά Αντιδραστήρια	45
9.2	Λοιπά Αντιδραστήρια.....	45
4.	Μέθοδοι	46
1.	Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	46
1.1.	Μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων E. Coli με πλασμιδιακούς φορείς.....	46
1.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	46
1.3	Αλληλούχιση δειγμάτων πλασμιδιακού DNA	47
2.	Κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HeLa.....	48
2.1	Ξεπάγωμα κυττάρων	48
2.2	Επώαση κυττάρων.....	48
2.3	Κατεργασία με θρυψίνη και ανακαλλιέργεια.....	48
2.4	Υπολογισμός αριθμού κυττάρων	49
2.5	Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του μη λιπιδικού πολυμερούς PEI.....	49
3.	Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών	50
3.1	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	50
3.2	Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών.....	52
3.3	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	54
3.4	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS-PAGE)	55
3.5	Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών και Ανοσοαποτύπωση κατά Western	56
4.	Μέτρηση δραστικότητας λουσιφεράσης.....	58
5.	Βιοπληροφορική ανάλυση βάσεων δεδομένων γονιδιακής έκφρασης καρκινικών ιστών	59
5.	Αποτελέσματα	60
1.	Μελέτη του ρόλου του NFRKB ως μεταγραφικού ρυθμιστή σε συνθήκες υποξίας στον καρκίνο.....	60
1.1.	Διερεύνηση του ρόλου του NFRKB ως μεταγραφικού ρυθμιστή γονιδίων στόχων της υποξίας.....	60
2.	Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης του παράγοντα NFRKB σε συνθήκες υποξίας.....	66
2.1	Μεταλλάγματα του NFRKB που δεν έχουν την ικανότητα σουμοϋλίωσης	66
2.1.1	Έλεγχος της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R	67
2.2	Χαρακτηρισμός της έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης του NFRKB σε νορμοξία και υποξία.....	68
2.2.1	Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης του NFRKB με ανοσοαποτύπωση κατά Western	68
2.2.2	Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης του NFRKB με έμμεσο ανοσοφθορισμό	69
2.2.3	Έλεγχος της ικανότητας σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R.....	72
6.	Συζήτηση	75
	Βιβλιογραφία.....	79

Περίληψη

Η σουμοϋλίωση (Sumoylation) είναι μία αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση που παρατηρείται σε όλους τους ευκαρυώτες και περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων. Σημαντικός είναι ο ρόλος της σουμοϋλίωσης ως ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης και προσαρμογής σε καταστάσεις στρες. Ένας μικρός αριθμός μελετών εμπλέκουν την σουμοϋλίωση στον μηχανισμό απόκρισης των κυττάρων σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία). Προηγούμενη εργασία του Εργαστηρίου μας έδειξε την ύπαρξη μίας ομάδας πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μεταβάλλονται σε συνθήκες υποξίας, χωρίς να παρουσιάζουν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους. Σε αυτήν την ομάδα ανήκει και η πρωτεΐνη NFRKB, η οποία σουμοϋλιώνεται από τις πρωτεΐνες SUMO2/3 αλλά παρουσιάζει μείωση της σουμοϋλίωσης αυτής κατά την υποξία. Ο NFRKB είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής και μία από τις 15 υπομονάδες του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης INO80 (INO80G). Η διερεύνηση της σουμοϋλίωσης και του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής στην απόκριση στην υποξία και στον καρκίνο, αποτέλεσε το κύριο θέμα μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Συγκεκριμένα δείχθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του NFRKB συσχετίζονται με τους παράγοντες HIF-1α και HIF-2α σε δύο καρκινικούς τύπους, τους Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBC) και Thymoma (THYM). Ειδικά για τον τύπο DLBC, η υψηλή έκφραση του NFRKB σχετίζεται με κακή πρόγνωση και μειωμένα επίπεδα επιβίωσης. Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω τη σχέση μεταξύ του NFRKB και του HIF-1α, προχωρήσαμε σε υπερέκφραση της μορφής FLAG-HA NFRKB WT σε καρκινικά κύτταρα και ελέγξαμε την επίδραση της υπερέκφρασης στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Δείχθηκε πως η υπερέκφραση οδηγεί σε σχετικά αυξημένα επίπεδα της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα αποσιώπησης του NFRKB του εργαστηρίου τα οποία δείχνουν πως ο NFRKB έχει πιθανά ρόλο θετικού ρυθμιστή του HIF-1. Παράλληλα, θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω τον ρόλο του NFRKB αλλά και την σημασία της σουμοϋλίωσης αυτού, δημιουργήσαμε μία διπλά μεταλλαγμένη μορφή του παράγοντα (FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R) που έφερε δύο μεταλλάξεις σε πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης K488R και K1083R όπως προέκυψαν από βιβλιογραφική και βιοπληροφορική ανάλυση. Πειράματα ελέγχου της έκφρασης της τροποποιημένης αυτής πρωτεΐνης, έδειξαν πως η διπλή μετάλλαξη δεν επέφερε αλλαγές όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό σε σχέση με τον NFRKB αγρίου τύπου σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ενδογενών σουμοϋλιωμένων

πρωτεϊνών έδειξαν πως η διπλή μετάλλαξη στις λυσίνες 488 και 1083 δεν αρκεί για τη δημιουργία μεταλλάγματος που στερείται πλήρως την ικανότητα σουμοϋλίωσης. Περαιτέρω βιοπληροφορική μελέτη απαιτείται για την ανάδειξη και άλλων υποψήφιων προς σουμοϋλίωση λυσίνων για την δημιουργία ενός μεταλλάγματος που στερείται την ικανότητα σουμοϋλίωσης, και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε μελέτες του ρόλου της σουμοϋλίωσης του NFRKB τόσο στην λειτουργία του, όσο και στην συμμετοχή του στον μηχανισμό απόκρισης στην υποξία.

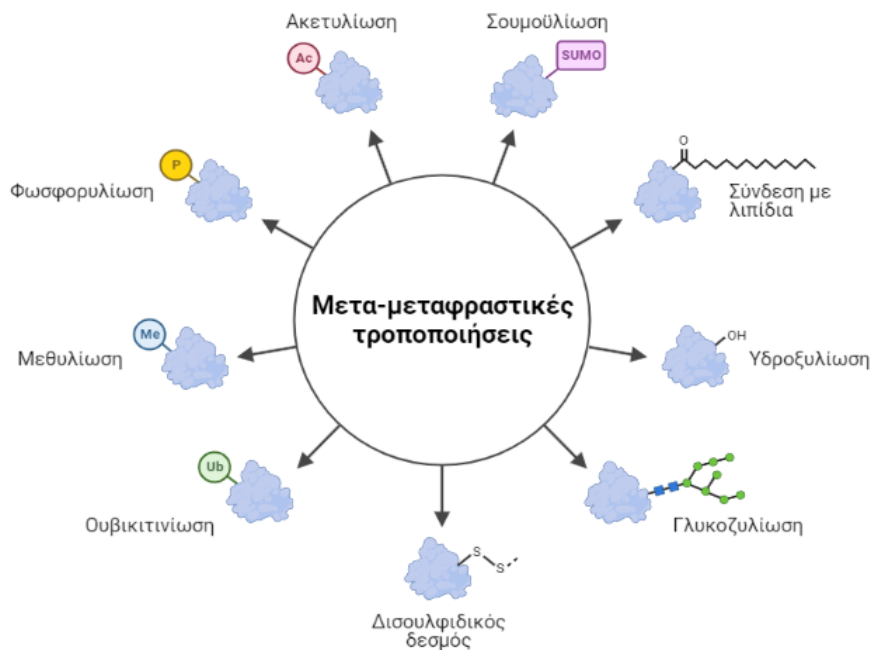
Abstract

SUMOylation is a reversible covalent post-transcriptional modification which is conserved throughout the eukaryotic organisms. This modification includes the formation of a covalent bond between SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) proteins and the lysine residues of the target protein. The role of SUMOylation as a regulator of the cellular response and adaptation is essential under stress. There are few studies that involve SUMOylation in the mechanistic response of the cell against low oxygen concentrations (hypoxia). A previous study of our lab showed the existence of a group of proteins whose SUMOylation changed during hypoxia without changes in abundance. A member of this group is NFRKB, a protein who is SUMOylated by SUMO2/3 proteins and whose SUMOylation decreases during hypoxia. NFRKB is a transcription regulator and one of the 15 subunits of the INO80 chromatin remodeling complex in humans (INO80G). The investigation of the role of NFRKB and its sumoylation during hypoxia and cancer, has been the main topic of this work. Specifically, it was discovered that the protein expression levels of NFRKB correlate with HIF-1 α and HIF-2 α in two cancer types, Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBC) and Thymoma (THYM), respectively. Especially for the DLBC type, high expression of NFRKB is associated with poor prognosis and low survival levels. In order to further explore the relation between NFRKB and HIF-1 α , we overexpressed FLAG-HA NFRKB WT protein in cancer cells and studied its effect on the transcriptional activity of HIF-1 α . We found that the overexpression of NFRKB promoted an increase in the transcriptional activity of HIF-1 α , confirming previous lab results, where silencing of NFRKB, promoted a significant downregulation of HIF-1 α activity. In parallel, in order to investigate thoroughly the importance of SUMOylation of NFRKB in its function, we created a chimeric NFRKB protein (FLAG-HA NFRKB K488R K1083R) carrying two mutations (namely K488R and K1083R) lysine residues inside potential SUMO-sites. These sites came up from bibliographic and bioinformatic analysis. Control experiments on the expression of FLAG-HA NFRKB K488R K1083R, showed that the two mutations had no effect on the expression and subcellular localization of the mutant compared with the wild type during normoxic and hypoxic conditions. Immunoprecipitation experiments of endogenous SUMOylated proteins, showed that the double mutation on the lysine residues 488 and 1083 is not sufficient for the creation of a SUMO-deficient mutant form of NFRKB. Further bioinformatic analysis is required in order to discover putative lysines that can be sumoylated. Our final purpose will be to construct a SUMO-deficient NFRKB mutant form, which could be further used

in studies regarding the role of the SUMOylation on NFRKB function and its involvement in the hypoxia response pathway.

1. Εισαγωγή

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζουν τις κυτταρικές τους λειτουργίες ως απάντηση στις διάφορες αλλαγές και ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Ένας εξ αυτών των μηχανισμών είναι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση (Post Translational Modification), που στοχεύει στην ομοιοπολική τροποποίηση πρωτεϊνών μετά την βιοσύνθεσή τους. Πιο συγκεκριμένα, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση μίας πρωτεΐνης περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση μίας χημικής ομάδας, πρωτεΐνης ή άλλου μορίου (σακχάρων, λιπιδίων κλπ) ή την πρωτεόλυση σε ένα ή και περισσότερα κατάλοιπα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η τροποποίηση αυτή δρα ως «μοριακός διακόπτης» και ρυθμίζει μία πληθώρα πρωτεϊνικών λειτουργιών, όπως η δράση, η σταθερότητα, ο υποκυτταρικός εντοπισμός αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μίας πρωτεΐνης με DNA, λιπίδια και άλλες πρωτεΐνες (1). Η μελέτη και η κατανόηση του μηχανισμού αυτών των τροποποιήσεων παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Συνολικά, έχουν βρεθεί πάνω από 450 τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένου γρήγορων και αναστρέψιμων διαδικασιών όπως η φωσφορυλίωση, αλλά και αργών και μη αναστρέψιμων τροποποιήσεων όπως συγκεκριμένες μορφές της γλυκοζυλίωσης (2). Μία από τις σημαντικότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικόνα 1), είναι η σουμοϋλίωση η οποία αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



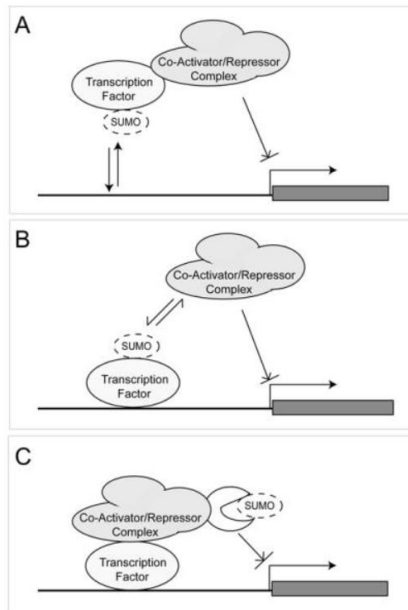
Εικόνα 1. Οι σημαντικότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

1.1 Σουμοϋλίωση

Η σουμοϋλίωση (Sumoylation) είναι μία αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση που παρατηρείται σε όλους τους ευκαρυώτες και περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων. Από την ανακάλυψη της, στα τέλη της δεκαετίας του '90 (3), (4), έως σήμερα, αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας λόγω του ρόλου της στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, όπως στην επιδιόρθωση και στον ανασυνδυασμό του DNA (5), (6), στη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (7), στην οργάνωση της χρωματίνης (8), στη μεταγραφή (9) και στην ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών (10). Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί πάνω από 1000 στόχοι σουμοϋλίωσης ενώ ακόμα ανακαλύπτονται και άλλοι (11). Ανάμεσα σε αυτούς συγκαταλέγονται μεταγραφικοί παράγοντες αλλά και συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς της μεταγραφής. Η σουμοϋλίωση ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση, επηρεάζοντας την σύνδεση με το DNA αλλά και την αλληλεπίδραση ενός μεταγραφικού παράγοντα με ενεργοποιητές ή καταστολείς της μεταγραφής (9) (Εικόνα 2). Παράδειγμα αποτελεί η τροποποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53, ο οποίος μετά την σύνδεσή του με την πρωτεΐνη SUMO1 επάγει την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (12). Ακόμη, η σουμοϋλίωση σχετίζεται και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (13), και εμπλέκεται στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες (βλ. 1.1.4 Η σουμοϋλίωση σε καταστάσεις στρες και την υποξία).

1.1.1 Οι πρωτεΐνες SUMO

Οι πρωτεΐνες SUMO (MB~10kDa) ανήκουν σε μία ομάδα πρωτεϊνών που μοιάζουν με την ουβικιτίνη, τις Ubls (Ubiquitin-like proteins), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την κλασική δομή β-grasp fold της ουβικιτίνης που περιλαμβάνει ένα β-πτυχωτό φύλλο γύρω από μία α-έλικα. Ακόμη, διαθέτουν ένα εκτεταμένο καρβοξυτελικό άκρο (2-11 αμινοξέα) μετά από ένα αμετάβλητο μοτίβο δύο γλυκινών (Gly-Gly motif), το οποίο αποκαλύπτεται μετά από μία διαδικασία πρωτεόλυσης. Το μοτίβο Gly-Gly είναι απαραίτητο για την σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών στην πρωτεΐνη-στόχο, αφού η τελευταία γλυκίνη του μοτίβου δημιουργεί ισοπεπτιδικό δεσμό με την λυσίνη των πρωτεϊνών-στόχων (14).



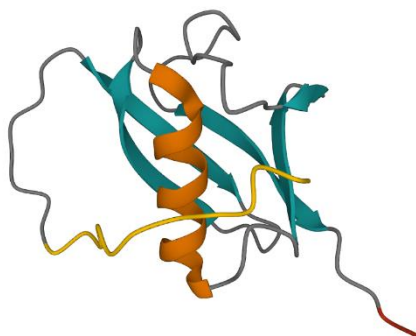
Εικόνα 2. Πιθανοί μηχανισμοί της ρύθμισης της μεταγραφής από τη σουμοϋλίωση. (Α) Η σουμοϋλίωση μπορεί να επηρεάσει την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA (Β) Η σουμοϋλίωση μπορεί να διευκολύνει ή να αναστείλει αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποιητών ή καταστολέων της μεταγραφής (C) Η σουμοϋλίωση μπορεί να προωθήσει ή να αναστείλει έμμεσα ενεργοποιητικά ή κατασταλτικά σύμπλοκα της μεταγραφής. Πηγή: (9)

Ένα επίσης χαρακτηριστικό των SUMO πρωτεϊνών, το οποίο απουσιάζει από τις άλλες UbIs είναι η επέκταση 10-25 αμινοξέων, η οποία εμφανίζεται στο αμινοτελικό τους άκρο και φαίνεται να συμβάλλει στην δημιουργία των SUMO αλυσίδων (πολύσουμοϋλίωση) (15) (Εικόνα 3).

Οι πρωτεΐνες SUMO εκφράζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ορισμένοι οργανισμοί, όπως η ζύμη, ο *Caenorhabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster* φέρουν ένα μοναδικό γονίδιο, ενώ αντίθετα ανώτεροι οργανισμοί όπως τα φυτά και τα ζώα διαθέτουν περισσότερα από ένα γονίδια SUMO. Στον άνθρωπο, εντοπίζονται 5 ισομορφές της πρωτεΐνης SUMO, οι SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4 και SUMO5. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των ισομορφών των SUMO πρωτεϊνών παρατηρούνται στα επίπεδα έκφρασης, στην ευαισθησία στη δράση ισοπεπτιδασών, στην ικανότητα δημιουργίας SUMO αλυσίδων, στην απάντηση στο στρες και στην επιλογή των στόχων σουμοϋλίωσης.

Η έκφραση των SUMO1, SUMO2, SUMO3 παρατηρείται σε όλους τους ιστούς, ενώ οι SUMO4 και SUMO5 φαίνονται να εκφράζονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένους ιστούς. Η SUMO4 πρωτεΐνη παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στο νεφρό, στη σπλήνα και στους λεμφαδένες, ενώ η SUMO5 τοποθετείται στους άρχεις και στα λευκοκύτταρα (16). Οι ώριμες μορφές των SUMO2 και SUMO3 πρωτεϊνών εμφανίζουν 97% ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας και αποτελούνται από 92 και 93

κατάλοιπα αντίστοιχα. Εξαιτίας αυτής της ομοιότητας, αναφέρονται ως SUMO2/3 και δεν μπορούν πρακτικά να διαχωρισθούν με την χρήση αντισωμάτων. Οι SUMO2/3 με τη σειρά τους εμφανίζουν μόνο 47% ομοιότητα με την πρωτεΐνη SUMO1 (17). Έχει αποδειχθεί πως οι SUMO2/3 είναι οι μόνες που συμμετέχουν στην πολυσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών-στόχων (18).



Εικόνα 3. Τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης SUMO1. Με μπλε απεικονίζεται η δομή του β-πτυχωτού φύλλου, με πορτοκαλί η δομή τη α-έλικας, με κόκκινο σημαίνεται το μοτίβο Gly-Gly και με κίτρινο η επέκταση του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Πηγή: PDB

Οι SUMO1 και SUMO2/3 έχουν διακριτές λειτουργίες καθώς συνδέονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες *in vivo* (19). Η SUMO4 πιθανώς δεν συμμετέχει στην ομοιοπολική σύνδεση με την πρωτεΐνη-στόχο καθώς περιέχει ένα κατάλοιπο προλίνης (Pro90) στο καρβοξυτελικό της άκρο το οποίο αποτρέπει την ωρίμανση μέσω πρωτεόλυσης (20). Λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη SUMO5, η οποία πιθανώς ρυθμίζει την δημιουργία και την σταθερότητα των PML NBs (PolyMyeloticLeukemia nuclear bodies) (21).

1.1.2 Ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών

Η σουμοϋλίωση πρωτεϊνών οδηγεί στην δημιουργία ενός ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ του καρβοξυτελικού καταλοίπου γλυκίνης της πρωτεΐνης SUMO και της ε-αμινομάδας ενός καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Παρόμοια με τη ουβικιτινίωση, χρησιμοποιείται ένα ενζυμικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την συμμετοχή τριών κλάσεων ενζύμων (22). Διακριτά στάδια του μηχανισμού είναι η ωρίμανση, η ενεργοποίηση και η σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους (Εικόνα 5).

Ωρίμανση των SUMO-πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες SUMO, μετά την έκφρασή τους, βρίσκονται σε μία ανώριμη μορφή. Η διαδικασία της ωρίμανσης περιλαμβάνει την χρήση ειδικών SUMO-ισοπεπτιδασών, κυρίως της οικογένειας SENP (Sentrin/SUMO-specific proteases), οι οποίες καταλύουν την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης SUMO στο καρβοξυτελικό άκρο με σκοπό να αποκαλυφθεί το αμετάβλητο μοτίβο των δύο γλυκίνων που είναι απαραίτητο για την δημιουργία του ισοπεπτιδικού δεσμού και κατά συνέπεια την σύζευξη της SUMO με την πρωτεΐνη-στόχο.

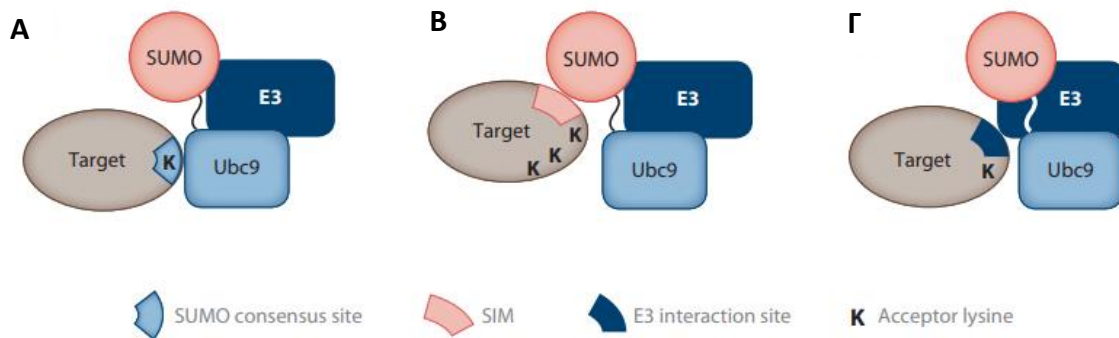
Ενεργοποίηση των SUMO πρωτεϊνών

Το ένζυμο E1 είναι ένα διμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1 ή Aos1) και SAE2 (SUMO-activating enzyme subunit 2 ή Uba2). Η διαδικασία της ενεργοποίησης είναι ένας μηχανισμός δύο βημάτων και περιλαμβάνει αρχικά την αντίδραση σχηματισμού ενός SUMO-αδενυλικού παραγώγου με τη βοήθεια της ενέργειας που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP, ακολουθούμενη από μία περιστροφή 130° και αναδιαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου του E1 (SAE2 υπομονάδα). Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός θειοεστερικού δεσμού μεταξύ του ενεργού κέντρου του E1 (Cys173) και του τελικού καταλοίπου γλυκίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης SUMO (23). Εν συνεχεία, το ένζυμο E1 αλληλεπιδρά με το ένζυμο E2 Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9), το οποίο είναι υπεύθυνο για την τελική σύζευξη των SUMO στις πρωτεΐνες-στόχους. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η μεταφορά της ενεργοποιημένης SUMO στο ένζυμο Ubc9, με το οποίο επίσης δημιουργεί θειοεστερικό δεσμό.

Σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO με τις πρωτεΐνες-στόχους

Το ένζυμο E2 Ubc9 μεταφέρει τελικά την SUMO πρωτεΐνη στις πρωτεΐνες-στόχους της σουμοϋλίωσης. Το ένζυμο αυτό είναι μοναδικό για το σύστημα της σουμοϋλίωσης εν αντίθεση με το σύστημα της ουβικιτινίωσης όπου πολλά E2 δεν έχουν την ικανότητα να επιλέγουν και να προσδένονται κατευθείαν στην πρωτεΐνη-στόχο. Η χαρακτηριστική κατανομή του φορτίου στην επιφάνεια του Ubc9 παρομοιάζει ηλεκτροστατικό δίπολο προσδίδοντας έτσι ευελιξία και την ικανότητα στο ένζυμο να αλληλεπιδρά με μία πληθώρα πιθανών πρωτεϊνών-στόχων (24), (25). Ο τρόπος μέσω του οποίου το E2 ένζυμο αναγνωρίζει και συνδέεται στις πρωτεΐνες-στόχους είναι μέσω ενός συναινετικού μοτίβου (consensus motif) ψKxE/D, όπου το ψ αντιστοιχεί σε ένα υδρόφοβο κατάλοιπο και το K είναι η λυσίνη στόχος η οποία ακολουθείται από ένα οποιαδήποτε αμινοξύ και ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού ή γλουταμινικού (Εικόνα 4A). Το μοτίβο αυτό εμπεριέχεται σε ένα

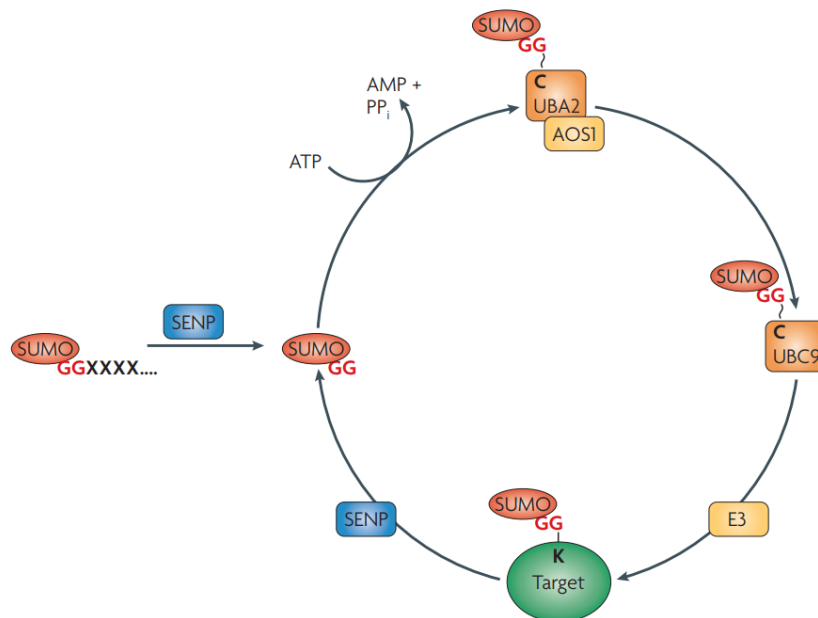
μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών-στόχων (26). Έρευνες όμως έχουν αναδείξει και άλλα συναινετικά μοτίβα (27), (28), με παράδειγμα ένα αντίστροφο συναινετικό μοτίβο D/ExKψ που εμπεριέχεται ιδιαίτερα στις πρωτεΐνες που συνδέονται οι SUMO2 (29).



Εικόνα 4. **Μηχανισμοί αναγνώρισης της λυσίνης-στόχου.** (Α) Η λυσίνη-στόχος βρίσκεται μέσα σε ένα συναινετικό μοτίβο (ψKxE/D) και αναγνωρίζεται κατευθείαν από το E2 ένζυμο (Ubc9) (Β) Η πρωτεΐνη-στόχος στρατολογεί το σύμπλοκο Ubc9-SUMO μέσω ενός μοτίβου αλληλεπίδρασης με SUMO (SIM, SUMO-interacting motif) (Γ) Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης-στόχου με την SUMO-E3 λιγάση τοποθετεί το σύμπλοκο Ubc9-SUMO σε θέση που να επιτρέπει την τροποποίηση της λυσίνης-στόχου. Πηγή: (31) Τροποποιημένη

Παράλληλα, εκτός από την ύπαρξη συναινετικών μοτίβων που επιτρέπουν την επιλογή και την τροποποίηση της πρωτεΐνης-στόχου, έχουν βρεθεί και άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους καθορίζεται η επιλογή της λυσίνης που θα τροποποιηθεί. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4B, πολλές πρωτεΐνες-στόχοι αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες SUMO μέσω ενός μοτίβου SIM (SUMO-interacting motif). Το μοτίβο αυτό είναι κατά βάση υδρόφοβο και συνήθως πλαισιώνεται από όξινα κατάλοιπα ή κατάλοιπα σερίνης (30). Μετά την αναγνώριση του μοτίβου αυτού από την πρωτεΐνη SUMO, πραγματοποιείται η σύνδεση της στην πρωτεΐνη-στόχο με μη-ομοιοπολικό δεσμό. Ακόμη, για την δημιουργία του ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ του καταλοίπου γλυκίνης του καρβοξυτελικού άκρου της SUMO πρωτεΐνης και ενός καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου απαιτείται συχνά αλλά όχι πάντα η δράση μίας SUMO-E3 λιγάσης. Τα ένζυμα αυτά μεσολαβούν και σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-στοχου-E2 ώστε ο θειοεστερικός δεσμός που έχει δημιουργηθεί να βρεθεί σε προσανατολισμό κατάλληλο για την πρόσδεση με την λυσίνη-στόχο (Εικόνα 4Γ) (31). Η μεγαλύτερη οικογένεια E3 λιγασών είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που περιέχουν τα μοτίβα SP-RING τα οποία είναι απαραίτητα για την λειτουργία τους. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 6 μέλη αυτής της οικογένειας συμπεριλαμβανομένου του αναστολέα πρωτεϊνών ενεργοποιημένων STAT, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) και των ισομορφών του και της πρωτεΐνης Nse2/Mms21 (32), (33). Πρωτεΐνες όπως η νουκλεοπορίνη RanBP2 (34), η ανθρώπινη πρωτεΐνη polycomb Pc2 (35), η

αποακετυλάση των ιστονών 4 HDAC4 (36) και η TOPORS (Topoisomerase I-binding RING finger protein) (37), έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως E3 λιγάσες.



Εικόνα 5. **Ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης.** Απεικονίζονται τα στάδια του μηχανισμού: η πρωτεολυτική ωρίμανση από τις SENP, η ενεργοποίηση της SUMO από το ένζυμο E1 (UBA2,AOS1), η μεταφορά της SUMO στο ένζυμο E2 (UBC9), η δημιουργία του ισοπεπτιδικού δεσμού με την πρωτεΐνη-στόχο μέσω της E3 λιγάσας και η διαδικασία της απο-σουμοϋλίωσης. Πηγή: (15)

1.1.3 Ο μηχανισμός της απο-σουμοϋλίωσης – Οι ισοπεπτιδάσες SENP

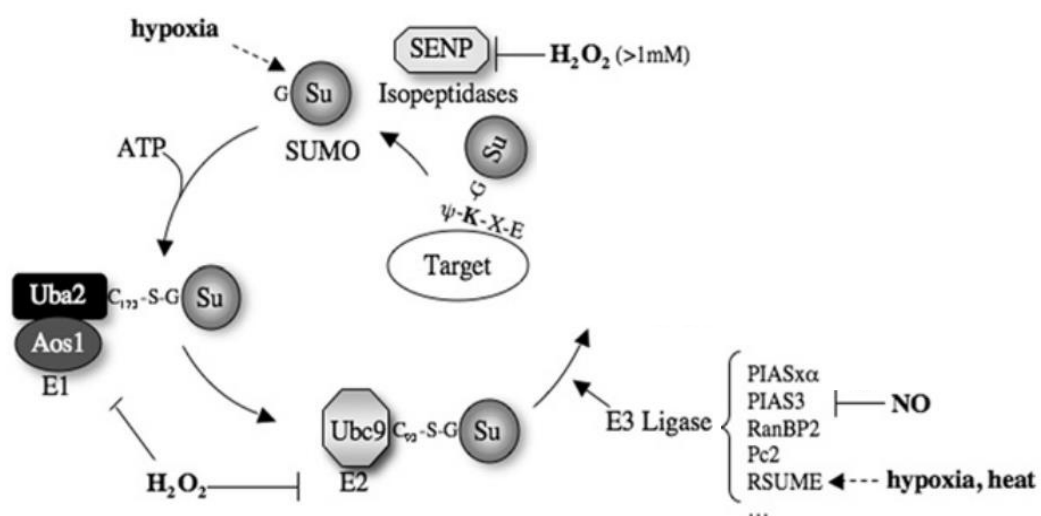
Όπως αναφέρθηκε, η σουμοϋλίωση είναι μία αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η διαδικασία της από-σουμοϋλίωσης καταλύεται από τις ισοπεπτιδάσες SENP. Αυτές έχουν τόσο δράση ισοπεπτιδάσης για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης SUMO από τις πρωτεΐνες-στόχους, όσο και δράση υδροξυλάσης για την πρωτεολυτική ωρίμανση των πρωτεϊνών SUMO (βλ. 1.1.2 *Ωρίμανση SUMO πρωτεϊνών*). Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 6 πρωτεΐνες SENP, η SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 και η SENP7, οι οποίες χωρίζονται επιμέρους σε 3 κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις SENP1 και SENP2, η δεύτερη τις SENP3 και SENP5, και η τρίτη τις SENP6 και SENP7 (31). Όλες οι SENP πρωτεάσες φέρουν συντηρημένη την καταλυτική περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο, η οποία περιέχει τα κατάλοιπα ιστιδίνη, ασπαραγινικό και κυστεΐνη (His-Asp-Cys) (38).

Η SENP1 παρατηρείται κυρίως στον πυρήνα, ενώ η SENP2 φαίνεται να μεταφέρεται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Και οι δύο δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη προτίμηση τόσο στην λειτουργία τους, όσο και στις SUMO πρωτεΐνες. Η δεύτερη ομάδα των πρωτεασών SENP (SENP3 και SENP5)

παρατηρείται κυρίως στους πυρηνίσκους, όπου συμμετέχουν στην βιογένεση των ριβοσωμάτων. Και οι δύο ισοπεπτιδάσες εμφανίζουν προτίμηση στην απομάκρυνση των SUMO2/3 πρωτεϊνών (15). Μελέτες τοποθετούν, επίσης, την SENP5 και στο κυτταρόπλασμα με δράση που σχετίζεται με την σύντηξη και την διαίρεση των μιτοχονδρίων (39). Τέλος οι πρωτεΐνες SENP6 και SENP7 εντοπίζονται κυρίως στο πυρηνόπλασμα και χαρακτηριστικό τους είναι η εισαγωγή 50-200 αμινοξέων στην καταλυτική τους περιοχή (40). Άλλες πρωτεάσες που συμμετέχουν στον μηχανισμό της από-σουμοϋλίωσης είναι οι DeSI1, USPL1 και Wss1 (41), (42), (43).

1.1.4 Η σουμοϋλίωση σε καταστάσεις στρες και την υποξία

Τα κύτταρα εκτίθενται συνεχώς σε διάφορα είδη εξωγενούς και ενδογενούς πίεσης. Σε καταστάσεις στρες, τα περισσότερα κύτταρα ενεργοποιούν πρωταρχικούς αμυντικούς μηχανισμούς, οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν στην επεξεργασία των πρωτεϊνών μέσω διάφορων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, σε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση αλλά και στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (44). Η σουμοϋλίωση, ως μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση στρατολογείται από το κύτταρο ως απάντηση στις διάφορες αλλαγές και ερεθίσματα του περιβάλλοντος και αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης και προσαρμογής σε καταστάσεις στρες. Μελέτες έχουν συνδέσει την σουμοϋλίωση με την απόκριση στο θερμικό και οξειδωτικό στρες, στην ιική προσβολή, και την υποξία (45). Η ρύθμιση της σουμοϋλίωσης σε καταστάσεις στρες αναλύεται στις επόμενες ενότητες και περιγράφεται συνοπτικά στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Ρύθμιση της σουμοϋλίωσης σε καταστάσεις στρες. Απεικονίζεται η ρύθμιση του μηχανισμού της σουμοϋλίωσης από το οξειδωτικό και θερμικό στρες και την υποξία. Η ρύθμιση αυτή γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής (διακεκομμένα βέλη) ή σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο (κανονικά βέλη). Πηγή: (45) Τροποποιημένη

1.1.5 Σουμοϋλίωση κατά το θερμικό και οξειδωτικό στρες

Σε συνθήκες απότομης αύξησης της θερμοκρασίας (θερμικό στρες) παρατηρείται μία γενικευμένη αύξηση της σουμοϋλίωσης. Το μονοπάτι της σουμοϋλίωσης μέσω σύζευξης των SUMO2/3 πρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την απόκριση στο θερμικό στρες καθώς μελέτες δείχνουν πως μόνο αυτός ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης αυξάνεται σε αυτές τις συνθήκες (17). Σε επίπεδο πρωτεϊνών-στόχων, με την επίδραση θερμικού στρες, παρατηρείται αύξηση της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης HSF1 (Heat-Shock Factor 1). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που μεσολαβεί στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων απόκρισης στο θερμικό σοκ. Η επαγόμενη από στρες σύζευξη του HSF1 με την πρωτεΐνη SUMO1 οδηγεί σε αύξηση της δράσης του και κατά συνέπεια σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων απόκρισης στην υποξία (46). Επίσης, έρευνες απέδειξαν πως η επίδραση του θερμικού στρες μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα τον μηχανισμό σουμοϋλίωσης. Παράδειγμα αποτελεί η E3 λιγάση RSUME (RWD-containing Sumoylation Enhancer), η οποία υπερεκφράζεται κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ (47).

Άλλη μία κατάσταση στρες που συνδέεται με την σουμοϋλίωση είναι η έκθεση του κυττάρου σε ενεργές μορφές οξυγόνου ή αλλιώς οξειδωτικό στρες. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) παράγονται συνεχώς μέσω μεταβολικών διεργασιών. Το οξειδωτικό στρες αντανακλά την ανισορροπία μεταξύ της συστηματικής παραγωγής ROS και της ικανότητας του κυττάρου στην εξουδετέρωσή τους. Αυτή η ανισορροπία οδηγεί στην αυξημένη παρουσία ROS στο περιβάλλον του κυττάρου με αποτέλεσμα την καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων αλλά και την διατάραξη της κυτταρικής σηματοδότησης. Η ρύθμιση της σουμοϋλίωσης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες εξαρτάται από την έντασή του. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις H_2O_2 μικρότερες από 1 mM (ήπιο οξειδωτικό στρες), φανερώνουν πως τα ROS οδηγούν στην καταστολή της σουμοϋλίωσης μέσω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης των ενζύμων E1 και E2, καταστέλλοντας έτσι την δράση τους (48). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις H_2O_2 (>1 mM), παρατηρείται η απενεργοποίηση των SENP-ισοπεπτιδασών (49). Ακόμη, το μονοξείδιο του άνθρακα (NO) βρέθηκε να ενισχύει την από-σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών-στόχων, καθώς στοχεύει και οδηγεί την E3 λιγάση PIAS3 προς αποικοδόμηση (50).

1.1.6 Σουμοϋλίωση και ιική προσβολή

Η μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς πυροδοτεί μία καταιγίδα κυτταρικών αποκρίσεων με σκοπό την άμυνα του κυττάρου έναντι στους εισβολείς. Στο επίκεντρο αυτών βρίσκεται η ενεργοποίηση της δράσης της ιντερφερόνης γ (IFN γ), η οποία ανάμεσα στην πληθώρα λειτουργιών που επιτελεί, οδηγεί στην αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των PML-NBs, δηλαδή των πυρηνικών δομών που συγκροτούνται μέσω της πρωτεΐνης PML (51). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ανέδειξαν την σουμοϋλίωση ως τον κύριο ρυθμιστή της λειτουργίας των PML-NBs εδραιώνοντας έτσι τη θέση της ανάμεσα στον αντιϊκό μηχανισμό του κυττάρου (51). Η σουμοϋλίωση, ως διαδικασία, στοχοποιείται από πολλούς ιούς (52). Οι ιοί εκφράζουν ειδικές πρωτεΐνες μέσω των οποίων διαταράσσουν και εκμεταλλεύονται τον μηχανισμό της σουμοϋλίωσης ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους και να αποφύγουν το σύστημα άμυνας του ξενιστή (53). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες ICPO και IEI, οι οποίες προέρχονται από τον ιό του έρπητα και τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό αντίστοιχα. Ο ρόλος τους είναι η διατάραξη της σουμοϋλίωσης των PML-NBs με αποτέλεσμα την διάλυση τους και κατά συνέπεια την απώλεια της αντιϊκής τους δράσης (54).

1.1.7 Σουμοϋλίωση και υποξία

Η σουμοϋλίωση έχει μελετηθεί σε καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών υλικών και υποξίας όπως είναι η χειμέρια νάρκη και η ισχαιμία (55). Κατά την ισχαιμία, παρεμποδίζεται η φυσιολογική ροή του αίματος με αποτέλεσμα την έλλειψη θρεπτικών και οξυγόνου στον ιστό. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει πως τόσο η καθολική όσο και η εστιακή παροδική ισχαιμία στον εγκέφαλο ποντικών οδηγεί αρχικά στην δραματική ελάττωση της σουμοϋλίωσης κατά την ισχαιμική περίοδο, όπου μειώνεται η διαθεσιμότητα του ATP. Αντίθετα, η σουμοϋλίωση παρατηρείται να αυξάνεται στην περίοδο ανάκαμψης παράλληλα με την αποκατάσταση του μεταβολισμού (56). Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την αύξηση, ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπόθεση πως η σουμοϋλίωση αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας που επιστρατεύεται από τους νευρώνες κατά την ισχαιμία (57).

Η χειμέρια νάρκη αποτελεί ένα φυσικό μοντέλο των μηχανισμών ανοχής σε καταστάσεις μειωμένης αιμάτωσης του εγκεφάλου και άλλων ιστών. Μελέτη σε σκίουρους έδειξε πως κατά την χειμέρια νάρκη παρατηρείται αύξηση της σουμοϋλίωσης στον εγκέφαλο, στο συκώτι και τους νεφρούς. Η αύξηση αυτή, συμπίπτει και με την αύξηση των επιπέδων του E2 ενζύμου Ubc9 (58). Τα ευρήματα

αυτά ενισχύουν τον προστατευτικό ρόλο της σουμοϋλίωσης, καθώς η αντιστρεπτή αυτή τροποποίηση των πρωτεϊνών πιθανώς επιτρέπει στα ζώα να διατηρούν τις μεταβολικές τους λειτουργίες σε χαμηλά επίπεδα κατά την περίοδο της χειμέριας νάρκης, αλλά και να διατηρούν την ικανότητα φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας κατά το «ξύπνημα».

Σε αντίθεση με την μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης κατά την ισχαιμία, ο ρόλος της κατά την υποξία παραμένει άγνωστος. Αξιοσημείωτες είναι οι έρευνες που απέδειξαν την αύξηση των επιπέδων έκφρασης αλλά και την εμπλοκή της πρωτεΐνης SUMO1 στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία από τον HIF-1α σε υποξικούς νευρώνες και καρδιομυοκύτταρα ενήλικων ποντικών *in vivo* (59), όπως και την αύξηση της σουμοϋλίωσης μεμονωμένων πρωτεϊνών-στόχων σε συνθήκες υποξίας (60), αποσαφηνίζοντας περαιτέρω τον πιθανό μηχανισμό δράσης της σουμοϋλίωσης κατά την υποξία.

Η ρύθμιση της σουμοϋλίωσης ως απόκριση στην υποξία αποτελεί αντικείμενο έρευνας του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κομμάτι της μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Με σκοπό την περαιτέρω κατανόηση της σχέσης υποξίας – σουμοϋλίωσης, αναλύονται παρακάτω η υποξία, ως κατάσταση στην υγεία και τη νόσο καθώς και οι κυτταρικοί μηχανισμοί απόκρισης στην υποξία.

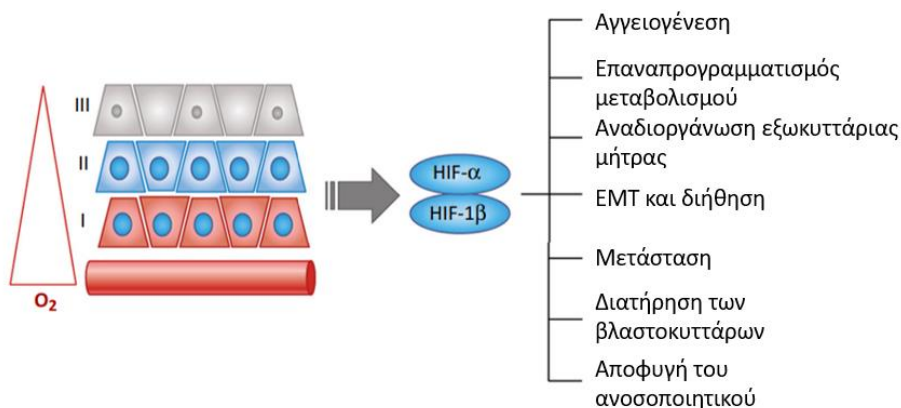
1.2 Υποξία

1.2.1 Γενικά

Το οξυγόνο (O_2) διαδραματίζει κύριο ρόλο στην κυτταρική αναπνοή και τον μεταβολισμό αφού δρα ως ο τελευταίος δέκτης ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της πλειοψηφίας του ATP σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Έτσι, το κύτταρο με τη σειρά του απαιτεί επαρκείς συγκεντρώσεις οξυγόνου για να διατηρήσει μία ποικιλία βιολογικών διαδικασιών αλλά και για να εξασφαλίσει την επιβίωση. Σε καταστάσεις όπου η ζήτηση για οξυγόνο υπερβαίνει την πρόσληψή του, παρατηρείται το φαινόμενο της υποξίας. Κατά την υποξία, ελαττώνονται αρκετά τα επίπεδα οξυγόνου σε όλο το σώμα ή σε επιμέρους ιστούς, οδηγώντας σε μεταβολικό στρες και διατάραξη των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών (61). Το φαινόμενο της υποξίας έχει παρατηρηθεί τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Προκειμένου τα κύτταρα να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν σε συνθήκες έλλειψης

οξυγόνου έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που στοχεύουν στην έκφραση γονιδίων που επαναπρογραμματίζουν τον μεταβολισμό και τις ιδιότητες τους ώστε να μπορούν να αποκρίνονται καλύτερα σε ένα υποξικό περιβάλλον. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Η οξεία απόκριση περιλαμβάνει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε υπάρχουσες πρωτεΐνες, ενώ κατά την χρόνια απόκριση στην υποξία συμβαίνουν αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση (62).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η υποξία παρατηρείται μετά την παραμονή σε μεγάλο υψόμετρο (63) ή κατά την έντονη σωματική άσκηση (64). Ακόμη, εμπλέκεται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ερυθροποίηση, η διατήρηση της πλαστικότητας και της ομαλής λειτουργίας των βλαστοκυττάρων, αλλά και η εμβρυογένεση (65).



Εικόνα 7. Επίδραση της υποξίας στην πρόοδο του καρκίνου. Στην εικόνα διακρίνονται 3 ζώνες κυττάρων: τα κύτταρα της ζώνης I τα οποία είναι οξυγονωμένα αφού βρίσκονται κοντά στο αγγείο, τα υποξικά κύτταρα της ζώνης II και τα κύτταρα της ζώνης III που παρουσιάζουν νέκρωση. Τα υποξικά κύτταρα της ζώνης II εκφράζουν τους HIF μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων που επηρεάζουν την πρόοδο του καρκίνου. Πηγή: (66) Τροποποιημένη

Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η συσχέτιση της υποξίας με παθολογικές καταστάσεις, και ιδιαίτερα με τον καρκίνο (Εικόνα 7). Καθώς οι όγκοι αυξάνονται σε μέγεθος, δεν αιματώνονται σωστά με αποτέλεσμα το εσωτερικό περιβάλλον του όγκου να είναι υποξικό. Με στόχο την επιβίωση τους, τα καρκινικά κύτταρα επιστρατεύουν μονοπάτια κατά την υποξία, μέσω των οποίων επαναπρογραμματίζουν διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός ώστε να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους. Πιο συγκεκριμένα, η υποξία ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου καθώς ενισχύει την διαδικασία της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νέα αγγεία από τα οποία ο αναπτυσσόμενος όγκος μπορεί να προμηθευτεί αίμα, O_2 και θρεπτικά. Ακόμη, διευκολύνει την διαδικασία της διήθησης (invasion) και της μετάστασης (metastasis) με την επαγωγή του EMT (Epithelial-

Mesenchymal Transition), και την αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στο νέο ιστό ώστε να είναι φιλικό προς αυτόν (66). Τέλος, η υποξία εξασφαλίζει την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε καρκινικές θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία (67) και η ακτινοθεραπεία (68).

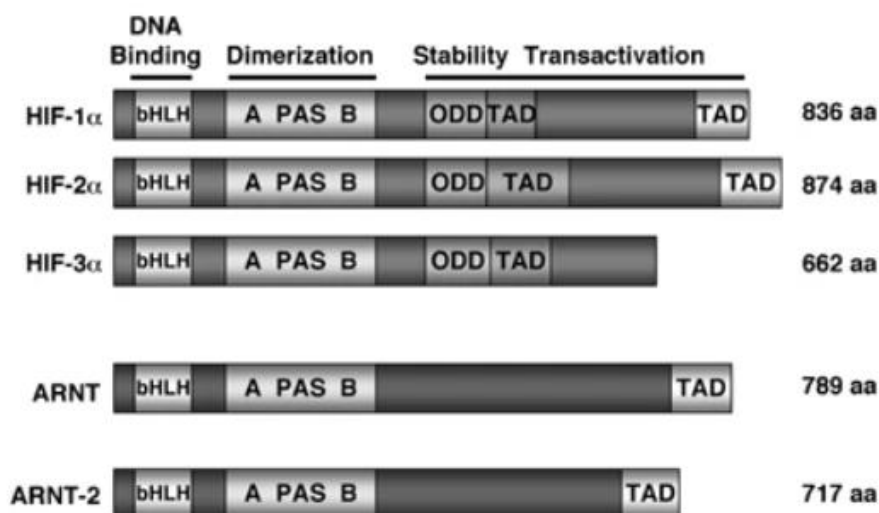
1.2.2 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Η προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία μεσολαβείται από μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων επαγόμενος από την υποξία (HIFs, Hypoxia Inducible Factors). Οι HIF αποτελούν ετεροδιμερή σύμπλοκα αποτελούμενα από μία οξυγόνο-εξαρτώμενη α -υπομονάδα και μία σταθερή β -υπομονάδα, επίσης γνωστή ως HIF-1 β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) (69). Τα ετεροδιμερή αναγνωρίζουν και προσδένονται σε ειδικά σημεία απόκρισης στην υποξία, HREs (Hypoxia Related Elements) στο γονιδίωμα, που περιέχουν μία συντηρημένη αλληλουχία 5'-RCGTG-3' (όπου R \rightarrow A ή G). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 3 ισομορφές της HIF- α υπομονάδας, οι HIF-1 α , HIF-2 α και HIF-3 α (Εικόνα 8) (70).

Ο HIF-1 α ήταν ο πρώτος που χαρακτηρίστηκε από τον Semenza και τους συνεργάτες του, οι οποίοι απέδειξαν την σύνδεση του στον ενισχυτή του γονιδίου EPO που απαιτείται για την ενεργοποίηση του γονιδίου EPO κατά την υποξία σε κύτταρα Hep3B (71). Ο HIF-1 α περιέχει 4 διακριτές περιοχές. Στο αμινοτελικό του άκρο διακρίνεται μία περιοχή bHLH (basic helix-loop-helix) μέσω της οποίας πραγματοποιείται η σύνδεση με το DNA και μία περιοχή PAS που χρησιμεύει στον ετεροδιμερισμό των δύο υπομονάδων. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αναγνωρίζεται η περιοχή ODD (oxygen-dependent degradation domain), η οποία χρειάζεται για την αποικοδόμηση που ρυθμίζεται από το οξυγόνο και δύο συν-ενεργοποιητικές περιοχές TAD (transactivation domain), στις οποίες προσδένονται μεταγραφικοί ρυθμιστές που επάγουν την μεταγραφή (72). Η δεύτερη ισομορφή που ανακαλύφθηκε ήταν η HIF-2 α ή αλλιώς EPAS1 (73), η οποία παρουσιάζει ομοιότητα με τον HIF-1 α τόσο στη δομή όσο και στην αμινοξική αλληλουχία (48% ομοιότητα). Δημιουργεί ετεροδιμερή με τον ARNT οδηγώντας στην ενεργοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, ενώ εντοπίζεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους σε αντίθεση με τον HIF-1 α , ο οποίος εκφράζεται καθολικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Ειδικότερα, ο HIF-2 α εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε νευρογλοιακά κύτταρα, σε πνευμονοκύτταρα τύπου II, σε καρδιομυοκύτταρα, σε ινοβλάστες του νεφρού και σε ηπατοκύτταρα (74). Η τελευταία ισομορφή που βρέθηκε ήταν η HIF-3 α . Αυτή παρουσιάζει παρόμοια δομή με τις HIF-1 α και HIF-2 α , με μόνη διαφορά την έλλειψη της

μίας από τις δύο περιοχές TAD. Δημιουργεί ετεροδιμερή με την HIF-1β και αποτελεί αντικείμενο εναλλακτικού ματίσματος με αποτέλεσμα την δημιουργία τουλάχιστον 6 διαφορετικών HIF-3α ισομορφών που μπορούν να έχουν λειτουργίες διαφορετικές από την μεταγραφή. Μία από τις ισομορφές, η HIF3α4, ρυθμίζει αρνητικά την μεταγραφική ικανότητα των HIF-1α και HIF-2α μετά από άμεση σύνδεση με αυτές (75). Η έκφραση της HIF-3α παρατηρείται στο θύμο, στον πνεύμονα, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο συκώτι και στα μάτια (76).

Τέλος, εκτός από την πρωτεΐνη ARNT υπάρχει και μία δεύτερη HIF-β υπομονάδα, η οποία μπορεί να δημιουργήσει ετεροδιμερή με τις HIF-α υπομονάδες, η ARNT2. Αυτή παρουσιάζει ομοιότητα 57% στην αμινοξική αλληλουχία με την ARNT αλλά δεν συν-εντοπίζεται με αυτήν στους ίδιους ιστούς. Ενώ η ARNT εκφράζεται παντού, η ARNT2 εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στους νεφρούς (77).



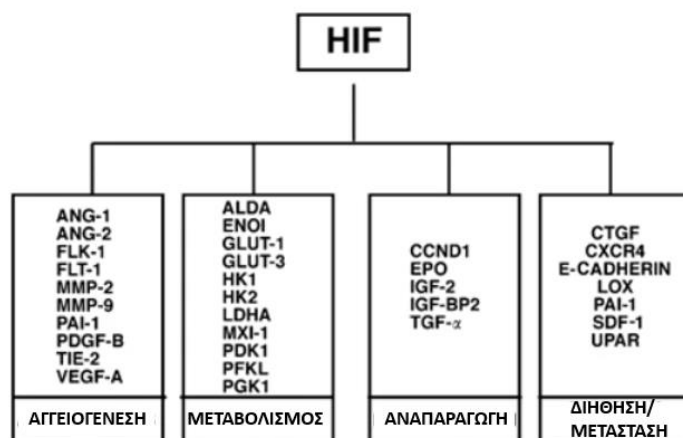
Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων HIF και των πρωτεϊνικών τους περιοχών. Πηγή: (70)

1.2.3 Γονίδια στόχοι των HIFs

Οι HIF έχουν ως στόχο γονίδια που είναι απαραίτητα για την προσαρμογή και επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Αρχικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη ομάδων γονιδίων που ρυθμίζονται τόσο από τον HIF-1α όσο και από τον HIF-2α, αλλά και την ύπαρξη γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται αποκλειστικά από μία HIF-α υπομονάδα (78). Έρευνες έδειξαν πως μετά από πειράματα ανταλλαγής πρωτεϊνικών περιοχών μεταξύ των HIF-1α και HIF-2α, η εξειδίκευση στην μεταγραφή γονιδίων παρέχεται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των περιοχών TAD της κάθε υπομονάδας με διάφορους μεταγραφικούς ρυθμιστές (79). Επίσης, δεν είναι

απολύτως κατανοητοί οι μηχανισμοί προτίμησης του HIF-1α και του HIF-2α σε συγκεκριμένα HREs (80). Οι HIFs ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν γλυκολυτικά ένζυμα (πχ. HK1, HK2), αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τη σύνθεση και την έκκριση του γαλακτικού οξέος (πχ. LDH, MCT4) προωθώντας τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των υδατανθράκων, με χαρακτηριστικό τη μείωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την αύξηση της γλυκόλυσης (81). Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τους HIF στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, καθώς η οξείδωση των λιπαρών οξέων και η αποθήκευση των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας και βοηθούν το κύτταρο να επιβιώσει σε καταστάσεις υποξίας. Παραδείγματα της δράσης των HIF στο μεταβολισμό των λιπιδίων είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ μέσω του οποίου αυξάνεται η πρόσληψη λιπαρών οξέων και η σύνθεση τριακυλογλυκερολών, αλλά και η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης FABP (fatty acid binding protein) ενισχύοντας έτσι την διαδικασία της λιπογένεσης (82).

Ακόμη, μέσω της δράσης των HIF ενισχύονται οι διαδικασίες της ερυθροποίησης και της αγγειογένεσης, καθώς ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων της ερυθροποιητίνης (EPO) και του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) αντίστοιχα (83). Άλλοι στόχοι των HIF ρυθμίζουν διαδικασίες, όπως η βλαστικότητα (πχ. Oct4), το αναπτυξιακό πρόγραμμα EMT (πχ. ZEB1,2), η απόπτωση (πχ. BNIP3) και οι διαδικασίες της μετάστασης και διήθησης (πχ. LOX, MMP1, TWIST) (84). Μία λίστα χαρακτηριστικών γονιδίων των οποίων η έκφραση τροποποιείται κατά την υποξία με σκοπό την προώθηση της ογκογένεσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.



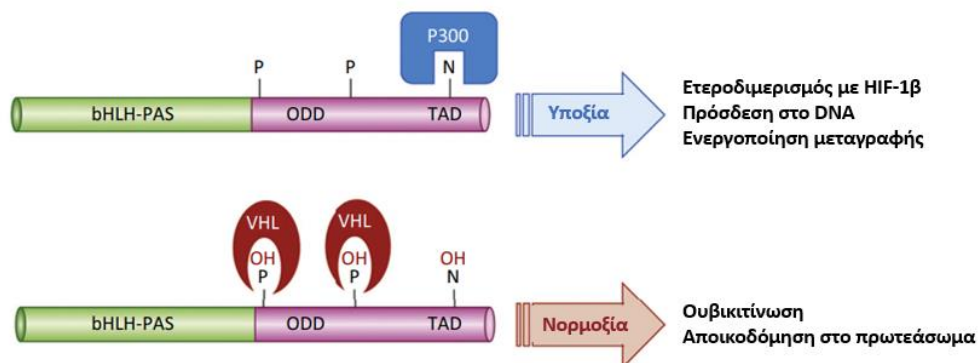
Εικόνα 9. Λίστα των γονιδίων που επάγονται από τη δράση των HIFs και προωθούν την ογκογένεση. Οι HIF ρυθμίζουν την έκφραση πάνω από 1000 γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου, επηρεάζοντας λειτουργίες όπως η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή και η μετάσταση. Πηγή: (70) Τροποποιημένη

1.2.4 Η ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων

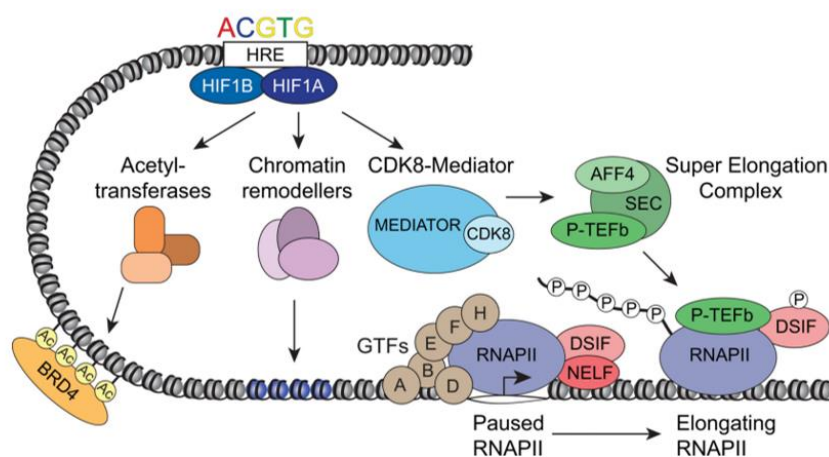
Όπως περιγράφεται και στην Εικόνα 10, σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου (νορμοξία), η υπομονάδα HIF-α υπόκειται σε υδροξυλίωση από τα ένζυμα PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain) σε συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης. Ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564, ο HIF-2α στα κατάλοιπα προλίνης 405 και 531 και ο HIF-3α στο κατάλοιπο προλίνης 492. Αυτές οι προλίνες περιέχονται σε συγκεκριμένα αμινοξικά μοτίβα των περιοχών ODD των ισομορφών της HIF-α υπομονάδας και με την υδροξυλίωση τους επιτρέπουν την σύνδεση του VHL (von Hippel-Lindau) μέρος του συμπλόκου λιγάσης ουβικιτίνης, ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί μία E3 λιγάση οδηγώντας τους HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (66).

Επιπλέον, οι HIF-1α και HIF-2α υδροξυλιώνονται και σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn-803 για τον HIF-1α, Asn-847 για τον HIF-2α) από το ένζυμο FIH (Factor Inhibiting HIF). Τα υδροξυλιωμένα αυτά κατάλοιπα εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της περιοχής TAD με τον συμπαράγοντα p300/CBP διακόπτοντας την περαιτέρω δράση του (85). Σε συνθήκες υποξίας, τα ένζυμα PHD και FIH αναστέλλονται εξαιτίας της έλλειψης μοριακού οξυγόνου. Έτσι, η υπομονάδα HIF-α δεν αποικοδομείται και μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου ετεροδιμερίζεται με την υπομονάδα HIF-1β. Στη συνέχεια, το ετεροδιμερές προσδένεται στο DNA, όπου αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς ρυθμιστές και μεταγραφικούς παράγοντες και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Εικόνα 11) (86).



Εικόνα 10. Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων. Σε συνθήκες νορμοξίας, η υδροξυλίωση καταλοίπων αργινίνης και προλίνης εμποδίζει την σύνδεση του συμπαράγοντα p300/CBP και ενισχύει την σύνδεση του καταστολέα VHL οδηγώντας σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Αντίθετα σε συνθήκες υποξίας η υδροξυλίωση εμποδίζεται, η υπομονάδα α σταθεροποιείται και διμερίζεται με την υπομονάδα HIF-1β με σκοπό την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ακόμη, κατά την υποξία ευνοείται και η πρόσδεση του συμπαράγοντα p300. Πηγή: (66) Τροποποιημένη

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, σε συνθήκες υποξίας, η υπομονάδα HIF-1α διμερίζεται με την υπομονάδα HIF-1β και μαζί συνδέονται στα HREs στο DNA. Εκεί, ο HIF-1α στρατολογεί διάφορους ενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως την υπομονάδα του συμπλόκου του Διαμεσολαβητή (MED1, Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1), ακετυλοτρασφεράσες και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της ακετυλίωσης ιστονών και την απελευθέρωση της σταματημένης RNA II πολυμεράσης.



Εικόνα 11. Μοντέλο της δράσης του HIF-1α. Κατά την νορμοξία, σχεδόν όλα τα γονίδια-στόχοι του HIF-1α παρουσιάζουν ένα περιβάλλον ανοιχτής χρωματίνης με συνδεδεμένη την RNA πολυμεράση II (RNAPII), η οποία είναι σταματημένη. Κατά την υποξία, ο HIF-1α διμερίζεται με τον HIF-1β και μαζί συνδέονται στα HREs των γονιδίων-στόχων. Στη συνέχεια, ο HIF-1α στρατολογεί διάφορους συμπαράγοντες, συμπεριλαμβανομένων ακετυλοτρασφερασών, παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, αλλά και του συμπλόκου Διαμεσολαβητή-CDK8 και του συμπλέγματος επιμήκυνσης (SEC) που περιέχει τις AFF4, P-TEFb. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν σε αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών και στην ενεργοποίηση της σταματημένης RNAPII. Πηγή: (84)

Μη Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων

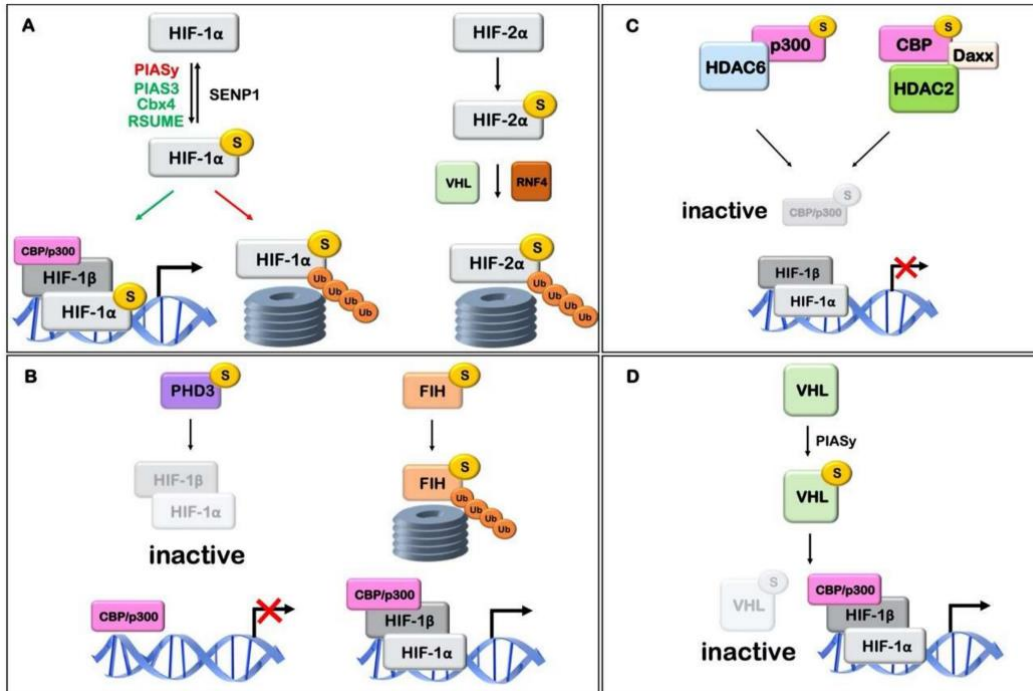
Εκτός της οξυγονοεξαρτωμενης ρύθμισης οι HIF-1α και HIF-2α μπορούν να ρυθμιστούν σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο ανεξάρτητα της συγκέντρωσης οξυγόνου. Σε επίπεδο μεταγραφής, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κβ (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Αυξημένα επίπεδα του mRNA του HIF-1α παρατηρούνται μετά από ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού με την επίδραση κυτοκινών, ιντερλευκινών (87) και LPS (Lipopolysaccharide) (88). Ακόμη, επαγωγή του HIF-1α παρατηρείται μετά από ρύθμιση μέσω της πρωτεΐνης BAF57 (BRG1-associated factor 57) η οποία αποτελεί μέλος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF (89). Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α φαίνεται να αυξάνεται μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, όπως έχει παρατηρηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές τόσο μέσω του συμπλόκου mTOR1 όσο και μέσω του mTOR2 (90).

Άλλη μία ρύθμιση που επηρεάζει τα επίπεδα πρωτεΐνης είναι η επίδραση της πρωτεΐνης IREBP1 (iron response element binding protein 1) κατά τη μετάφραση του HIF-2α. Η πρωτεΐνη αυτή αφού συνδεθεί σε μία συγκεκριμένη περιοχή της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου του HIF-2α, καταστέλλει την μετάφρασή του (91).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν σημείο ρύθμισης των HIF. Εκτός από την υδροξυλίωση και την ουβικιτίνωση των παραγόντων αυτών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 1.2.4 *Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων*), τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η S-νιτροσυλίωση έχουν επίσης αποδειχθεί ότι τροποποιούν κατάλοιπα των HIF, επιδρώντας έτσι στον εντοπισμό, στην ενεργότητα και στη σταθερότητά τους (92).

Μία ακόμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ρυθμίζει την δράση των HIF αλλά και άλλων πρωτεϊνών του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία, είναι η σουμοϋλίωση (Εικόνα 12) (93). Όσον αφορά στη σουμοϋλίωση του HIF τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι αντιθετικά. Έχει αποδειχθεί πως ο HIF-1α σουμοϋλιώνεται στα κατάλοιπα λυσίνης 391 και 477 με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας και της μεταγραφικής του ενεργότητας (94). Η σουμοϋλίωση μέσω της E3 λιγάσης RSUME φαίνεται να επαληθεύει αυτό το εύρημα (47), ενώ μελέτες της *in vitro* σουμοϋλίωσης από την E3 λιγάση RanBP2/Nup538 αποδεικνύουν το αντίθετο (95). Ακόμη, η σουμοϋλίωση του HIF-2α *in vitro* οδηγεί στην αποικοδόμηση του μέσω της δράσης του καταστολέα VHL και της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης RNF4 (96). Αντικρουόμενα είναι επίσης τα αποτελέσματα ερευνών που αφορούσαν την σουμοϋλίωση του HIF-1α από τις E3 λιγάσες PIASy και Cbx4. Ειδικότερα, η PIASy φαίνεται να ενισχύει την σουμοϋλίωση του HIF-1α, ελαττώνοντας όμως την ενεργότητα και σταθερότητα του (97), ενώ η σουμοϋλίωση μέσω της Cbx4 αυξάνει την δράση του HIF-1α (98).

Άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία που υφίσταται σουμοϋλίωση είναι οι συμπαραγόντες p300/CBP, οι υδροξυλάσες PHDs και FIH αλλά και ο καταστολέας VHL. Πιο συγκεκριμένα, η σουμοϋλίωση τόσο του παράγοντα p300 όσο και του CBP έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή τους και κατά συνέπεια την καταστολή του HIF-1α (99), (100). Η συζευγμένη με SUMO υδροξυλάση PHD3 αποτελεί ένα πιο ικανό καταστολέα της δράσης του HIF-1α (101), ενώ η σουμοϋλίωση της υδροξυλάσης FIH οδηγεί στην αποικοδόμησή της και κατά συνέπεια στην ενίσχυση της δράσης του HIF-1α (102). Τέλος, η σουμοϋλίωση του καταστολέα VHL στην λυσίνη K171 προωθεί την απενεργοποίησή του οδηγώντας έτσι στην σταθεροποίηση και ενεργοποίηση του HIF-1α (103).



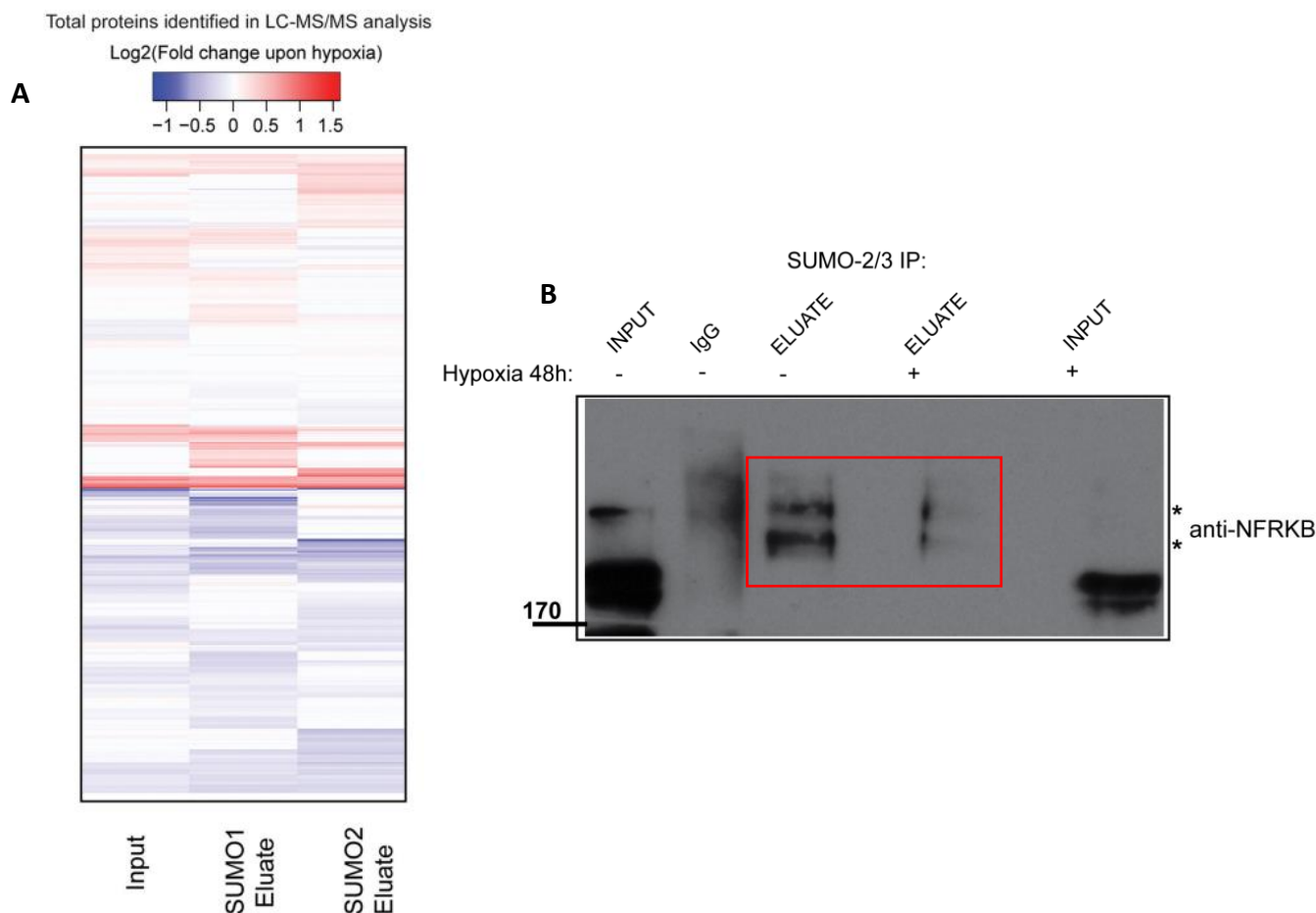
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία με τις πρωτεΐνες SUMO. Η σουμοϋλίωση αλληλεπιδρά και τροποποιεί ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία ρυθμίζοντας έτσι την δράση και σταθερότητα του HIF-1α. Πηγή: (93)

1.2.5 Η υποξία ως ρυθμιστής της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών

Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην ισχαιμία αλλά και σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία, δεν είναι απολύτως γνωστό αν η υποξία επηρεάζει γενικά το μηχανισμό σουμοϋλίωσης όλων των πρωτεϊνών ή των πρωτεϊνών που ενέχονται στο μηχανισμό απόκρισης στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Με σκοπό, λοιπόν, την αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ σουμοϋλίωσης και της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία πραγματοποιήθηκε έρευνα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ από την ερευνητική ομάδα της κ. Χαχάμης όπου μελετήθηκαν εκτενώς οι αλλαγές του προτύπου σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών κατά την υποξία σε καρκινικά κύτταρα (104). Στα πλαίσια της μελέτης αυτής έγινε ανοσοκατακρήμνιση των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των συνολικών SUMO1-πρωτεωμάτων και SUMO2/3-πρωτεωμάτων με ποσοτική πρωτεομική ανάλυση σε κύτταρα HeLa σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 13A). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως αρχικά, δεν παρατηρούνται μαζικές αλλαγές στη σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών κατά την υποξία. Ενδιαφέρον παρουσίασε η παρουσία μίας ομάδας πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μεταβάλλονται σε συνθήκες υποξίας,

χωρίς να παρουσιάζουν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους (104). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυρίως μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμιστές της μεταγραφής. Σε αυτήν την ομάδα ανήκει και η πρωτεΐνη NFRKB, ένας μεταγραφικός ρυθμιστής του οποίου τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μειώνονται κατά την υποξία (Εικόνα 13B). Η διερεύνηση της σουμοϋλίωσης και του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής στην απόκριση στην υποξία, αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στο Εργαστήριο και αποτέλεσε το κύριο θέμα μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

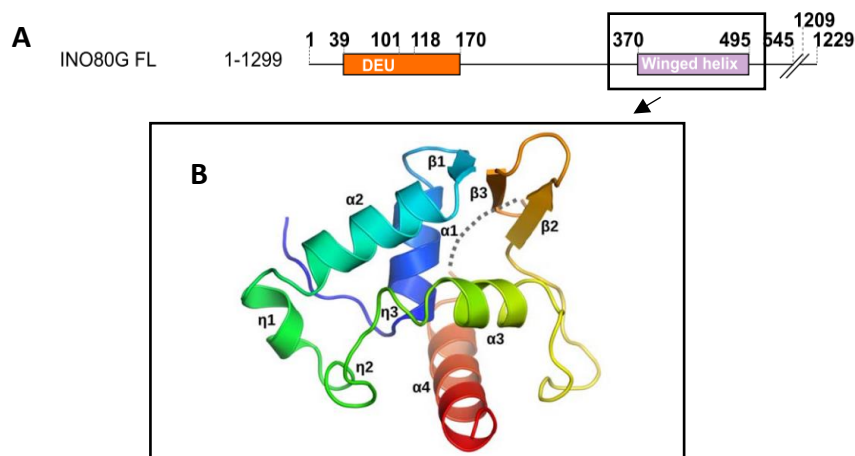


Εικόνα 13. Ο NFRKB ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μεταβάλλονται σε συνθήκες υποξίας, χωρίς να παρουσιάζουν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους. (A) Θερμικός χάρτης που αναπαριστά τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας από δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Η πρώτη στήλη περιλαμβάνει πρωτεΐνες από τα κυτταρικά εκχυλίσματα (inputs), ενώ η δεύτερη και η τρίτη αφορούν πρωτεΐνες από τα εκλούσματα (eluates) που κατακρημνίστηκαν με αντισώματα έναντι της SUMO1 και της SUMO2/3 αντίστοιχα. Η αυξημένη και η μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών στην υποξία υποδηλώνεται με κόκκινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα. Το άσπρο χρώμα υποδηλώνει καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ νορμοξίας και υποξίας ή έλλειψη δεδομένων. (B) Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης NFRKB με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων (INPUTS) και των εκλουσμάτων (ELUATES) από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι του NFRKB. Αριστερά συμβολίζεται το μοριακό βάρος στο οποίο ανιχνεύθηκε ο NFRKB (170kDa). Στο κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η μείωση των ζωνών που αντιστοιχούν στις σουμοϋλιωμένες μορφές του NFRKB κατά την υποξία. Πηγή: (104)

1.3 NFRKB (Nuclear Factor Related to KappaB Binding Protein)

1.3.1 Δομή και λειτουργία του NFRKB

Ο NFRKB ή αλλιώς γνωστός ως INO80G ανήκει στο ανθρώπινο σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης hINO80 και εμπλέκεται κυρίως στη ρύθμιση της μεταγραφής. Το γονίδιο του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 (11q24 – q25) και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη περίπου 1299 αμινοξέων (παρατηρούμενο MB σε πηκτή 170kDa) (105). Μέχρι και σήμερα, η ολική τριτοταγής δομή του NFRKB παραμένει άγνωστη. Με περίπου το 65% της πρωτεΐνης να προβλέπεται ότι βρίσκεται σε μία αποδιοργανωμένη κατάσταση, έχουν κρυσταλλωθεί μόνο δύο δομικές περιοχές, οι οποίες σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Εικόνα 14A). Αυτές είναι, ο τομέας Winged-Helix Like Domain (NFRKB-WHL) (Εικόνα 14B) (106), και ο τομέας DEUBAD μέσω του οποίου ο NFRKB συνδέεται με την πρωτεΐνη UCHL5. Ακόμη, ο NFRKB αναγνωρίζει και προσδένεται στην αλληλουχία DNA “5-GGGGAATCTCC-3” (106).



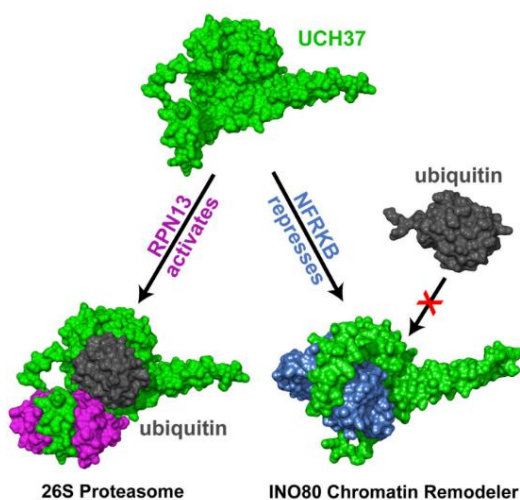
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της δομής του NFRKB. (A) Αριστερά απεικονίζεται η δομή DEUBAD (DEU) μέσω της οποίας ο NFRKB συνδέεται με την UCHL5. Δεξιά απεικονίζεται η περιοχή Winged-Helix Like Domain. Πηγή: (112) Τροποποιημένη (B) Κρυσταλλική δομή της περιοχής Winged-Helix του ανθρώπινου NFRKB. Διάγραμμα της ανθρώπινης NFRKB-WHL περιοχής (κατάλοιπα 370-495). Η δομή απεικονίζει το N-τελικό άκρο (μπλε) και το C-τελικό άκρο (κόκκινο), καθώς και τις έλικες β1-β4, β-φύλλα β1-β3 και τις 3₁₀ έλικες η1-η3. Πηγή: (106)

Οι λειτουργίες του NFRKB κυμαίνονται από την επιδιόρθωση του DNA, στην πολυδυναμία των κυττάρων και στην προστασία των τελομερών. Συγκεκριμένα, η κύρια δράση του NFRKB είναι ως η ειδική υπομονάδα G του ανθρώπινου συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, hINO80 (hINO80G). Το hINO80 ως σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ρυθμίζει την συγκρότηση και την διάλυση των νουκλεοσωμάτων, όπως και την μετακίνηση τους κατά μήκος του DNA (107). Σημαντικές λειτουργίες του INO80 είναι η ρύθμιση της μεταγραφής (108), η επιδιόρθωση (109) και

η αντιγραφή του DNA (110). Το σύμπλοκο αυτό εξαρτάται από την ενέργεια υδρόλυσης του ATP και αποτελείται από 15 υπομονάδες, 8 από τις οποίες είναι συντηρημένες και στο σύμπλεγμα INO80 του ζαχαρομύκητα, ενώ οι άλλες 5 είναι αποκλειστικές στον άνθρωπο. Μία από αυτές τις 5 είναι και ο παράγοντας NFRKB (111).

Αρχικές μελέτες δείχνουν πως ο NFRKB, ως μέρος του συμπλόκου INO80 προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο της UCHL5 (ή UCHL37) μέσω του αμινοτελικού του άκρου (κατάλοιπα 1-476) (105). Η UCHL5 είναι μέλος των υδροξυλασών του καρβοξυτελικού άκρου της ουβικιτίνης (Ubiquitin C-terminal Hydrolases, UCHs), οι οποίες επίσης ανήκουν στην ομάδα των DUBs (Deubiquitinating enzymes) δηλαδή των ενζύμων υπεύθυνων για την απομάκρυνση των μορίων ουβικιτίνης (112). Η περιοχή DEUBAD έχει μία χαρακτηριστική δομή φουρκέτας FRF (κατάλοιπα 96-103) μέσω της οποίας συνδέεται με την Leu38 της UCHL5 επηρεάζοντας την δράση της. Ακόμη, η σύνδεση με την UCHL5 υποβοηθείται και από την α-έλικα α6 της περιοχής DEUBAD, η οποία σταθεροποιεί τη τοποθέτηση της φουρκέτας FRF (113).

Η αλληλεπίδραση της UCHL5 με τον NFRKB οδηγεί στην αναστολή της (Εικόνα 15). Πιο συγκεκριμένα, ο NFRKB ελαττώνει την συγγένεια που έχει η UCHL5 με τα υποστρώματά της και ειδικότερα με την ουβικιτίνη. Η πρόσδεση της φουρκέτας FRF του NFRKB στο κατάλοιπο λευκίνης (Leu38) της UCHL5 μιμείται την αντίστοιχη σύνδεση της φουρκέτας β1-β2 της ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη (112). Η ανασταλτική αυτή δράση του NFRKB αναιρείται από την δράση της πρωτεΐνης RPN13, η οποία αποτελεί ρυθμιστική υπομονάδα του 19S πρωτεασώματος (113).



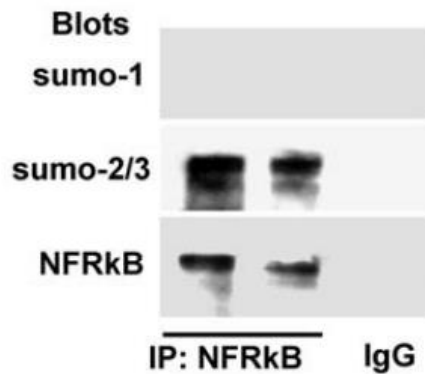
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των NFRKB και RPN13 στην πρωτεΐνη UCH37. Ο NFRKB αναστέλλει την UCH37 καθώς εισέρχεται στην θέση σύνδεσής της με την ουβικιτίνη. Ο παράγοντας RPN13 αναιρεί την λειτουργία του NFRKB ενεργοποιώντας την UCH37. Πηγή: (113)

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση NFRKB-UCHL5 παρουσιάζει ενδιαφέρον στη δράση του NFRKB στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Ο NFRKB, ως μέρος του συμπλόκου INO80 συμμετέχει στην διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA μέσω της δράσης του κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό αλλά και την στρατολόγηση ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA (πχ. EXO1). Η λειτουργία του αυτή καθίσταται δυνατή εξαιτίας της προστασίας που έχει εξασφαλίσει μέσω της σύνδεσής του με την UCHL5. Η UCHL5 δρα και απομακρύνει τα μόρια ουβικιτίνης από τον NFRKB με αποτέλεσμα να διαφεύγει την αποικοδόμηση (114).

Ακόμη μία λειτουργία που έχει αποδοθεί στον NFRKB είναι η διατήρηση της πολυδυναμίας των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs). Πειράματα αποσιώπησης του NFRKB απέδειξαν τη λειτουργία του παράγοντα αυτού στην απόκτηση της πολυδυναμίας σε ανθρώπινους ινοβλάστες καθώς η αποσιώπηση του NFRKB οδήγησε στην μείωση των αποικιών των ινοβλαστών που επαναπρογραμματίστηκαν σε iPSCs (115). Περαιτέρω μελέτες πράγματι τοποθέτησαν το σύμπλοκο INO80 μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, σε περιοχές ανοιχτής χρωματίνης, όπου πιθανώς στρατολογεί τον Διαμεσολαβητή και την RNA πολυμεράση II, οδηγώντας στην μεταγραφή γονιδίων που διατηρούν τον πολυδύναμο χαρακτήρα των κυττάρων αυτών (116).

Νέα δεδομένα χαρακτηρίζουν τον NFRKB και ως μία πρωτεΐνη προστασίας των τελομερών (Telomere Associated Protein, TAP), η οποία εξασφαλίζει την φυσιολογική δομή και λειτουργία των τελομερών, πιθανώς μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες γνωστές TAPs (TRF2, TERF2IP) μέσω ενός εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών (117, 118). Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και δεν απαιτεί την δράση της τελομεράσης, ενώ βρίσκεται ενεργοποιημένος στο 10-15% των καρκίνων στον άνθρωπο.

Τέλος, ο NFRKB υπόκειται σε σουμοϋλίωση. Όπως αναφέρθηκε, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (104) απέδειξαν ότι ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από τις πρωτεΐνες SUMO2/3 και ότι αυτή η σουμοϋλίωση μειώνεται σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 13B). Ακόμη, η σουμοϋλίωση του NFRKB από τις SUMO2/3 παρατηρείται και σε ασθενείς με νεφρωτικό σύνδρομο ελάχιστης αλλαγής (MCNS), όπως αποκαλύπτουν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με MCNS (σε υποτροπιάζουσα φάση) (Εικόνα 16) (119). Γενικά, δεν είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του NFRKB, τόσο στην ασθένεια MCNS, όσο και στην υποξία και στους μηχανισμούς απόκρισης σε αυτήν.



Εικόνα 16. Αποτέλεσμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western μετά από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης του NFRkB σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με MCNS. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SUMO1, SUMO2/3 και του NFRkB. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Πηγή: (119)

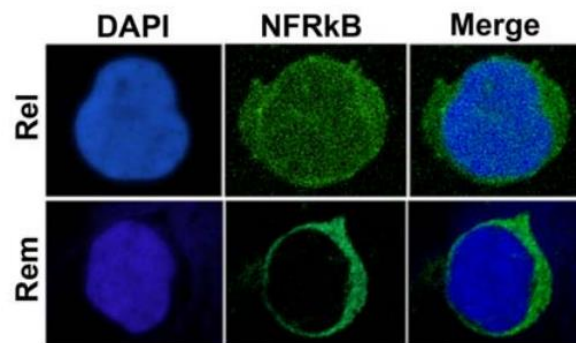
1.3.2 Η σημασία του NFRkB στη νόσο και τον καρκίνο

Μία ασθένεια που σχετίζεται με τον NFRkB, είναι το νεφρωτικό σύνδρομο (Minimal Change Nephrotic Syndrome, MCNS). Μελέτες απέδειξαν την αυξημένη έκφραση του NFRkB σε CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα και B-κύτταρα σε ασθενείς με MCNS (κυρίως σε υποτροπιάζουσα φάση) όπως και την αλλαγή του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης αυτής, αφού κατά την υποτροπή των ασθενών εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ κατά την ύφεση τους στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 17). Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα (βλ. 1.3.1), ο NFRkB εμφανίζεται σουμοϋλιωμένος σε μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος ασθενών σε υποτροπή, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί ο ρόλος αυτής της τροποποίησης, ενώ έχουν αποδοθεί και άλλοι ρόλοι του παράγοντα αυτού στην ασθένεια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού API αλλά και τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης καθώς ενισχύει την απομεθυλίωση του DNA (119).

Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας δείχνουν πως η έκφραση του NFRkB συσχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ειδικότερα, τα επίπεδα έκφρασης του NFRkB βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με Μέτρια Δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου (Moderate Squamous Dysplasia) (120). Επίσης, η απουσία του γονιδίου του NFRkB είναι απαραίτητη για την εμφάνιση θρομβοπενίας (121) ενώ ο NFRkB βρέθηκε ικανός υποψήφιος για τη θέση 11q24.3 στο χρωμόσωμα 11, η οποία εμφανίζει υψηλό προφίλ μεταλλάξεων στο σύνδρομο Burkitt-like lymphoma (122).

Εκτός από την εμπλοκή του NFRkB σε παθολογικές καταστάσεις, ο παράγοντας αυτός σχετίζεται και με συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους. Το σύμπλοκο INO80 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου (110). Ορισμένες υπομονάδες του είναι υπερεκφρασμένες σε

διαφορετικούς καρκινικούς τύπους, όπως στο μελάνωμα (123), στο καρκίνο στον πνεύμονα (124) και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (125).



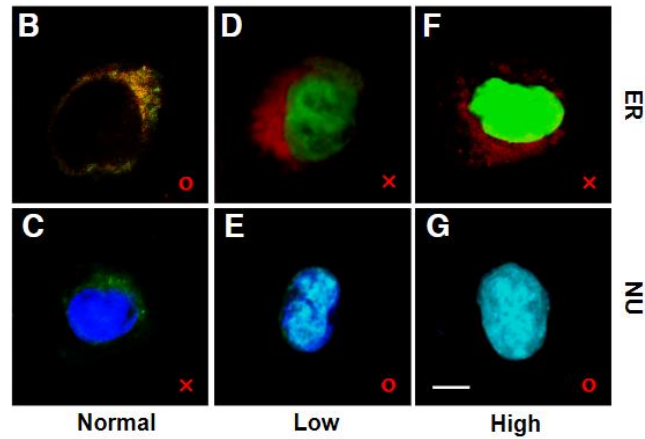
Εικόνα 17. Αποτελέσματα πειράματος ανοσοφθορισμού μονοπύρηνων περιφερικού αίματος ασθενών με MCNS. Ανάλυση σε κύτταρα ασθενών σε υποτροπή (Rel) και σε ύφεση (Rem) με αντίσωμα έναντι του NFRkB (πράσινο χρώμα). Οι πυρήνες εντοπίζονται με την χρώση DAPI (μπλε χρώμα). Πηγή: (119)

Ακόμη, τα επίπεδα του NFRkB παρατηρήθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) (126), όπως και σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, όπου ο NFRkB αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη UCHL5, αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη, καθώς ενισχύει την αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων και κατά συνέπεια την πρόοδο της ασθένειας (127). Μελέτες βρήκαν πως ένα lncRNA, το DRAIC, μπορεί να αναστείλει την αναπαραγωγή και την μετάσταση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο NFRkB-UCHL5 και προωθώντας την αποικοδόμηση του NFRkB.

Επίσης, ο NFRkB πιθανώς εμπλέκεται στην πρόοδο του γλοιώματος καθώς καταστέλλει την UCHL5 με άμεση συνέπεια την μετάσταση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων (127, 128). Μελέτες υποστηρίζουν πως η πρωτεΐνη UCHL5 μπορεί να περιορίσει την μετάσταση και την διήθηση των κυττάρων του γλοιώματος ελαττώνοντας την έκφραση του SNRPF, μίας ριβονουκλεοπρωτεΐνης που συμμετέχει στο σωματίο ματίσματος (128). Παράλληλα, μία ανάλυση, σε επίπεδο πρωτεώματος, πρωτεϊνών που παρουσιάζουν διαφορετικό ενδοκυτταρικό εντοπισμό σε καρκινικά κύτταρα ασθενών με γλοίωμα, απέδειξε την μετακίνηση του NFRkB από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον πυρήνα (Εικόνα 18) (129).

Τέλος, μία πρόσφατη μελέτη συσχετίζει τον NFRkB με τον καρκίνο του ήπατος για τον οποίο αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη. Ο NFRkB θεωρείται μία πρωτεΐνη προστασίας των τελομερών (TAP), η οποία παρατηρείται αυξημένη σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα όπου συμβαίνει ένας εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NFRkB

εντοπίζονται στον πυρήνα ηπατικών καρκινικών κυττάρων σε σχέση με φυσιολογικά ηπατοκύτταρα όπου ο παράγοντας αυτός εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα (118).



Εικόνα 18. Αποτελέσματα πειράματος ανοσοφθορισμού του *NFRKB* σε φυσιολογικούς ιστούς αλλά και σε ιστούς ασθενών με γλοίωμα. Ανάλυση σε φυσιολογικά (*normal*) κύτταρα, αλλά και σε κύτταρα ασθενών με γλοίωμα *low-grade* (*low*) και γλοίωμα *High-grade* (*high*) με αντισώματα έναντι του *NFRKB* (πράσινο), και δείκτες για το ενδοπλασματικό δίκτυο (*ER*) (κόκκινο) και για τον πυρήνα (*NU*) (μπλε). Στην εικόνα B, το κίτρινο χρώμα σημαίνει το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η ύπαρξη γαλάζιου χρώματος στις εικόνες E και G, σημαίνει τον εντοπισμό του *NFRKB* στον πυρήνα. Τα σήματα o και x στην κάτω δεξιά γωνία των εικόνων δηλώνουν την επικάλυψη ή μη αντίστοιχα, του *NFRKB* με τους δείκτες υποκυτταρικού εντοπισμού. Πηγή: (129)

2. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Ο παράγοντας NFRKB είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής με διάφορες λειτουργίες σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Α δημοσίευτες μελέτες του εργαστηρίου μας, έδειξαν πως ο NFRKB εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία με δύο τρόπους: α) ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από τις πρωτεΐνες SUMO2/3 και ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών των οποίων το πρότυπο σουμοϋλίωσης αλλάζει στην υποξία, και β) ο NFRKB (μετά από αποσιώπησή του) φαίνεται να επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων που ενεργοποιούνται από την υποξία και τους HIF. Έτσι, ξεκίνησε η μελέτη της λεπτομερούς διερεύνησης του ρόλου της σουμοϋλίωσης του NFRKB στην λειτουργία του παράγοντα αλλά και στην συμμετοχή του στον μηχανισμό απόκρισης στην υποξία.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί κομμάτι αυτής της μελέτης, έχοντας δύο κύριους ερευνητικούς στόχους:

- I. Πρώτον, την μελέτη της εμπλοκής του παράγοντα NFRKB στο μονοπάτι απόκρισης των κυττάρων στην υποξία. Για το σκοπό αυτό θα ελεγχθεί η έκφραση του NFRKB σε διάφορους τύπους καρκίνου και θα διερευνηθεί η συσχέτιση του με παράγοντες της υποξίας (HIF) με βιοπληροφορική ανάλυση. Επιπλέον θα διερευνηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης του NFRKB στην μεταγραφική ενεργότητα των παραγόντων HIF, χρησιμοποιώντας το σύστημα της HIF εξαρτώμενης επαγωγής της λουσιφεράσης.
- II. Δεύτερον, τη δημιουργία μίας μεταλλαγμένης μορφής του NFRKB που έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην μελέτη της επίδρασης της σουμοϋλίωσης στη λειτουργία και δράση του NFRKB σε συνθήκες υποξίας. Η πρωτεΐνη αυτή θα ελεγχθεί ως προς την σωστή έκφραση, τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και την ικανότητα της να σουμοϋλιώνεται σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου με μία σειρά πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης, ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης.

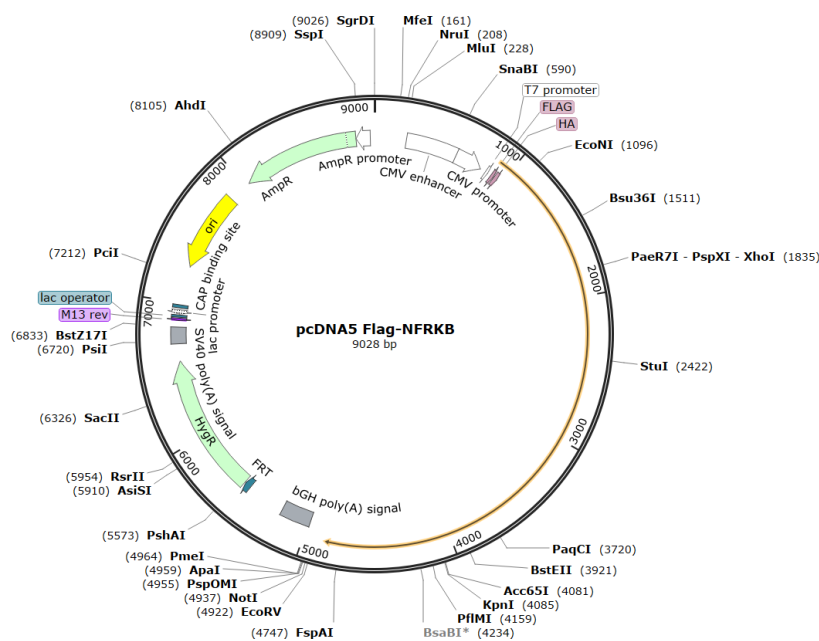
Απώτερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η παραγωγή προκαταρκτικών αποτελεσμάτων αλλά και εργαλείων που θα βοηθήσουν στην περαιτέρω έρευνα του εργαστηρίου πάνω στο ρόλο του NFRKB στο μονοπάτι απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στην υποξία

3. Υλικά

1. Πλασμιδιακοί φορείς

- *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT*

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA5 περιέχει τον ισχυρό υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) με σκοπό την έκφραση πρωτεϊνών σε διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Ο φορέας pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT φέρει το ολικό cDNA της ισομορφής 2 του παράγοντα NFRKB αλλά και τους επίτοπους FLAG και HA (Human influenza hemagglutinin) στο N-τελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης. Οι επίτοποι αυτοί κωδικοποιούν πεπτίδια με αλληλουχίες “DYKDDDDK” (FLAG-tag) και “YPYDVPDYA” (HA-tag) που δρουν ως “ετικέτα ανίχνευσης (tag)”. Μέσω αυτών των ετικετών μπορεί να επιτευχθεί η ανίχνευση και ο διαχωρισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης από την ενδογενή NFRKB. Ο φορέας επίσης φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Ήταν εμπορικά διαθέσιμος από την εταιρία Addgene και κατασκευάστηκε από τους Joan Copaway και Ronald Copaway (105) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση του φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT* της εταιρείας Addgene (#19789). Στην εικόνα απεικονίζονται: ο ενισχυτής και ο υποκινητής του κυτταρομεγαλοϊού CMV (λευκό βέλος), ο υποκινητής T7 (λευκό βέλος), οι επίτοποι FLAG και HA (μωβ βέλη), το cDNA του NFRKB (πορτοκαλί βέλος), και η αλληλουχία και ο υποκινητής του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (πράσινο βέλος). Στον φορέα, επίσης, απεικονίζονται και θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών.

- *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R*

Ο συγκεκριμένος φορέας προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με μήτρα τον φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT* (Εικόνα 19) χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές και φέρει μετάλλαξη στο αμινοξύ λυσίνη στη θέση 488 σε αργινίνη. (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022)

- *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K1083R*

Ο συγκεκριμένος φορέας προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με μήτρα τον φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT* (Εικόνα 19) χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές και φέρει μετάλλαξη στο αμινοξύ λυσίνη στη θέση 1083 σε αργινίνη. (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022)

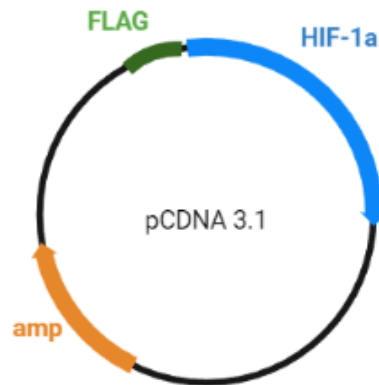
- *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R*

Ο συγκεκριμένος φορέας προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με μήτρα τον φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R* με χρήση εκκινητών ώστε να φέρει διπλή μετάλλαξη στο αμινοξύ λυσίνη στη θέση 488 σε αργινίνη και λυσίνη στη θέση 1083 σε αργινίνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πρόσθιος εκκινητής	5'-CTCTTCAGAAGCAAGACCAGCTGCCACGAT-3'
Αντίστροφος εκκινητής	5'- ATCGTGGCAGCTGGTCTTGCTTCTGAAGAG-3'

- *pcDNA3.1 FLAG-HIF-1α*

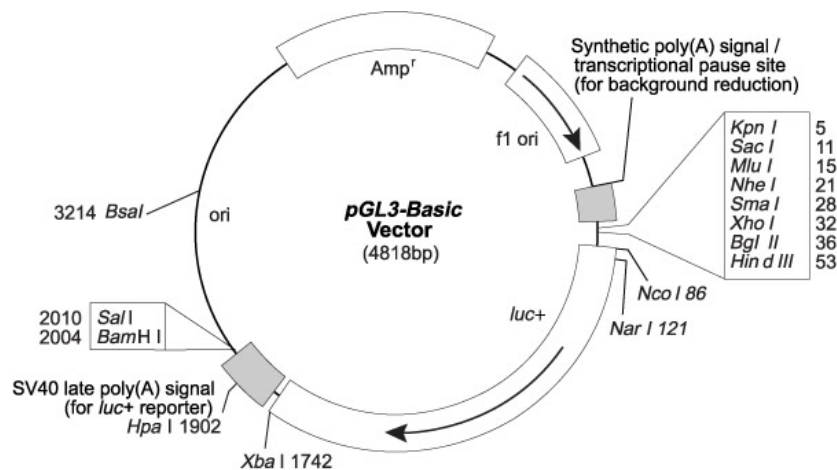
Ο πλασμιδιακός φορέας *pcDNA 3.1* περιέχει τον ισχυρό υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) με σκοπό την έκφραση πρωτεϊνών σε διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Ο συγκεκριμένος φορέας (Εικόνα 20) φέρει το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α καθώς και τον επίτοπο FLAG μέσω του οποίου μπορεί να επιτευχθεί η ανίχνευση και ο διαχωρισμός της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης από την ενδογενή HIF-1α. Ο φορέας επίσης φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (104).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα *pCDNA3.1 FLAG-HIF-1a*. Με πράσινο απεικονίζεται ο επίτοπος FLAG, με μπλε το γονίδιο του HIF-1a και με πορτοκαλί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη. Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*

- *pGL3-VEGF-5XHRE-Luc*

Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης και φέρει 5 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HREs) του υποκινητή του γονιδίου VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) πριν από την έναρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση της πυρολαμπίδας. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ο φορέας *p-GL3-Basic* ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την δημιουργία του *pGL3-VEGF-5XHRE-Luc*. Ο φορέας, ακόμη, φέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και ήταν μία ευγενική χορηγία του Dr. Giaccia (Department of Medicine, University of Stanford) στο εργαστήριό μας.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση του φορέα *p-GL3-Basic* που παρέχεται από την εταιρεία *Promega*. Με τη σειρά στον φορέα απεικονίζονται: η θέση έναρξης της αντιγραφής (*ori*), η θέση πολυσυνδέτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλωνοποίηση, το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυρολαμπίδας (*luc*), η αλληλουχία πολυαδενυλίωσης SV40 και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη.

- *pCI-Renilla*

Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης καθώς φέρει τον υποκινητή του ιού SV40. Μέσω αυτού, παράγεται το γονίδιο που εκφράζει την λουσιφεράση της Renilla. Χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ποσοστού διαμόλυνσης και την κανονικοποίηση των μετρήσεων των πειραμάτων μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης.

2. Βακτηριακά Στελέχη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν μικροβιακά στελέχη των βακτηρίων E. Coli TOP10 της εταιρείας Invitrogen με σκοπό τον μετασχηματισμό και την υπερέκφραση πλασμιδίων. Τα βακτήρια αυτά έχουν κατεργαστεί χημικά με σκοπό την αύξηση της δεκτικότητας τους και διαθέτουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.

3. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιέργειών

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν:

- Υγρό θρεπτικό LB ((Luria-Bertani broth) με σύσταση: 5gr Bacto-Tryptone, 2,5gr Bacto-Yeast Extract, 2,5gr NaCl και ddH₂O έως τα 500ml
- Στερεό θρεπτικό LB με σύσταση: 5gr Bacto-Tryptone, 2,5gr Bacto-Yeast Extract, 2,5gr NaCl, 20gr άγαρ και ddH₂O έως τα 500ml. Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού προστέθηκε το κατάλληλο αντιβιοτικό σε κατάλληλη συγκέντρωση και ακολούθησε επίστρωσή του σε τρυβλία petri

4. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HeLa, η οποία αποτελείται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποκτήθηκε από την εταιρεία ATCC.

5. Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

Για την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών σειρών HeLa χρησιμοποιήθηκαν:

- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM(Dulbecco's modified eagle medium): Το θρεπτικό αυτό ενδείκνυται για την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων καθώς έχει υψηλές συγκεντρώσεις

πυροσταφυλικού νατρίου, γλυκόζης (4.500mg/L) και L-γλουταμίνης. Προέρχεται από τις εταιρείες Gibco ή Biowest και για την παρασκευή του προστέθηκε 10% απενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοός (FBS), και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 1000U/l, της εταιρείας Biosera.

- Θρεπτικό μέσο DMEM -/-: Το θρεπτικό έχει την κύρια σύσταση του Dulbecco's modified eagle medium χωρίς την προσθήκη του βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS) και των αντιβιοτικών που αναφέρονται παραπάνω.
- Θρεπτικό μέσο DMEM + 5% FBS: Το θρεπτικό αυτό έχει την κύρια σύσταση του Dulbecco's modified eagle medium με την προσθήκη 5% ορού εμβρύου βοός (FBS). Το διάλυμα επίσης δεν περιέχει τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

6. Αντιβιοτικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά :

- Πενικιλίνη (1000U/ml) (Biosera)
- Στρεπτομυκίνη (1000U/ml) (Biosera)
- Αμπικικιλίνη (1000U/ml) (Biosera)

7. Αντισώματα

Τα πρώτα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα: (Πίνακας 1)

Πίνακας 1. Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Αναγράφονται με τη σειρά: το όνομα του αντισώματος, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθε, η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε, ο τύπος του αντισώματος και η προέλευσή του

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραιώση	Τύπος	Προέλευση
Anti-HA	Κουνέλι	1:500	πολυκλωνικό	Cell Signaling
Anti-HIF-1α	Ποντίκι	1:1000	μονοκλωνικό	BD Biosciences
Anti-tubulin	Ποντίκι	1:5000	μονοκλωνικό	Cell Signaling
Anti-SUMO2	Κουνέλι	1:2500	πολυκλωνικό	Chachami et al. (2019)
Anti-SUMO2	Ποντίκι	1:2000	πολυκλωνικό	Chachami et al. (2019)
Anti-FLAG	Ποντίκι	1:1000	μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich

Για την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν δεύτερα αντισώματα που αναγράφονται στον Πίνακα 2. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν αλυσίδες IgG ποντικού ή κουνελιού και είναι συζευγμένα με τα φθοροχρώματα Alexa 488 και Alexa 594.

Πίνακας 2. Δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αναγράφονται με τη σειρά: το όνομα του αντισώματος, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθε, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε, ο τύπος του αντισώματος και η προέλευσή του

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Προέλευση
anti-rabbit Alexa 488	Κουνέλι	1/1000	μονοκλωνικό	Invitrogen
anti-mouse Alexa 594	Ποντίκι	1/1000	μονοκλωνικό	Invitrogen

Πίνακας 3. Δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αναγράφονται με τη σειρά: το όνομα του αντισώματος, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθε, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε, ο τύπος του αντισώματος και η προέλευσή του

anti-mouse IgG (HRP)	Ποντίκι	1/5000	μονοκλωνικό	Cell Signaling
anti-rabbit IgG (HRP)	Κουνέλι	1/5000	μονοκλωνικό	Cell Signaling

Για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western χρησιμοποιήθηκαν δεύτερα αντισώματα που αναγράφονται στον Πίνακα 3. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν αλυσίδες IgG ποντικού ή κουνελιού και είναι συζευγμένα με το ένζυμο HRP ή αλλιώς υπεροξειδάση του αγριοραπάνου (HRP).

8. Διαλύματα

8.1 Στις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS): Ο ορός αυτός παρέχει στα κύτταρα μία ποικιλία σημαντικών αυξητικών παραγόντων που απαιτούνται για την αύξηση και πολλαπλασιασμό τους. Πριν την χρήση του υφίσταται απενεργοποίηση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά. Έπειτα διατηρείται στους -20 °C. Παρέχεται από την εταιρεία Biosera.
2. Διάλυμα θρυψίνης 0,2%: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται στην ανακαλλιέργεια κυττάρων καθώς στοχεύει στην αποκόλληση τους από το πιάτο και παρέχεται από την εταιρεία Biosera.
3. Διάλυμα PBS 10x: Το διάλυμα αυτό περιέχει 40gr NaCl, 1gr KCl, 8gr Na₂HPO₄, 1,2gr KH₂PO₄ και νερό έως τα 500ml και χρησιμοποιείται μετά από αποστείρωση.

8.2 Αντιδραστήρια και διαλύματα ανοσοκατακρήμνισης:

1. Σφαιρίδια αгарόζης: Χρησιμοποιήθηκαν Protein G σφαιρίδια τα οποία φέρουν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SUMO2/3. Η καθήλωση των αντισωμάτων στα σφαιρίδια έγινε σύμφωνα με γνωστό δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Becker et al, 2013)
2. Διάλυμα λύσης κυττάρων 2x: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων και περιείχε 10x PBS, 20%SDS, EDTA 0,5M, EGTA 0,5M, Protein Inhibitors, και NEM
3. Διάλυμα RIPA: Το διάλυμα αυτό αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα για την λύση κυττάρων και την
4. διαλυτοποίηση πρωτεϊνών και έχει την εξής σύσταση 20mM Na-phosphate buffer pH: 7.4, 150mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate
5. Διάλυμα SDS 20%
6. Διάλυμα EDTA 0,5mM pH=8: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την απενεργοποίηση πρωτεασών καθώς το EDTA αποτελεί χηλικό παράγοντα που δεσμεύει ιόντα μαγνησίου και ασβεστίου
7. Διάλυμα EGTA 0,5mM pH=8: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την απενεργοποίηση πρωτεασών καθώς το EGTA αποτελεί χηλικό παράγοντα που δεσμεύει ιόντα μαγνησίου και ασβεστίου
8. Μίγμα αναστολέων πρωτεασών-PI mix
9. Διάλυμα NEM (N-Ethylmaleimide) 1M: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή των ισοπεπτιδασών (SUMO-specific proteases). Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,128gr σε 1ml οργανικού διαλύτη DMSO (Sigma Aldrich)
10. Διάλυμα DTT 1M
11. Αντιδραστήριο Bradford: Το διάλυμα αυτό περιέχει την χρωστική Coomassie blue G250 διαλυμένη σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης
12. Διάλυμα SDS Laemmli: Το διάλυμα αυτό έχει την εξής σύσταση 50mM Tris με pH=6,8, 2% SDS, 10% γλυκερόλη και 0,1% μπλε της βρωμοφαινόλης και χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια

8.3 Στα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

1. Διάλυμα φορμαλδεΐδης 3,7% σε PBS 1X: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες

2. Διάλυμα Triton x-100 0,2% σε PBS 1X: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών
3. Διάλυμα BSA 3% σε PBS-Tween20 0,1%: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος
4. Διάλυμα BSA 1% σε PBS-Tween20 0,1%: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντισωμάτων και για πλύσεις των καλυπτρίδων
5. PBS-Tween20 0,1%: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για πλύσεις των καλυπτρίδων
6. Διάλυμα MOWIOL (που εμπεριέχει τη χρωστική DAPI): Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση της καλυπτρίδας στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η χρωστική DAPI πετυχαίνει την χρώση της χρωματίνης με σκοπό την απεικόνιση των πυρήνων

8.4 Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Separating Buffer): Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,375 Tris-HCl με pH=8,8, 2mM EDTA και 0,1% SDS και έχει pH=8,8
2. Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (Stacking Buffer): Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,125 Tris-HCl με pH=6,8, 2mM EDTA και 0,1% SDS και έχει pH=6,8
3. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer): Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,05M Tris, 0,38M γλυκίνη, 2mM EDTA, 0,1% SDS και έχει pH=8,3
4. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer): Το διάλυμα αυτό περιέχει 125mM Tris-Borate με pH=8,5, 0,2% SDS, 0,5mM DTT
5. Διάλυμα χρωστικής Ponceau S 2%: Το διάλυμα αυτό περιέχει 2% Ponceau, 30% τριχλωροοξικό οξύ και 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ
6. Διάλυμα γάλακτος: Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό (blocking) των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος στην μεμβράνη και παρασκευάζεται από 5% σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος διαλυμένη σε διάλυμα 1X PBS-Tween20 0,1%
7. Immobilon Crescendo Western HRP Substrate: Παρέχεται από την εταιρεία Millipore. Περιέχει το υπόστρωμα λουμινόλη, η οποία οξειδώνεται από το ένζυμο HRP του δεύτερου αντισώματος παρουσία H_2O_2 με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων, δίνοντας έτσι τη θέση των αντιγόνων ενδιαφέροντος πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από έκθεση σε κάμερα ή φωτογραφικό φιλμ.

9. Αντιδραστήρια

9.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma-Aldrich και AppliChem

9.2 Λοιπά Αντιδραστήρια

Για την απομόνωση πλασμιδίων από βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια του εμπορικού κιτ NucleoBond Xtra Midi/Maxi της εταιρείας Macherey-Nagel

Για την διαμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο PEI (Polyethylenimine) σε συγκέντρωση 1μg/1μl

Για τη μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ Dual Luciferase Reporter Assay System που παρέχεται από την εταιρεία Promega.

Το κιτ αυτό περιέχει:

- Το Passive Lysis Buffer 5X το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1X για τη λύση των κυττάρων
- Το ρυθμιστικό διάλυμα Luciferase Assay Buffer
- Το υπόστρωμα Luciferase Assay Substrate το οποίο βρίσκεται σε λυοφιλοποιημένη μορφή και χρησιμοποιείται για την παρασκευή του αντιδραστηρίου Luciferase Assay Reagent (LAR) με διαλυτοποίηση του σε συγκεκριμένο όγκο του Luciferase Assay Buffer.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα Stop & Glow Buffer
- Το υπόστρωμα Stop & Glow Substrate 50X, το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του αντιδραστηρίου Stop & Glow Reagent σε τελική αραιώση 1X με προσθήκη κατάλληλου όγκου του Stop & Glow Buffer

4. Μέθοδοι

1. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

1.1. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E. Coli με πλασμιδιακούς φορείς

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούνται βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία με διαλύματα που περιέχουν χλωριούχο ασβέστιο. Τα θετικά ιόντα ασβεστίου που παρέχονται από τα διαλύματα σχηματίζουν σύμπλοκα με το πλασμιδιακό DNA εξουδετερώνοντας την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ πλασμιδίου και πλασματικής μεμβράνης. Επιπλέον, η ξαφνική άνοδος της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ) δημιουργεί οπές στην πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων με αποτέλεσμα την εύκολη είσοδο του πλασμιδιακού DNA. Με την πρόσληψη των πλασμιδιακών φορέων από βακτήρια επιτυγχάνεται ο μαζικός πολλαπλασιασμός τους και αργότερα η απομόνωση τους για χρήση σε πειραματικές διαδικασίες.

Βακτηριακά κύτταρα E. Coli TOP10 (βλ. Υλικά 2) κατεργάζονται με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αυξημένη δεκτικότητα σε εξωγενές DNA. Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται σε βαθιά κατάψυξη -80. Την ημέρα του μετασχηματισμού τα κύτταρα επώζονται σε πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, 1μl από τους πλασμιδιακούς φορείς (βλ. Υλικά 1) προστίθεται σε 50μl βακτηρίων E. Coli. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για μισή ώρα στον πάγο. Έπειτα, πραγματοποιείται θερμικό σοκ των βακτηρίων στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα και άμεση μεταφορά τους στον πάγο για περίπου 2 λεπτά. Έπειτα, στα βακτήρια προστίθεται 1ml θρεπτικού LB (βλ. Υλικά 3. Υγρό θρεπτικό LB) και επώζονται περαιτέρω υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4000 rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200μl υγρού θρεπτικού LB. Τα επαναδιαλυμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό LB (βλ. Υλικά 3. Στερεό θρεπτικό LB) και αμπικιλίνη (βλ. Υλικά 6) και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37°C. Την επόμενη μέρα του πειράματος γίνεται έλεγχος των τρυβλίων με σκοπό τον εντοπισμό βακτηριακών αποικιών.

1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ NucleoBond Xtra Midi/Maxi της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με

τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία που ακολουθείται στηρίζεται στην μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Πιο συγκεκριμένα, τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται με την προσθήκη διαλύματος που περιέχει το απορρυπαντικό SDS καθώς και NaOH. Το SDS διαλυτοποιεί τα φωσfolιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης ενώ το NaOH καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου και Van der Waals του DNA και των πρωτεϊνών. Στην συνέχεια προκειμένου να εξουδετερωθεί το αλκαλικό pH, χρησιμοποιείται διάλυμα εξουδετέρωσης που περιέχει οξικό κάλιο και άλατα. Το διάλυμα αυτό στοχεύει στην κατακρήμνιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA αλλά και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων ως σύμπλοκα αλάτων-απορρυπαντικών. Αντίθετα, το πλασμιδιακό DNA παραμένει διαλυτό στην υπερελικωμένη μορφή του και συλλέγεται εν συνεχεία μετά από κατακρήμνιση με κατάλληλο διάλυμα αλκοόλης.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, η διαδικασία ξεκινά με την επιλογή μίας ξεχωριστής βακτηριακής αποικίας, που αναπτύχθηκε μετά τον μετασχηματισμό με πλασμιδιακούς φορείς (βλ. Μέθοδοι 1.1), για καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες με 3ml υγρό θρεπτικό μέσο LB (βλ. Υλικά 3. Υγρό θρεπτικό LB) παρουσία αμπικιλίνης στους 37 °C ολονύχτια υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας για 30 δευτερόλεπτα στις 14.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται στο διάλυμα του κιτ με σκοπό την αλκαλική λύση των πλασματικών μεμβρανών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών των βακτηρίων. Στη συνέχεια, με προσθήκη διαλύματος επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων. Το διάλυμα που δημιουργείται φορτώνεται σε στήλη για την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA. Ακολουθούν πλύσεις με διαλύματα ειδικά για την απομάκρυνση αλάτων και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων και το πλασμιδιακό DNA εκλύεται από τη στήλη με τη βοήθεια διαλύματος σε βασικές συνθήκες. Τέλος, για κατακρήμνιση του εκλούμενου DNA προστίθεται ισοπροπανόλη.

1.3 Αλληλούχιση δειγμάτων πλασμιδιακού DNA

Με σκοπό την διαπίστωση της ύπαρξης των επιθυμητών σημειακών μεταλλάξεων K488R και K1083R αλλά και την επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας του ενθέματος στους πλασμιδιακούς φορείς που απομονώθηκαν (βλ. Μέθοδοι 1.2), πραγματοποιείται αλληλούχιση με τη χρήση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του φορέα pCDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R (βλ. Υλικά 1).

2. Κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HeLa

2.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα HeLa βρίσκονται αποθηκευμένα σε σωλήνες κρυοσυντήρησης σε δεξαμενή υγρού αζώτου σε διάλυμα ψύξης (100% FBS και 10% DMSO). Τα κύτταρα ξεπαγώνουν σε υδατόλουτρο στους 37°C για περίπου 5 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε 15ml falcon αργά και σταδιακά προστίθεται υπό συνεχή ανάδευση πλήρες θρεπτικό (βλ. Υλικά 5 Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM) με σκοπό την ομαλή προσαρμογή των κυττάρων και την αποφυγή του ωσμωτικού σοκ. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ήπια φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 λεπτά για να απομακρυνθεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης DMSO. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, αφαιρείται προσεχτικά το υπερκείμενο και πραγματοποιείται η επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 8ml πλήρους θρεπτικού και έπειτα μεταφέρεται σε πιάτο καλλιέργειας 10cm. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο (βλ. Μέθοδοι 2.2). Για τις επόμενες 1-2 μέρες γίνεται έλεγχος της μορφολογίας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με μικροσκοπία.

2.2 Επώαση κυττάρων

Τα κύτταρα HeLa καλλιεργούνται σε πιάτα στους 37°C σε πλήρες θρεπτικό υλικό (βλ. Υλικά 5 Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM) σε επωαστικό θάλαμο με 5% CO₂. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων (βλ. Μέθοδοι 2.3) όταν αυτά φτάσουν στο μέγιστο 90-100 % της πληρότητας σε περίπου 48 ώρες.

Η επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιείται στον υποξικό κλειστό θάλαμο τριών αερίων Ruskinn INVIVO2, ο οποίος προσομοιάζει συνθήκες υποξίας με (1% O₂, 5%CO₂, 37 °C).

2.3 Κατεργασία με θρυψίνη και ανακαλλιέργεια

Όταν τα κύτταρα φθάσουν στο μέγιστο όριο πληρότητας στο πιάτο (90-100%) ξεκινά η διαδικασία ανακαλλιέργειας τους. Η διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου το οποίο βοηθά στην αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο του πιάτου καθώς επιτυγχάνει την λύση των πεπτιδικών δεσμών εξωκυτταρικών πρωτεϊνών με το υλικό του πιάτου καλλιέργειας.

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας ξεκινά με την απομάκρυνση του θρεπτικού από τα κύτταρα με αναρρόφηση και πλύση αυτών με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1X (βλ. Υλικά 8.1.3) με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου. Προστίθενται 1ml του διαλύματος θρυψίνης (βλ. Υλικά 8.1.2) και το πιάτο τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο για περίπου 5-10 λεπτά έως ότου να αποκολληθούν τα κύτταρα από το πιάτο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η απενεργοποίηση της θρυψίνης με προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού μέσου (βλ. Υλικά 5 Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM). Συνήθως προστίθενται ίσος ή μεγαλύτερος όγκος θρεπτικού σε σχέση με αυτού της θρυψίνης και το αιώρημα κυττάρων που δημιουργείται τοποθετείται στο επιθυμητό πιάτο ανακαλλιέργειας σε κατάλληλη αραιώση (συνήθως 1/10). Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται στη νέα καλλιέργεια για 2 μέρες (βλ. Μέθοδοι 2.2).

2.4 Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Για την διεξαγωγή πειραμάτων με καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητος ο υπολογισμός του αρχικού αριθμού κυττάρων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω πειράματα. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση της πλάκας καταμέτρησης κυττάρων Neubauer, η οποία είναι κατασκευασμένη με συγκεκριμένο πάχος και με διαβαθμίσεις τετραγώνων. Στην πλάκα τοποθετείται ποσότητα 10μl του αρχικού εναιωρήματος τα οποία σταθεροποιούνται με μία καλυπτρίδα. Με απλή μικροσκοπία φωτός γίνεται μέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα που σχηματίζονται. Ο αριθμός των κυττάρων/ml υπολογίζεται σύμφωνα με βάση το μαθηματικό τύπο:

$$\frac{\text{αριθμός κυττάρων στα 4 τετράγωνα}}{4} * 10^4 \text{ κύτταρα/ml}$$

Για τα πειράματα διαμόλυνσης ή δράσης λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν περίπου 3 εκατομμύρια κύτταρα για την έναρξη καλλιιεργειών σε 6cm ή 6well τύπου πιάτα.

2.5 Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του μη λιπιδικού πολυμερούς PEI

Η διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA αποσκοπεί στην είσοδο ενός πλασμιδίου για την παροδική ή τη σταθερή έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί σε μία συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο PEI (βλ. Υλικά 9.2). Το

αντιδραστήριο PEI αποτελεί ένα μη λιπιδικό κατιονικό πολυμερές το οποίο δημιουργώντας σύμπλοκα με το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA, και στη συνέχεια μέσω συνένωσης με την πλασματική μεμβράνη και ενδοκυττάρωσης, οδηγεί στην είσοδό τους στο κύτταρο. Στην παρούσα εργασία η αναλογία PEI:DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2:1.

Την ημέρα της διαμόλυνσης χρησιμοποιούνται πιάτα καλλιέργειας 10cm κυττάρων HeLa με ποσοστό πληρότητας περίπου 70-80%. Η διαδικασία της διαμόλυνσης ξεκινά με την παρασκευή μείγματος το οποίο περιέχει 15μg πλασμιδιακού DNA και 30μl PEI σε 1,5ml θρεπτικού μέσου DMEM -/- (βλ. Υλικά 5. Θρεπτικό μέσο DMEM -/-). Μετά την ανάδευση του μείγματος ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα PEI-DNA. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 4,5ml θρεπτικό μέσο DMEM + 5% FBS (βλ. Υλικά 5. Θρεπτικό μέσο DMEM + 5% FBS). Πραγματοποιείται απομάκρυνση του πλήρους θρεπτικού από το πιάτο καλλιέργειας, πλύση του με διάλυμα PBS 1X (βλ. Υλικά 8.1.3) και προσθήκη των 6ml του μείγματος διαμόλυνσης. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το μείγμα διαμόλυνσης για 4 ώρες σε επωαστικό θάλαμο (βλ. Μέθοδοι 2.2). Τέλος, απομακρύνεται η ποσότητα του μείγματος, προστίθεται 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και ακολουθεί περαιτέρω επώαση των κυττάρων για 24 ώρες.

Όλες οι διαδικασίες που περιεγράφηκαν παραπάνω και αφορούν στο χειρισμό κυττάρων θηλαστικών πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες, σε κατάλληλους θαλάμους κάθετης νηματικής ροής και με χρήση αποστειρωμένων υλικών (αποστειρωμένα διαλύματα, ρύγχη, πιπέτες, γυαλικά κλπ).

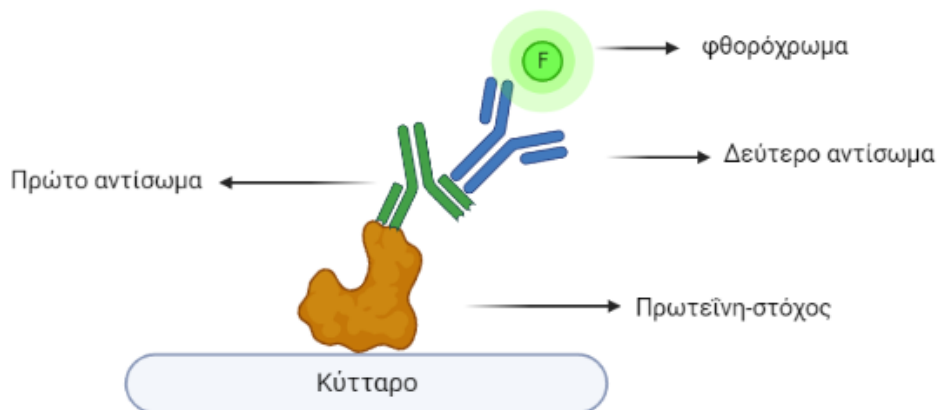
3. Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών

3.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού αποσκοπεί την οπτικοποίηση σε κανονικό χρόνο πρωτεϊνών σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο και στηρίζεται στην χρήση αντισωμάτων συζευγμένα με φθοροχρώματα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα-πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Εικόνα 22) περιλαμβάνει αρχικά την καλλιέργεια και μονιμοποίηση των υπό εξέταση κυττάρων σε καλυπτρίδες και ακολούθως την προσθήκη του πρώτου αντισώματος έναντι της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Μετά από ένα συγκεκριμένο χρόνο επώασης προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα έναντι των IgG του πρώτου αντισώματος το οποίο είναι

επίσης τεχνητά συζευγμένο με ένα φθοροχρώμα. Τα φθοροχρώματα είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ικανότητα φθορισμού μετά από διέγερση τους σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Ο φθορισμός παρατηρείται σε ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού.

Η διαδικασία ξεκινά με την καλλιέργεια κυττάρων HeLa πάνω σε ειδικές γυάλινες καλυπτρίδες που βρίσκονται μέσα σε πιάτα καλλιέργειας. Για την επιτυχία του πειράματος συστήνεται η πληρότητα των κυττάρων στην καλυπτρίδα την ημέρα διεξαγωγής του ανοσοφθορισμού να είναι περίπου στο 70-80%. Μετά την πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS 1X (βλ. Υλικά 8.1.3), πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλδεΐδης 3,7% (βλ. Υλικά 8.3.1) για 5 λεπτά με προσθήκη 1ml διαλύματος ανά καλυπτρίδα, καθώς η φορμαλδεΐδη στοχεύει στην απομάκρυνση των μορίων νερού και στο σχηματισμό δεσμών με τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα PBS 1x, προσθήκη 1ml διαλύματος Triton-X 100 0,2% (βλ. Υλικά 8.3.2) και επώαση των κυττάρων στον πάγο για περίπου 5 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο το απορρυπαντικό Triton δημιουργεί οπές στις μεμβράνες των κυττάρων για την αύξηση της διαπερατότητας τους από αντισώματα. Στη συνέχεια, γίνεται αφαίρεση του απορρυπαντικού με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα PBS 1x, και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 3% BSA σε PBS-Tween20 0,1% (βλ. Υλικά 8.3.3) με σκοπό τον αποκλεισμό μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος με το BSA. Αφού γίνει ελαφρό στέγνωμα των καλυπτρίδων από την περίσσεια του διαλύματος κορεσμού 3% BSA, κάθε καλυπτρίδα επωάζεται με 40μl πρώτου αντισώματος anti-HA (βλ. Υλικά Πίνακα 1), σε συγκεκριμένη αραιώση, διαλυμένο σε διάλυμα 1% BSA σε PBS-Tween20 0,1% (βλ. Υλικά 8.3.4). Οι καλυπτρίδες αφήνονται για επώαση ολονύχτια στους 4°C. Την επόμενη μέρα ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1% BSA σε PBS-Tween20 0,1% ώστε να απομακρυνθεί το πρώτο αντίσωμα και οι καλυπτρίδες επωάζονται με 0,2μl δεύτερου αντισώματος ειδικού για τα IgG του πρώτου αντισώματος (βλ. Υλικά Πίνακα 2), σε κατάλληλη αραιώση, σε διάλυμα 1% BSA σε PBS-Tween20 0,1%. Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι συζευγμένα με τα φθοροχρώματα Alexa 488 και 594. Έπειτα, ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με διάλυμα 1% BSA σε PBS-Tween20 0,1%, μία πλύση με PBS 1X και μία τελευταία με αποστειρωμένο νερό. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με 7μl διαλύματος MOWIOL στο οποίο έχει προστεθεί η χρωστική DAPI. Τέλος, οι καλυπτρίδες σταθεροποιούνται με την χρήση βερνικιού ενώ η παρατήρησή τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss και με το πρόγραμμα Zen. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Fiji.



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Δημιουργήθηκε με το biorender.com

3.2 Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών, γενικά, αποτελεί παραλλαγή της χρωματογραφίας συγγένειας η οποία περιλαμβάνει τη διέλευση ενός δείγματος, για παράδειγμα κυτταρικών λυμάτων, δια μέσου ενός πορώδους υποστρώματος (πχ ρητίνη, αγαρόζη) πάνω στο οποίο έχει ακινητοποιηθεί το αντίσωμα έναντι μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Με την διέλευση του δείγματος, η πρωτεΐνη-αντιγόνο που μας ενδιαφέρει συνδέεται με το ειδικό για αυτήν αντίσωμα που είναι ακινητοποιημένο στο πορώδες υπόστρωμα. Τέλος, το σύμπλοκο αντιγόνο-αντίσωμα παραλαμβάνεται με έκλυση. Στη συγκεκριμένη εργασία, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (130) (131). Ως πορώδες υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με την πρωτεΐνη G στα οποία συνδέονται κατάλληλα αντισώματα έναντι των SUMO-2/3 πρωτεϊνών. Στόχος της διαδικασίας ήταν η κατακρήμιση της σουμοϋλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης NFRKB η οποία όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή (βλ. 1.4), τροποποιείται ομοιοπολικά από τις πρωτεΐνες SUMO2/3.

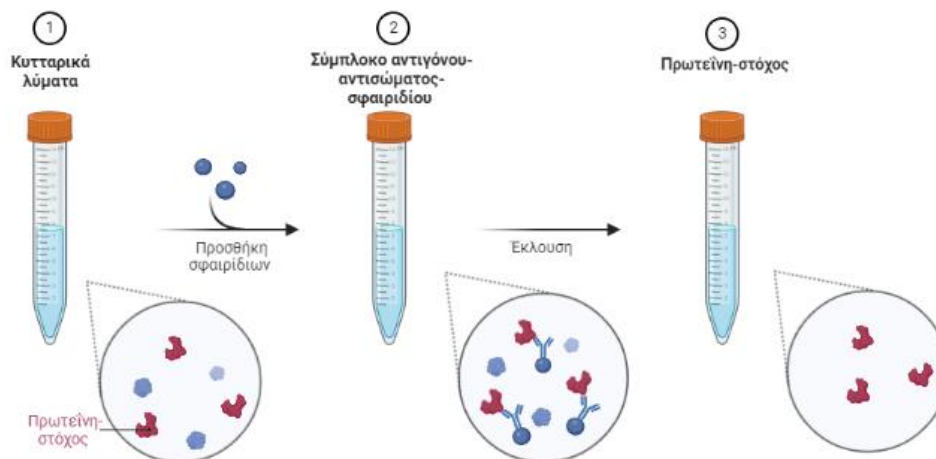
Η διαδικασία, η οποία απεικονίζεται περιληπτικά στην Εικόνα 23, ξεκινά με την προετοιμασία των κυτταρικών λυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Αρχικά, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από τα πιάτα καλλιέργειας και πλύση των κυττάρων HeLa με διάλυμα PBS 1X (βλ. Υλικά 8.1.3), το οποίο απομακρύνεται. Στη συνέχεια, γίνεται η συλλογή των κυτταρικών λυμάτων με την προσθήκη 150μl διαλύματος λύσης 2x (2x lysis buffer) που περιέχει 20mM διαλύματος NEM (βλ. Υλικά 8.2.9) για απενεργοποίηση των SUMO-ισοπεπτιδασών σε κάθε πιάτο (10cm). Μετά την συλλογή, τα λύματα υπόκεινται σε κατεργασία με τη χρήση υπερήχων με σκοπό την περαιτέρω λύση των πρωτεϊνών και τον κατακερματισμό του DNA και πραγματοποιείται

προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος PBS 1X με σκοπό την αραιώσή του SDS σε 1% σε τελικό όγκο 300μl. Έπειτα, ακολουθεί προσθήκη 15μl DTT (βλ. Υλικά 8.2.10) σε τελική συγκέντρωση 50mM και τα λύματα επωάζονται στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 95°C. Ακολουθεί αραιώση του διαλύματος με διάλυμα RIPA (βλ. Υλικά 8.2.3) χωρίς την παρουσία SDS έως τα 3ml. Έτσι, η τελική συγκέντρωση του SDS στο διάλυμα είναι 0,1%. Συνέχεια του πειράματος αποτελεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford (βλ. Μέθοδοι 3.3)

Ακολούθως, έχοντας υπόψη την συγκέντρωση των πρωτεϊνών των κυτταρικών λυμάτων, κρατείται όγκος που χρησιμοποιείται ως δείγμα input για περαιτέρω ανάλυση ανοσοαποτύπωσης. Τα δείγματα input χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες της έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος στο κυτταρικό διάλυμα. Στα inputs προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DTT 1M (βλ. Υλικά 8.2.10) σε τελική συγκέντρωση 25mM και SDS Laemmli Loading Buffer τελικής συγκέντρωσης 1X SDS (βλ. Υλικά 8.2.12) και ακολουθεί βρασμός για 10-15 λεπτά.

Στη συνέχεια, γίνεται προετοιμασία και εξισορρόπηση των σφαιριδίων στο διάλυμα RIPA με 0,1% SDS στο οποίο βρίσκονται και τα κυτταρικά λύματα. Πιο συγκεκριμένα, 10μl σφαιριδίων Protein G-SUMO2/3 (βλ. Υλικά 8.2.1) για κάθε αντίδραση προστίθεται σε 1ml διάλυμα RIPA με 0,1% SDS. Ακολουθεί επώαση 5 λεπτών στους 4°C και φυγοκέντρηση στα 700g για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης αφαιρείται το υγρό από τα σφαιρίδια χωρίς να στεγνώσουν. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται άλλες 2 φορές. Στα εξισορροπημένα σφαιρίδια προστίθενται περίπου 2ml από τα κυτταρικά λύματα και ακολουθεί επώαση στους 4°C ολονύχτια υπό ανάδευση.

Την επόμενη μέρα, τα σφαιρίδια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στα 700g για 5 λεπτά στους 4°C και ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των σφαιριδίων υπόκειται σε 3 διαδοχικές πλύσεις με RIPA με 0,1% SDS (προσθήκη 1ml RIPA με 0,1% SDS, 5 λεπτά επώαση στους 4 °C, φυγοκέντρηση στα 700g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκειμένου). Μετά την τελευταία πλύση ακολουθεί η έκλυση όλων των σουμοϋλιωμένων με SUMO2/3 πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με προσθήκη 20μl SDS Laemmli Loading Buffer, το οποίο περιέχει 2X SDS. Μετά από μία επώαση 15 λεπτών στους 37 °C και μία φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 13000g, στα εκλούσματα (eluates) προστίθεται 2,2μl DTT 0,1M με το οποίο σπάνε πλήρως οι δισουλφιδικοί δεσμοί και επιτυγχάνεται η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τέλος, τα εκλούσματα επωάζονται στους 90 °C για 10 λεπτά και συντηρούνται στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.



Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της ανοσοκατακρήμνισης. Δημιουργήθηκε με το biorender.com

3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων διαλυμάτων βασιζόμενη στην αλλαγή στην απορρόφηση που παρατηρείται μετά την πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Blue G-250 στις πρωτεΐνες σε όξινες συνθήκες. Η χρωστική αυτή φαίνεται να προσδένεται ισχυρότερα σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης των πεπτιδικών αλυσίδων. Με την σύνδεση αυτή παρατηρείται μία αλλαγή στο χρώμα της χρωστικής από κόκκινο-καφέ σε μπλε. Η αλλαγή αυτή δικαιολογείται καθώς η κόκκινη-καφέ μορφή της χρωστικής δίνει τα ελεύθερα της ηλεκτρόνια στις ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να αλλάζει η μορφή της πρωτεΐνης και να εκτίθενται οι υδρόφοβες περιοχές της. Αυτές οι περιοχές σχηματίζουν δεσμούς με τις μη-πολικές περιοχές της χρωστικής σταθεροποιώντας έτσι την μορφή με μπλε χρώμα. Η αλλαγή του χρώματος της χρωστικής προκαλεί και αλλαγή στην απορρόφηση καθώς κάτω από όξινες συνθήκες η χρωστική παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης τα 495nm (κόκκινο-καφέ), ενώ κατά την παρουσία πρωτεϊνών το μέγιστο απορρόφησης μετατρέπεται στα 595nm (μπλε).

Για την διεξαγωγή της μεθόδου Bradford, 5μl των κυτταρικών λυμάτων προστίθενται σε 95μl νερού ddH₂O και 1ml του αντιδραστηρίου Bradford (βλ. Υλικά 8.2.11). Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε σκοτάδι με σκοπό την ανάπτυξη του χρώματος και φωτομέτρηση στα 595nm. Ως τυφλό χρησιμοποιούνται διαλύματα με 95μl ddH₂O, 1ml Bradford και 5μl διαλύματος RIPA με 0,1% SDS. Μετά την φωτομέτρηση, οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της αλβουμίνης (BSA).

3.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών, ως φορτισμένα μόρια, να διαχωρίζονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου δια μέσου των πόρων μίας πηκτής. Οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος ενός ηλεκτρικού πεδίου και η σχετική ταχύτητα κίνησής τους εξαρτάται από το φορτίο, το σχήμα και το μέγεθος τους. Το κατάλληλο πήκτωμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Ο σχηματισμός του βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και N,N μεθυλενοδισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων, του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλαιθυλενοδιαμιίνη (TEMED) σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αλυσίδες πολυμερών ακρυλαμιδίου διασυνδέονται με την προσθήκη του bis-ακρυλαμιδίου προς σχηματισμό της πηκτής της οποίας το μέγεθος και το ποσοστό των πόρων καθορίζεται από το μήκος και το βαθμό διασύνδεσης των αλυσίδων. Οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα κατά τη διέλευσή τους δια μέσου της πηκτής. Για την διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται δύο πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβάξης που είναι υπεύθυνο για την συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μία λεπτή στοιβάδα για να ξεκινήσουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού, και το πήκτωμα διαχωρισμού που στοχεύει στον περαιτέρω διαχωρισμό τους. Τα 2 αυτά πηκτώματα διαφέρουν ως προς το pH και την σύστασή τους. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση έγινε σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία του απορρυπαντικού SDS (Sodium dodecyl sulfate). Το SDS στοχεύει στην μετουσίωση πρωτεϊνών, καθώς είναι αρνητικά φορτισμένο, ενώνεται με όλες τις περιοχές των πρωτεϊνών, καταργεί όλες τις ενδομοριακές τους αλληλεπιδράσεις και προσδίδει σε όλες αρνητικό φορτίο. Σύμφωνα με αυτό το φορτίο οι πρωτεΐνες κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο στην συσκευή ηλεκτροφόρησης αλλά διαχωρίζονται μεταξύ τους κυρίως λόγω του μοριακού τους βάρους.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινά με την προετοιμασία των δειγμάτων που θα φορτωθούν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη του διαλύματος SDS Laemmli Loading Buffer, το οποίο περιέχει 4X SDS, και προσθήκη διαλύματος DTT με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά την προσθήκη αυτών των δύο διαλυμάτων, τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 10-15 λεπτά για την πλήρη αποδιάταξη.

Ακολουθεί η παρασκευή των πήκτωμάτων επιστοιβάξης και διαχωρισμού. Το πήκτωμα διαχωρισμού καλύπτει σχεδόν τα $\frac{3}{4}$ της συσκευής ηλεκτροφόρησης και παρασκευάζεται πρώτο καθώς τοποθετείται πρώτο στη συσκευή. Στη παρούσα εργασία παρασκευάστηκε πήκτωμα διαχωρισμού με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 7%. Η σύστασή του αναγράφεται στον Πίνακα 2 και για την σωστή πήξη του απαιτεί 20-30 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ετοιμάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης σύμφωνα με τα υλικά που αναγράφονται στον Πίνακα 2 και πριν την πήξη του τοποθετείται ειδική «χτένα» με σκοπό να σχηματιστούν τα «πηγάδια», δηλαδή οι θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Μετά από επώαση του πήκτωματος για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, το ολικό πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης από την εταιρεία Hoeffer. Ακολουθεί η αφαίρεση της ειδικής «χτένας» και η εισαγωγή των δειγμάτων με τη χρήση πιπέτας Hamilton. Τέλος, το πήκτωμα καλύπτεται πλήρως με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (βλ. Υλικά 8.4.3) και ξεκινά η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με σταθερή ένταση ρεύματος 20mA για περίπου 70 λεπτά. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα διαχωρισμού αφαιρείται προσεχτικά και ακολουθεί η περαιτέρω επεξεργασία του μέσω ηλεκτρομεταφοράς και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Πίνακας 4. Σύσταση των πήκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοιβάξης

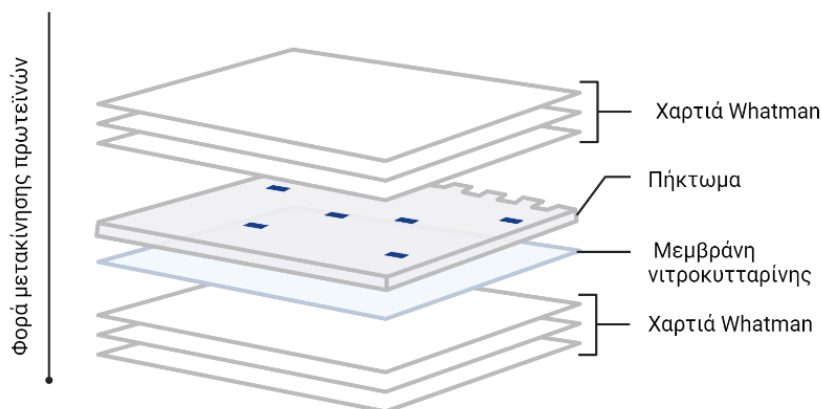
Πήκτωμα Διαχωρισμού (Vτελ=10ml) 7%	Πήκτωμα Επιστοιβάξης (Vτελ=4ml) 4,5%
5,75ml H ₂ O	2,5ml H ₂ O
2,5ml Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (βλ. Υλικά 8.4.1)	1ml Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (βλ. Υλικά 8.4.2)
1,75ml ακρυλαμίδιο (συγκέντρωση 7%)	0,45ml ακρυλαμίδιο (συγκέντρωση 4,5%)
40μl APS 0,04% v/v	25μl APS 0,04% v/v
20μl TEMED 0,01% v/v	12,5μl TEMED 0,01% v/v

3.5 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών και Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Υπό την εφαρμογή κατάλληλου ηλεκτρικού πεδίου επιτυγχάνεται η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την πηκτή πάνω στη μεμβράνη. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται σε ημίξηρη φάση (Semi-dry Transfer) σε ειδική συσκευή μετά από τη σωστή τοποθέτηση των υλικών, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 24. Πιο συγκεκριμένα, τρία χαρτιά Whatman εμβαπτίζονται στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer

Buffer) (βλ. Υλικά 8.4.4) και στρώνονται στην συσκευή προσεχτικά για την αποφυγή φυσαλίδων οι οποίες θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα της διαδικασίας. Στη συνέχεια, τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και από πάνω τοποθετείται το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα, πριν την μεταφορά τους στην συσκευή εμβαπίζονται στο ίδιο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για περίπου 10 λεπτά. Πάνω από το πήκτωμα τοποθετούνται τρία χαρτιά Whatman το ίδιο εμποτισμένα στο ίδιο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και η ηλεκτρομεταφορά ξεκινά σε σταθερή ένταση 80mA για 75 λεπτά.

Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη αφαιρείται προσεχτικά από την συσκευή και επωάζεται για λίγα λεπτά σε διάλυμα χρωστικής Ponceau S 2% με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν από την πηκτή στη μεμβράνη. Έπειτα, ακολουθεί έκλυση της μεμβράνης με απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθεί πλήρως η περίσσεια της χρωστικής, και η επώασή της με διάλυμα γάλακτος με σκοπό τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης του αντισώματος, για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μίας ώρας, η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είναι διαλυμένο στο ίδιο διάλυμα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως. Η επώαση γίνεται ολονύχτια στους 4°C. Την επόμενη μέρα, μετά από 3 πλύσεις με διάλυμα PBS Tween20 0,1% για 10 λεπτά, η μεμβράνη επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι επίσης διαλυμένο σε διάλυμα γάλακτος όπως το πρώτο για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα έχει τόσο την ικανότητα δέσμευσης στις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος, όσο και τη σύζευξη με το ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase), το οποίο μετά από προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος (πχ. λουμινόλης) δίνει αντίδραση με τελική έκλυση φωτονίων. Με το πέρας της επώασης του δεύτερου αντισώματος, ακολουθούν πάλι τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS Tween20 0,1% για 5 λεπτά με σκοπό να ξεπλυθεί τελείως η περίσσεια αντισώματος και η μεμβράνη εμφανίζεται με την προσθήκη του διαλύματος Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (βλ. Υλικά 8.4.7). Το σήμα ανιχνεύεται με τη βοήθεια του Imager Uvitec Cambridge.



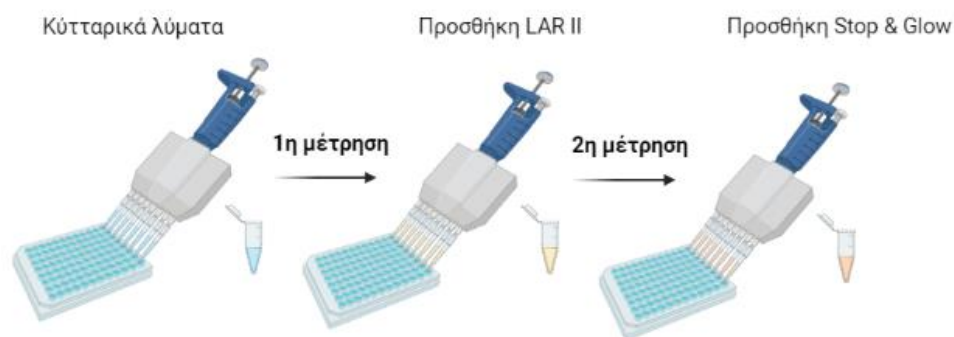
Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την ημίξηρη ηλεκτρομεταφορά. Δημιουργήθηκε με το biorender.com

4. Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης

Η διαδικασία μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος εξέτασης της μεταγραφικής ενεργότητας μίας πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGL3-VEGF-5XHRE-Luc (βλ. Υλικά 1), το οποίο φέρει 5 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HREs) του γονιδίου VEGF πριν από την έναρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας. Το γονίδιο VEGF υπόκειται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα HIF, οπότε μόλις συνδέεται ο παράγοντας στα HREs, ξεκινά η έκφραση του ενζύμου της λουσιφεράσης. Το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας εκφράζεται και καταλύει την αντίδραση χημειοφωταύγειας με υπόστρωμα την λουσιφερίνη (περιέχεται στο υπόστρωμα LAR, βλ. Υλικά 9.2) την οποία οξειδώνει παρουσία ATP και Mg^{+2} στην οξυλουσιφερίνη συνοδευόμενη με έκλυση φωτός, το οποίο ανιχνεύεται μέσω ενός λουμινομέτρου. Στο πείραμα επίσης, συνεκφράζεται το πλασμίδιο pCI3-Renilla, το οποίο κωδικοποιεί συνεχώς το ένζυμο της λουσιφεράσης της Renilla. Το υπόστρωμα του ενζύμου αυτού διαφέρει από του προηγούμενου και περιέχεται στο υπόστρωμα Stop & Glow του εμπορικού κιτ (βλ. Υλικά 9.2) και ανιχνεύεται σε μία δεύτερη μέτρηση. Η έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Η διαδικασία, που απεικονίζεται εν συντομία στην Εικόνα 25, ξεκινά με καλλιέργεια κυττάρων HeLa πιάτα τύπου 24-well. Μόλις τα κύτταρα φθάνουν σε πληρότητα περίπου στο 60-70% στο πιάτο καλλιέργειας, πραγματοποιείται η διαδικασία διαμόλυνσης κυττάρων με τη χρήση του μη λιπιδικού

πολυμερούς PEI (βλ. Μέθοδοι 2.5) με 1μg του πλασμιδίου pGL3-VEGF-5XHRE-Luc, 0,25μg του πλασμιδίου pCI3-Renilla, και στην παρούσα διατριβή με 2μg από τα πλασμίδια FLAG-HIF1a και pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT (βλ. Υλικά 1), και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 ώρες. Για την περαιτέρω προετοιμασία των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή του πειράματος, 24 ώρες μετά την διαμόλυνση, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με προσθήκη 100μl του αντιδραστηρίου Passive Lysis Buffer (PLB) (βλ. Υλικά 9.2) και επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά λύματα συλλέγονται και φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στα 1300g. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, 20μl του υπερκειμένου μεταφέρεται σε πιάτο 96-well και προστίθεται 20μl του αντιδραστηρίου Luciferase Assay Reagent (LAR). Αφού σημειωθεί η ένδειξη του λουμινομέτρου, προστίθενται 10μl του αντιδραστηρίου Stop & Glow Reagent για να μετρηθεί η λουσιφεράση Renilla. Ακόμη, το Stop & Glow Reagent έχει την ικανότητα να σταματά την αντίδραση χημιοφωταύγειας της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας με αλλαγή του pH της αντίδρασης. Σημειώνεται πάλι η ένδειξη του λουμινομέτρου και τα δύο αποτελέσματα αναλύονται περαιτέρω με προγράμματα στατιστικής ανάλυσης.



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης. Δημιουργήθηκε με το biorender.com

5. Βιοπληροφορική ανάλυση βάσεων δεδομένων γονιδιακής έκφρασης καρκινικών ιστών

Με σκοπό την μελέτη της έκφρασης του NFRKB σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους, χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) (132), μέσω της οποίας πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων GTEx (Genotype-Tissue Expression) και TCGA (The Cancer Genome Atlas). Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν περιλαμβάνουν την διερεύνηση του προφίλ

έκφρασης του NFRKB (από δεδομένα μεταγραφώματος καρκινικών ιστών) σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς, αναλύσεις συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων των NFRKB και HIF-1α σε επιλεγμένους τύπους καρκίνου, αλλά και μελέτες της κλινικής εικόνας (επιβίωσης) καρκινοπαθών και συσχέτισή τους με τα επίπεδα έκφρασης του NFRKB.

5. Αποτελέσματα

Ο παράγοντας NFRKB είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής με διάφορες λειτουργίες. Ο ρόλος του όμως σε συνθήκες υποξίας παραμένει άγνωστος. Δημοσιευτες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν πως πιθανώς ο NFRKB εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία μέσω του HIF-1α. Ακόμη, προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας της κ. Χαχάμη, απέδειξαν πως ο NFRKB ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών των οποίων το πρότυπο σουμοϋλίωσης αλλάζει στην υποξία (104). Ο πιθανός ρόλος του NFRKB ως μεταγραφικός ρυθμιστής των γονιδίων που επάγονται σε υποξία στον καρκίνο αλλά και η επίδραση της υποξίας στη σουμοϋλίωση και πιθανή τροποποίηση της λειτουργίας του, αποτελούν αντικείμενα μελέτης του εργαστηρίου μας και αποτέλεσαν και αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας.

1. Μελέτη του ρόλου του NFRKB ως μεταγραφικού ρυθμιστή σε συνθήκες υποξίας στον καρκίνο

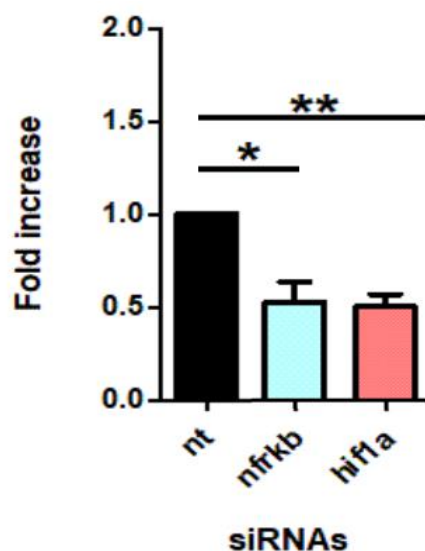
1.1. Διερεύνηση του ρόλου του NFRKB ως μεταγραφικού ρυθμιστή γονιδίων στόχων της υποξίας

Για την διερεύνηση του ρόλου του παράγοντα NFRKB στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων στην υποξία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης (βλ. Μέθοδοι 4). Χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της λουσιφεράσης το οποίο υπόκειται στον έλεγχο των HIF μεταγραφικών παραγόντων και επιτρέπει την μελέτη της μεταγραφικής τους ενεργότητας μέσω μίας αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Μελετήθηκε λοιπόν αρχικά η επίδραση τόσο της αποσιώπησης του NFRKB όσο και της υπερέκφρασης του στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF παραγόντων.

Σχετικά με την πρώτη προσέγγιση, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pGL3-VEGF-5XHRE-Luc και pCI-Renilla (βλ. Μέθοδοι 2.4, Μέθοδοι 4 και Υλικά 1) σε συνδυασμό με siRNA έναντι

του NFRKB και του HIF-1α (μη δημοσιευμένα πειράματα από την Υποψήφια Διδάκτορα κ. Χ. Φιλιππούλου). Ως αρνητικό control, χρησιμοποιήθηκε siRNA το οποίο δεν στοχεύει σε συγκεκριμένη αλληλουχία γονιδίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται ενδεικτικά στην Εικόνα 26. Παρατηρούμε πως μετά την αποσιώπηση του NFRKB παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε σχέση με τη συνθήκη control (σύγκριση ράβδος 1 με ράβδο 2). Μάλιστα η αποσιώπηση του NFRKB φαίνεται να οδηγεί σε εξίσου μειωμένα επίπεδα της ενεργότητας με αυτά που προκύπτουν από την αποσιώπηση του HIF-1α (σύγκριση ράβδος 2 με ράβδο 3).

Χρησιμοποιώντας σαν έναυσμα αυτό το αποτέλεσμα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν (βλ. Μέθοδοι 2.4) με τα πλασμίδια pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT και pcDNA3.1-FLAG-HIF-1α (μαζί με τα πλασμίδια pGL3-VEGF-5XHRE-Luc και pCI-Renilla) ώστε να επιτευχθεί η υπερέκφραση των πρωτεϊνών FLAG-HA-NFRKB WT και HIF-1α αντίστοιχα (βλ. Μέθοδοι 4). Ως συνθήκη control για το πείραμα αποτέλεσε η συνθήκη διαμόλυνσης με τον άδειο φορέα pcDNA3.1-FLAG. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες, μετά το πέρας της οποίας μετρήθηκε από τα εκχυλίσματα των κυττάρων η έκφραση της λουσιφεράσης ως δείκτης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α.

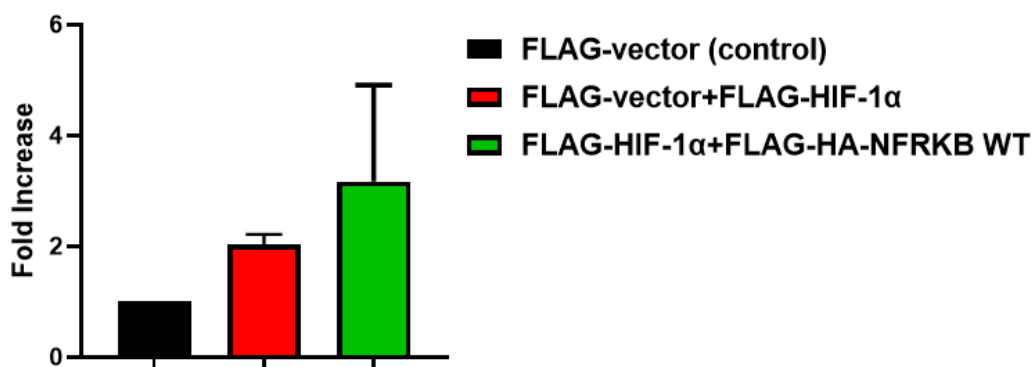


Εικόνα 26. Μέτρηση της εξαρτώμενης του HIF-1α δραστηριότητας λουσιφεράσης. Μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης υπό αποσιώπηση του NFRKB και του HIF-1α

Τα αποτελέσματα από δύο πειράματα (αποτελούμενα από τρεις επαναλήψεις ανά συνθήκη) απεικονίζονται στην Εικόνα 27. Αρχικά, παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF μετά την υπερέκφραση του σε σχέση με την συνθήκη control (σύγκριση

δεύτερης με πρώτης ράβδου). Η επαγωγή αυτή φαίνεται μικρή (σχεδόν διπλάσια) σε σχέση με την συνθήκη control, γεγονός που οφείλεται πιθανά σε μικρό ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων με το πλασμίδιο pcDNA3.1-FLAG-HIF-1α και άρα μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης HIF-1α. Όταν υπερεκφράζεται ο HIF-1α και ο NFRKB παρατηρείται επίσης περαιτέρω αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF σε σχέση με την συνθήκη υπερέκφρασης μόνο του HIF-1α (σύγκριση δεύτερης και τρίτης ράβδου), υποδηλώνοντας πως η ενεργότητα του HIF ρυθμίζεται από τον NFRKB. Παρόλα αυτά η διαφορά στην ενεργότητα δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του NFRKB φαίνεται πως επηρεάζει θετικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Παρόλα αυτά η επανάληψη του παραπάνω πειράματος κρίνεται απαραίτητη για την καλύτερη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη διεξαγωγή ξεκάθαρων αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση του NFRKB στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.



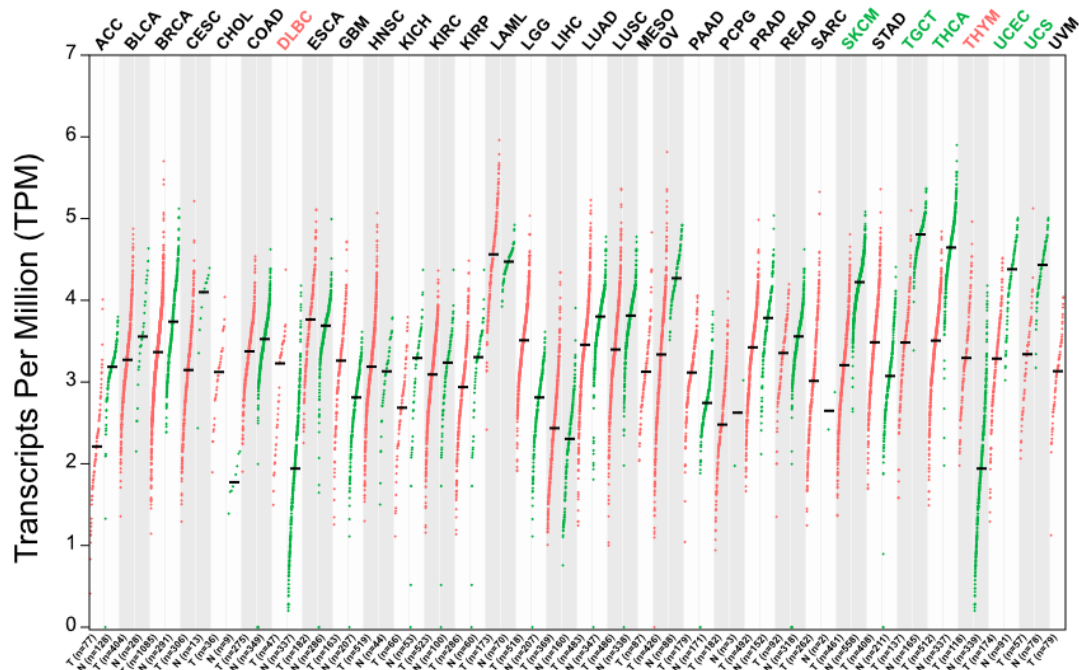
Εικόνα 27. Μέτρηση της εξαρτώμενης του HIF-1α δραστηριότητας λουσιφεράσης. Μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης υπό υπερέκφραση του NFRKB και του HIF-1α

1.2 Διερεύνηση της έκφρασης του NFRKB σε διάφορους τύπους καρκίνου και της συσχέτισης του με παράγοντες της υποξίας

Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με τη σχέση του NFRKB και του HIF-1α και λαμβάνοντας υπόψη ότι ο HIF εμφανίζεται αυξημένος σε διάφορους τύπους καρκίνου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της έκφρασης του NFRKB σε διάφορους τύπους καρκίνου, η συσχέτιση της έκφρασης των δύο παραγόντων NFRKB και HIF σε διάφορους

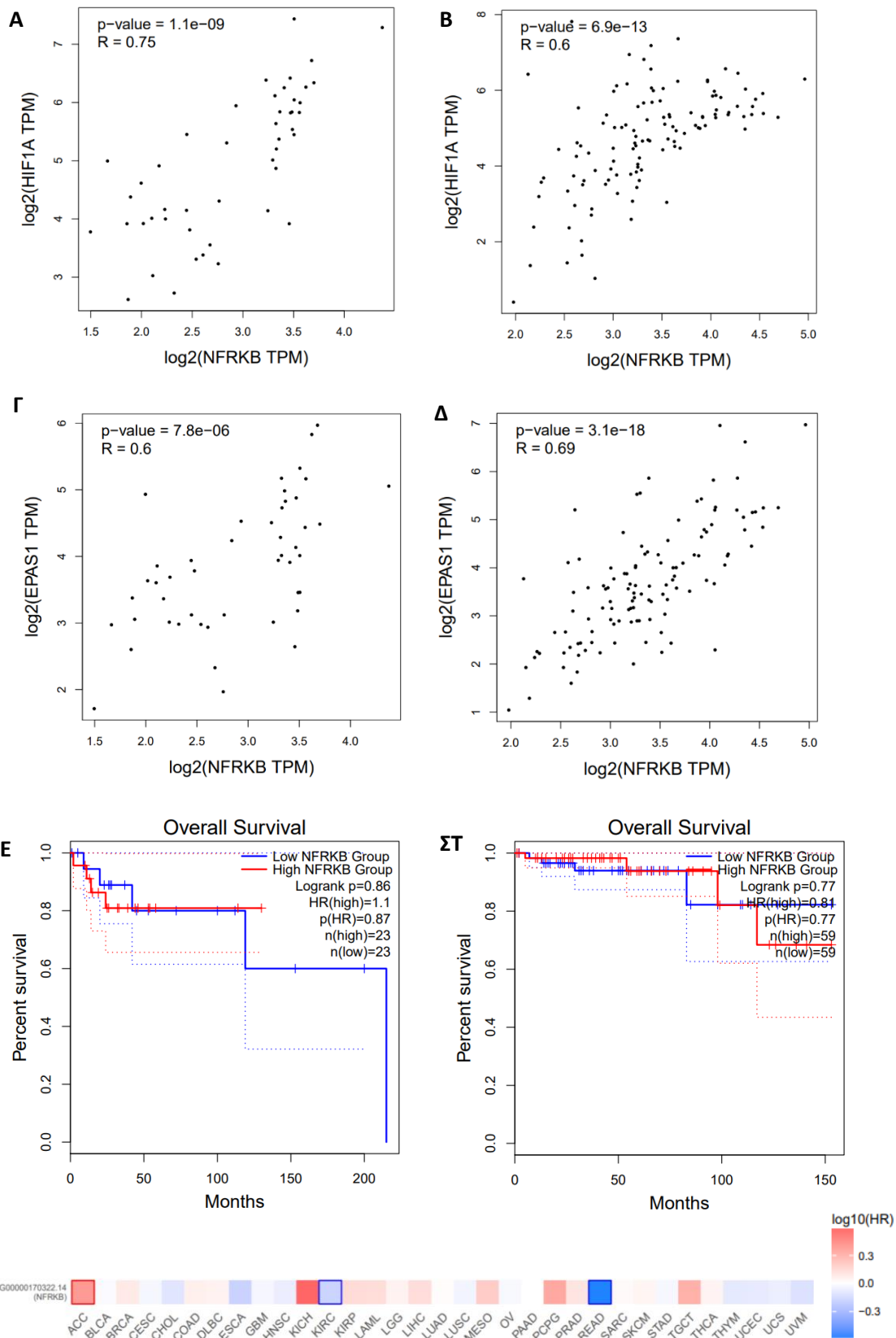
καρκινικούς τύπους, αλλά και ο ρόλος του NFRKB στην έκβαση της ασθένειας και στην επιβίωση των ασθενών καθώς είναι γνωστό πως ο HIF-1α χαρακτηρίζεται κακός προγνωστικός παράγοντας.

Με σκοπό την διερεύνηση, σε δεδομένα καρκινοπαθών, της έκφρασης και του ρόλου του παράγοντα NFRKB αλλά και της συσχέτισης αυτού με την υποξία και συγκεκριμένα με τον παράγοντα HIF-1α, χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) (βλ. Μέθοδοι 5) (132). Μετά από ανάλυση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης 33 τύπων καρκίνου που παρέχονται από τις βάσεις GTEx και TCGA, βρέθηκε πως η έκφραση του γονιδίου του NFRKB αυξάνεται σε 2 καρκινικούς τύπους σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 28). Οι καρκίνοι αυτοί ήταν το Διαχυτό Λέμφωμα από Μεγάλα Β-κύτταρα (DLBC, Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma) και το Θύμωμα (THYM, Thymoma) και απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28. Έκφραση του γονιδίου NFRKB έναντι όλων των δημόσια διαθέσιμων καρκινικών τύπων. Γράφημα που δείχνει την έκφραση του γονιδίου του NFRKB σε 33 διαφορετικούς καρκινικούς τύπους (κόκκινες τελείες) και στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (πράσινες τελείες) μετά από ανάλυση με τη χρήση της πλατφόρμας GEPIA2 χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων TCGA. Κάθε τελεία αντιπροσωπεύει την έκφραση του NFRKB σε ένα δείγμα ασθενούς.

Σε αυτούς του δύο καρκινικούς τύπους πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις που επικεντρώθηκαν στην συσχέτιση του NFRKB και της υποξίας αλλά και στην μελέτη της επιβίωσης των ασθενών (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Ανάλυση συσχέτισης και μελέτη της κλινικής εικόνας ασθενών που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του **NFRKB**. Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων του **NFRKB** και του **HIF1a** σε ασθενείς με Λέμφωμα Διαχυτό από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBC) (Α) και Θύμωμα (THYM) (Β). Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων του **NFRKB** και του **EPAS1** σε ασθενείς με Λέμφωμα Διαχυτό από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBC) (Γ) και Θύμωμα (THYM) (Δ). Καμπύλες Kaplan–Meier για την επιβίωση ασθενών με Λέμφωμα Διαχυτό από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBC) (Ε) και θύμωμα (THYM) (ΖΤ). (Ζ) Heatmap που απεικονίζει το αντίκτυπο της έκφρασης του **NFRKB** στην πρόγνωση των εικονιζόμενων 33 τύπων καρκίνου. Τα κόκκινα και τα μπλε κουτάκια υποδηλώνουν κακή και καλή πρόγνωση αντίστοιχα.

Η έκφραση του NFRKB φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του HIF-1α, όπως και του EPAS1 (HIF-2α) και στους δύο καρκινικούς τύπους (DLBC, THYM), όπως φαίνεται στα γραφήματα στις Εικόνες 29Α, 29Β, 29Γ και 29Δ. Η συσχέτιση υποδηλώνεται με την ύπαρξη θετικών τιμών R (συντελεστής συσχέτισης) και στα τέσσερα γραφήματα. Ακόμη, σε μελέτες της κλινικής εικόνας των ασθενών, η αυξημένη έκφραση του NFRKB φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά μόνο τους ασθενείς του λεμφώματος (DLBC) (Εικόνα 29Ε) σε σχέση με τους ασθενείς του θυμώματος (THYM) (Εικόνα 29ΣΤ). Οι ασθενείς που πάσχουν από τον καρκίνο DLBC, παρουσιάζουν μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση του NFRKB και φαίνεται να ζουν περίπου για 130 μήνες (Εικόνα 29Ε), σε αντίθεση με αυτούς που εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του NFRKB, στους οποίους το ποσοστό επιβίωσης εμφανίζεται υψηλότερο (επιβίωση για περισσότερο από 200 μήνες).

Τέλος, η αυξημένη έκφραση του NFRKB φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο και κακή πρόγνωση για ένα σύνολο καρκινικών τύπων (Εικόνα 29Ζ). Στο θερμικό χάρτη της Εικόνας 29Ζ, παρατηρούμε πως στους ασθενείς με λέμφωμα (DLBC), η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του NFRKB αποτελεί σχετικά κακό προγνωστικό δείκτη γεγονός που συνάδει και με τα αποτελέσματα της μελέτης επιβίωσης των ασθενών που αναλύθηκε παραπάνω (Εικόνα 29Ε). Αντίθετα αποτελέσματα αντλούμε για τους ασθενείς με θύμωμα (THYM), για τους οποίους η αυξημένη έκφραση του NFRKB δεν φαίνεται να σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Εικόνα 29Ζ). Παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NFRKB παρουσιάζονται να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη πρόγνωση ασθενών που πάσχουν από Adrenocortical carcinoma (ACC) και Kidney chromophobe (KICH) (Εικόνα 29Ζ).

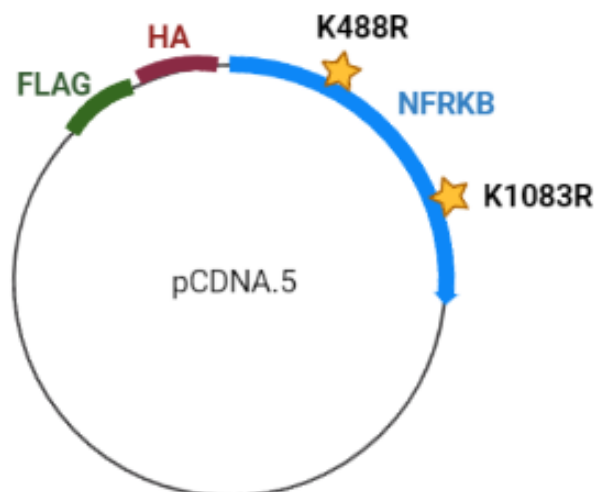
Συμπερασματικά, βρέθηκε πως το γονίδιο του NFRKB εκφράζεται σε υψηλότερα ποσά σε δυο τύπους καρκίνου, των DLBC και THYM. Και στους δύο αυτούς τύπους, ο NFRKB σχετίζεται τόσο με τον HIF-1α, όσο και με τον HIF-2α. Όσον αφορά τον καρκίνο DLBC, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NFRKB επηρεάζουν την κλινική εικόνα των καρκινοπαθών και αποτελούν κακό προγνωστικό δείκτη.

2. Μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης του παράγοντα NFRKB σε συνθήκες υποξίας

Εκτός από την επίδραση του NFRKB στην απόκριση των υποξικών κυττάρων (βλ. Αποτελέσματα 4.1) ενδιαφέρον παρουσιάζει και το πως η υποξία μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την λειτουργία του NFRKB. Από την πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη της Dr. Χαχάμη Γεωργίας (Chachami et al., 2019), αποδείχθηκε ότι ο NFRKB σουμοϋλιώνεται από τις πρωτεΐνες SUMO2/3. Ενδιαφέρον παρουσίασε πως σε συνθήκες υποξίας, η σουμοϋλίωση του παράγοντα αυτού μειώνεται δραστικά. Προκειμένου να μελετηθεί διεξοδικά η σουμοϋλίωση του NFRKB ξεκίνησε μια προσπάθεια εύρεσης της θέσης σουμοϋλίωσης και δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του που έχουν χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης.

2.1 Μεταλλάγματα του NFRKB που δεν έχουν την ικανότητα σουμοϋλίωσης

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022) αλλά και βιοπληροφορικά και βιβλιογραφικά δεδομένα, έδειξαν πως υπάρχουν 2 υποψήφιες προς σουμοϋλίωση λυσίνες στις θέσεις 488 και 1083. Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, οι λυσίνες είναι οι κύριοι στόχοι μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ομοιοπολική σύνδεση των SUMO-πρωτεϊνών. Έτσι, οι παραπάνω λυσίνες αντικαταστάθηκαν με ένα εξίσου θετικά φορτισμένο αμινοξύ, την αργινίνη, η οποία όμως δεν μπορεί να σουμοϋλιωθεί. Παρόλα αυτά, μετάλλαξη της μίας ή της άλλης θέσης δεν οδήγησαν σε πλήρη απώλεια της σουμοϋλίωσης (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022). Έτσι, στην παρούσα εργασία ξεκίνησε η δημιουργία του διπλού μεταλλάγματος pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R (Εικόνα 30) στηριζόμενοι στη λογική ότι και οι 2 λυσίνες πιθανά να συνεισφέρουν εξίσου στη σουμοϋλίωση. Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολήθηκε με τον έλεγχο της πλασμιδιακής κατασκευής, τον έλεγχο της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του NFRKB, όπως και με την μελέτη της ικανότητας σουμοϋλίωσής της συγκεκριμένης μορφής με την διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

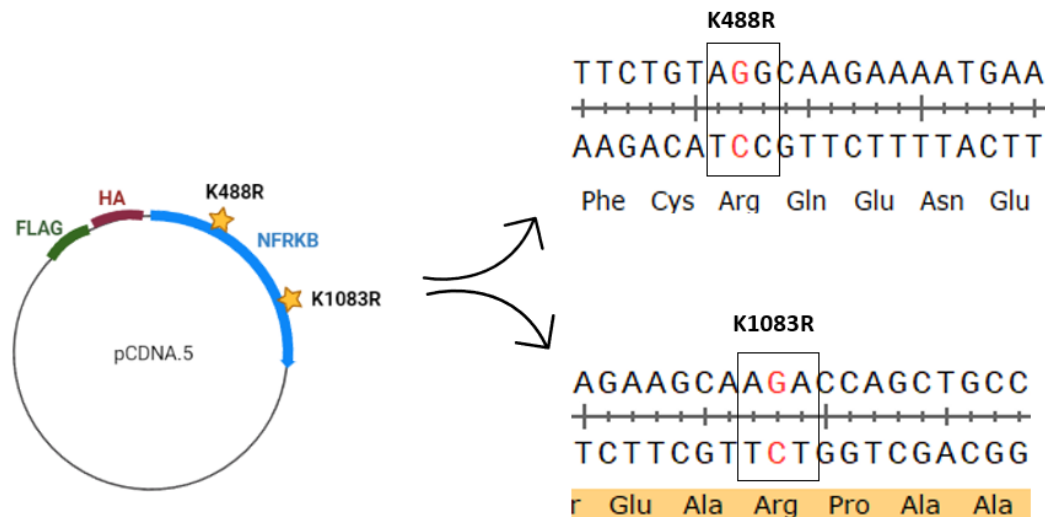


Εικόνα 30. Απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R*. Με πράσινο και μωβ απεικονίζονται οι επίτοποι *FLAG* και *HA*, με μπλε απεικονίζεται το γονίδιο του *NFRKB* με τις μεταλλάξεις *K488R* και *K1083R*. Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*

2.1.1 Έλεγχος της πλασμιδιακής κατασκευής *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R*

Η πλασμιδιακή κατασκευή *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R* δημιουργήθηκε με την τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον πλασμιδιακό φορέα *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R*, ο οποίος φέρει την μετάλλαξη *K->R* στη θέση 488 της πρωτεϊνικής αλυσίδας του *NFRKB* (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022). Στον φορέα αυτόν, με την χρήση κατάλληλων εκκινήτων (βλ. Υλικά 1), δημιουργήθηκε η μετάλλαξη *K1083R* και δημιουργήθηκε ο φορέας *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R* (Εικόνα 30). Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης αλλά και για να επιβεβαιωθεί πως δεν υπήρχαν άλλες μεταλλάξεις από τυχόν λάθη της πολυμεράσης στην PCR, 3 δείγματα από 3 διαφορετικές αποικίες του μεταλλάγματος αυτού στάλθηκαν για αλληλούχιση (βλ. Μέθοδοι 1.1.3).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 31, η αλληλούχιση επιβεβαίωσε πως ο πλασμιδιακός φορέας *pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R* φέρει και τις δύο αλλαγές *A -> G* (μετατροπή λυσίνης σε αργινίνη) στις θέσεις 488 και 1083, και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων.



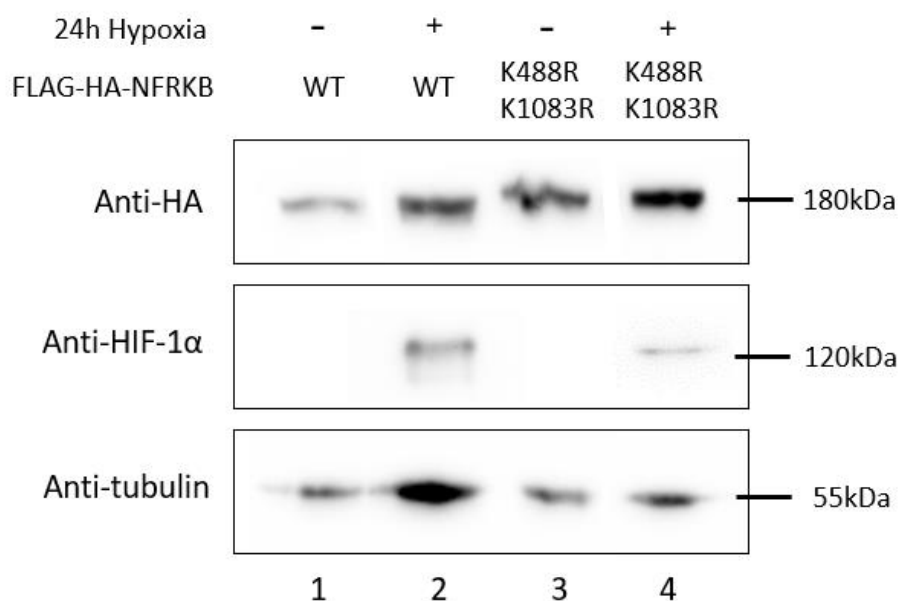
Εικόνα 31. **Επιβεβαίωση των μεταλλάξεων με τη βοήθεια αλληλούχισης.** Ο έλεγχος του πλασμιδιακού φορέα pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R (αριστερά) έγινε μέσω αλληλούχισης. Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του φορέα pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R (δεξιά), που επιβεβαιώνουν την μετατροπή του νουκλεοτιδίου A->G, όπου και στις δύο περιπτώσεις οδηγεί στην μετάλλαξη K->R

2.2 Χαρακτηρισμός της έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης του NFRKB σε νορμοξία και υποξία

2.2.1 Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης του NFRKB με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης της τροποποιημένης πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση του πλασμιδίου pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R σε κύτταρα HeLa (βλ. Μέθοδοι 2.4). Ακολούθως, τα κύτταρα επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία για 24 ώρες. Παράλληλα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT, το οποίο εκφράζει την αγρίου τύπου μορφή της πρωτεΐνης NFRKB με στόχο την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της με την αντίστοιχη τροποποιημένη. Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα λύθηκαν και τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (βλ. Μέθοδοι 3.3) και έπειτα σε ηλεκτρομεταφορά και ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 3.4). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επίτοπου HA για τον εντοπισμό των υπερεκφρασμένων μορφών του NFRKB, έναντι του HIF-1α ως μάρτυρα υποξίας και της τουμπουλίνης ως μάρτυρα ισοφόρτωσης όλων των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, η πρωτεΐνη FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R εκφράζεται τόσο σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 32, διαδρομή 3), όσο και σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 32, διαδρομή 4). Η έκφραση αυτή παρουσιάζεται σε περίπου ίση ποσότητα με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου FLAG-HA-NFRKB WT (Εικόνα 32, διαδρομές 1,2) και στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (180kDa).



Εικόνα 32. Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης NFRKB με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Απεικονίζεται η έκφραση της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB WT (διαδρομές 1,2) και της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R (διαδρομές 3,4) σε συνθήκες νορμοξίας (διαδρομές 1,3) και υποξίας (διαδρομές 2,4). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επιτόπου HA, έναντι του HIF-1α ως μάρτυρα της υποξίας και της τουμπουλίνης για τον έλεγχο του ισοφορτώματος (αριστερά). Δεξιά συμβολίζονται τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σε kDa.

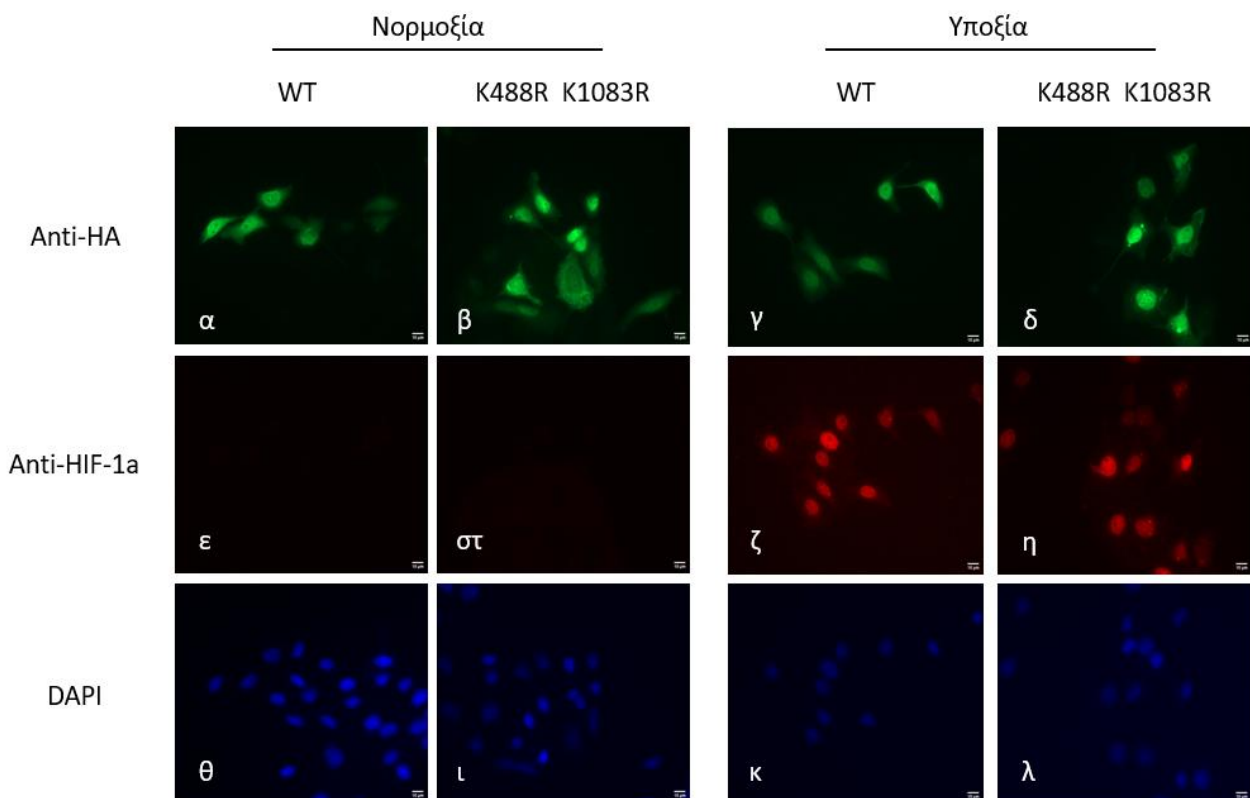
Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η διπλή μετάλλαξη δεν επηρεάζει την ικανότητα έκφρασης του NFRKB. Επιπλέον η υποξία δεν επηρεάζει την ικανότητα έκφρασης του μεταλλάγματος αφού η έκφραση του παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου σε κύτταρα HeLa τόσο σε νορμοξικές όσο και σε υποξικές συνθήκες.

2.2.2 Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης του NFRKB με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Για τον περαιτέρω έλεγχο της έκφρασης της τροποποιημένης πρωτεΐνης του NFRKB αλλά και την εύρεση του ενδοκυττάριου εντοπισμού της, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλ. Μέθοδοι 3.1). Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν (βλ. Μέθοδοι

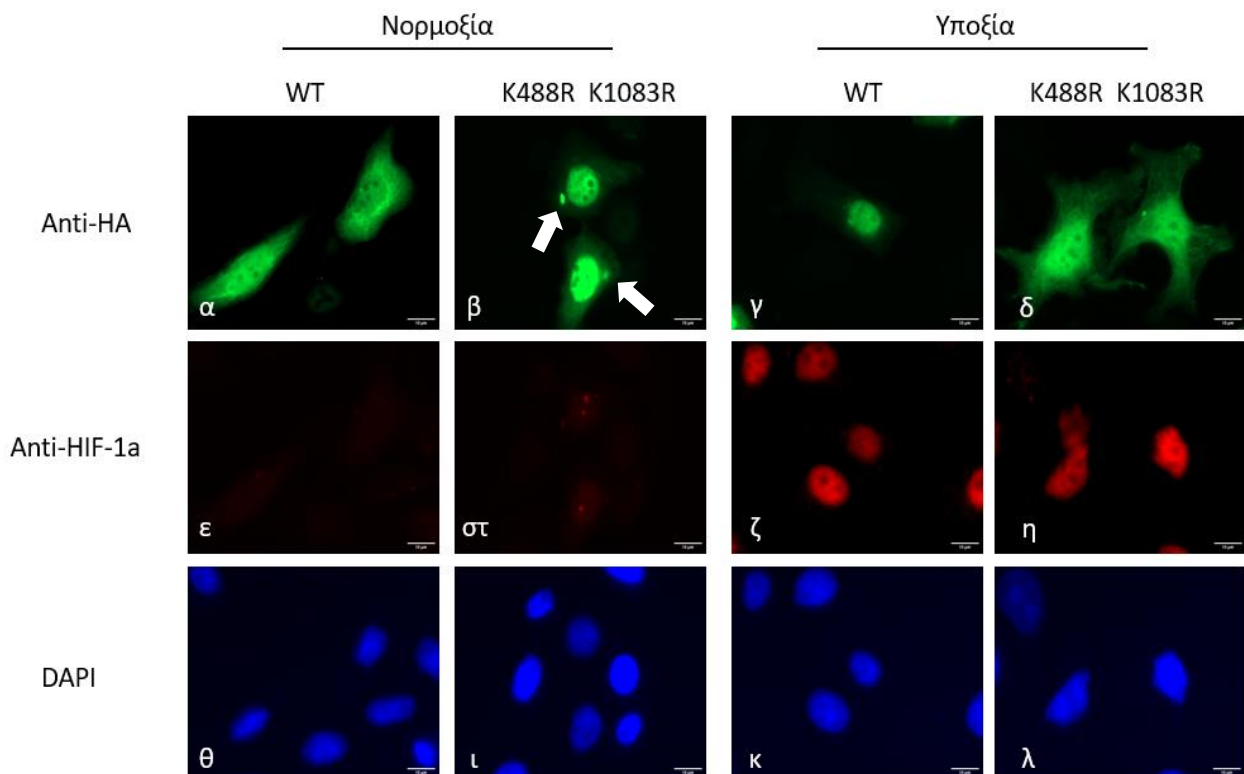
2.4) με τα πλασμίδια pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R και pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT και επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία για 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκε επώαση αυτών με τα αντισώματα έναντι του επίτοπου HA με σκοπό τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκφράζουν και τα δύο πλασμίδια (Εικόνες 33 και 34 α-δ), και του HIF-1α για επιβεβαίωση της υποξίας (Εικόνες 33 και 34 ε-η). Οι πυρήνες εντοπίζονται με την χρώση DAPI (Εικόνες 33 και 34 θ-λ).

Στις Εικόνες 33 και 34, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά την διεξαγωγή του έμμεσου ανοσοφθορισμού με βάση τα οποία μπορούν να γίνουν οι παρακάτω παρατηρήσεις. Αρχικά, η πρωτεΐνη FLAG-HA-NFRKB WT σε συνθήκες νορμοξίας φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (Εικόνα 33α, Εικόνα 34α) γεγονός που μαρτυρά ο συνεντοπισμός της με την χρωστική DAPI (Εικόνα 33θ, Εικόνα 34θ).



Εικόνα 33. Έλεγχος έκφρασης και ενδοκυττάριου εντοπισμού των πρωτεϊνών FLAG-HA-NFRKB WT και FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Με πράσινο σημαίνονται οι πρωτεΐνες NFRKB WT και NFRKB K488R K1083R (α-δ), με κόκκινο σημαίνεται η πρωτεΐνη HIF-1α (ε-η), ενώ με μπλε σημαίνεται η χρωστική DAPI που χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων (θ-λ). Μεγέθυνση 40x

Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την βιβλιογραφία αλλά και με τα προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου και είναι μια τυπική εικόνα εντοπισμού μεταγραφικών παραγόντων. Σε συνθήκες υποξίας, η έκφραση της FLAG-HA-NFRKB WT δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια διαφορά (Εικόνα 33γ, Εικόνα 34γ) σε σχέση με την νορμοξία (Εικόνα 33α, Εικόνα 34α). Ομοίως με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου, η πρωτεΐνη FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R εκφράζεται σε αντίστοιχα ποσά με την αγρίου τύπου και εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα χωρίς να παρουσιάζει διαφορά μεταξύ νορμοξίας (Εικόνα 33β, Εικόνα 34β), και υποξίας (Εικόνα 33δ, Εικόνα 34δ). Σε κάποιες εικόνες παρατηρείται ένα έντονο σήμα του NFRKB σε περιοχές του κυτταροπλάσματος όπως και η ύπαρξη συσσωματωμάτων (Εικόνα 34β με άσπρα βέλη), το οποίο πιθανώς οφείλεται σε υπερέκφραση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, μία τελευταία παρατήρηση αφορά την έκφραση του NFRKB (Εικόνα 34α) η οποία παρόλο που φαίνεται διάχυτη σε όλη την επιφάνεια του πυρήνα, παρατηρείται λίγο πιο έντονη γύρω από αυτόν κυτταροπλασματικά. Πιθανά πρόκειται για δομή του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς ο NFRKB έχει βρεθεί σε αντίστοιχες δομές κατά την έκφραση και επεξεργασία του.



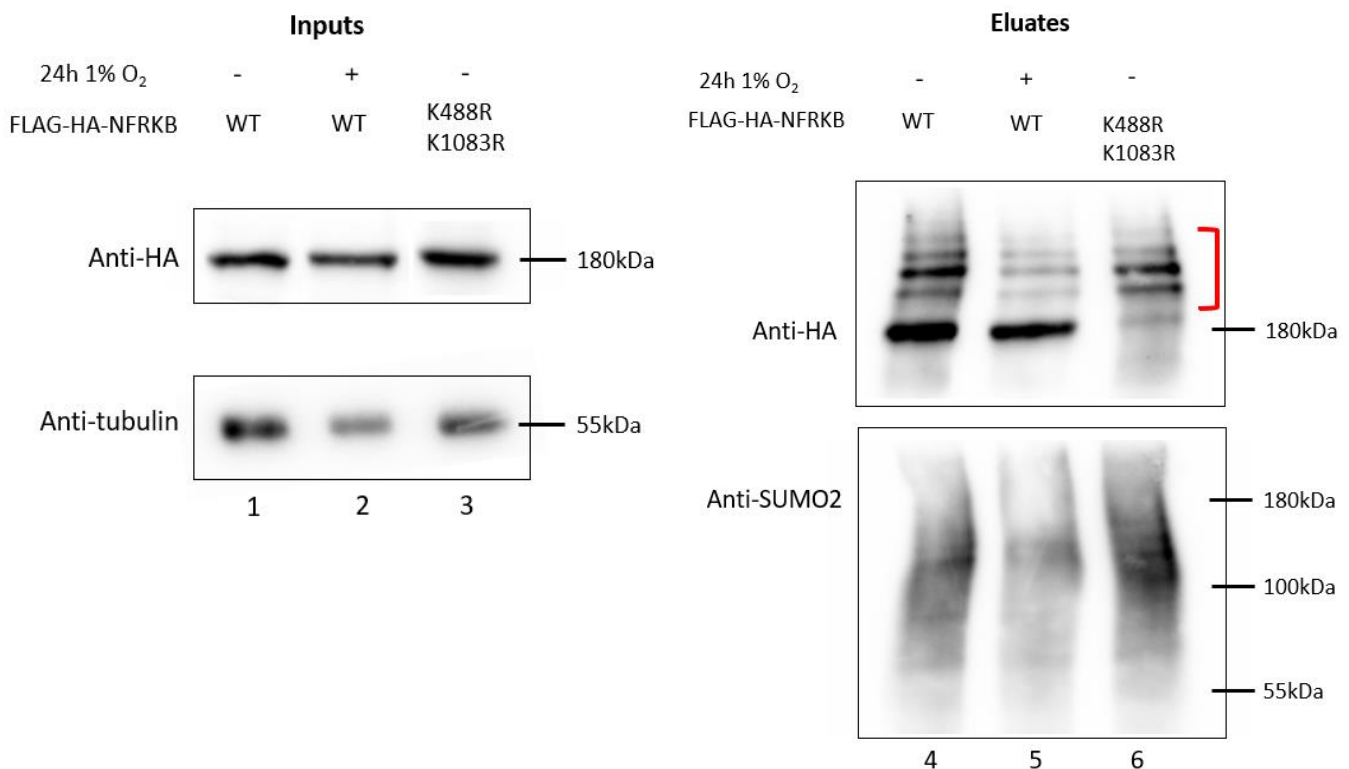
Εικόνα 34. Έλεγχος έκφρασης και ενδοκυττάριου εντοπισμού των πρωτεϊνών FLAG-HA-NFRKB WT και FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Με πράσινο σημαίνονται οι πρωτεΐνες NFRKB WT και NFRKB K488R K1083R (α-δ), με κόκκινο σημαίνεται η πρωτεΐνη HIF-1a (ε-η), ενώ με μπλε σημαίνεται η χρωστική DAPI που χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων (θ-λ). Μεγέθυνση 100x

Συμπερασματικά, παρατηρούμε πως η διπλά μεταλλαγμένη μορφή του NFRKB εκφράζεται σε ικανοποιητικά ποσά και εντοπίζεται στον πυρήνα ακολουθώντας το πρότυπο της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, τόσο στην νορμοξία, όσο και στην υποξία. Συνεπώς φαίνεται πως η «πιθανή» μείωση της σουμοϋλίωσης λόγω των δυο αυτών μεταλλάξεων δεν επηρεάζει την έκφραση και τον εντοπισμό του NFRKB.

2.2.3 Έλεγχος της ικανότητας σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα σουμοϋλίωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (βλ. Μέθοδοι 3.2). Αρχικά, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν (βλ. Μέθοδοι 2.4) με τα πλασμίδια pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R και pcDNA5-FLAG-HA-NFRKB WT και ακολούθως επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και υποβλήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με αντισώματα έναντι των SUMO 2/3 με σκοπό την κατακρήμνιση και απομόνωση όλων των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών. Τα δείγματα εκχυλισμάτων (inputs) και εκλουσμάτων (eluates) που προέκυψαν αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 3.4) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επίτοπου HA, της τουμπουλίνης και της πρωτεΐνης SUMO-2/3.

Στην Εικόνα 35, παρατηρούμε αρχικά την έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών FLAG-HA-NFRKB WT (Διαδρομές 1,2) και FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R (Διαδρομή 3) στα εκχυλίσματα πριν την έναρξη της ανοσοκατακρήμνισης. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζεται ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (180kDa) που υποδηλώνει την έκφραση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου η οποία δεν φαίνεται να μεταβάλλεται ανάμεσα σε νορμοξία (Εικόνα 35, διαδρομή 1) και υποξία (Εικόνα 35, διαδρομή 2). Παρόμοια επίπεδα έκφρασης παρουσιάζει και η τροποποιημένη FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R, η οποία παρατηρείται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (180kDa) στη νορμοξία (Εικόνα 35, διαδρομή 3).



Εικόνα 35. Αποτελέσματα της ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά Western εκχυλισμάτων και εκλουσμάτων κυττάρων μετά από ανοσοκατακρήμνιση με anti-SUMO2/3. Αριστερά παρουσιάζεται η ανάλυση των δειγμάτων εκλουσμάτων (inputs) και δεξιά των εκλουσμάτων (eluates). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι του HA επίτοπου για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB WT (διαδρομές 1,2,4,5) και της FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R (διαδρομές 3,6), έναντι του HIF-1α ως μάρτυρα της υποξίας και της τουμπουλίνης για επιβεβαίωση του ισοφορτώματος. Δεξιά συμβολίζονται τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σε kDa.

Όσον αφορά την ανάλυση των εκλουσμάτων, παρατηρούμε με αντίσωμα έναντι του SUMO2/3 (Εικόνα 35, διαδρομές 4,5,6) την ύπαρξη ενός smear πρωτεϊνών και στις τρεις συνθήκες ανοσοκατακρήμνισης, χαρακτηριστικό της κατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών διαφόρων μοριακών βαρών. Βγάζουμε, λοιπόν, το συμπέρασμα πως η ανοσοκατακρήμνιση πέτυχε και στις τρεις συνθήκες του πειράματος. Με αντίσωμα έναντι του HA στα ίδια δείγματα παρατηρούμε μία κύρια ζώνη στα 180kDa η οποία πιθανώς αντιστοιχεί στην μη-σουμοϋλιωμένη μορφή της FLAG-HA-NFRKB WT τόσο σε συνθήκες νορμοξίας, όσο και σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 35, διαδρομές 4,5). Η ζώνη αυτή εμφανίζεται πιθανών λόγω υπερέκφρασης του NFRKB και μη ειδικής κατακρήμνισης από τα σφαιρίδια. Στις διαδρομές 4 και 5 παρατηρούνται ζώνες 20-40kDa ανοδικά της μη-σουμοϋλιωμένης μορφής (σημειώνονται με μία κόκκινη αγκύλη), οι οποίες αποτελούν πιθανά τις σουμοϋλιωμένες μορφές της FLAG-HA-NFRKB WT. Η έκφραση των σουμοϋλιωμένων αυτών μορφών φαίνεται να ελαττώνεται σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 35, διαδρομή 5) επιβεβαιώνοντας

προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (104). Αντίθετα, παρατηρείται πως οι ζώνες που αντιστοιχούν στις σουμοϋλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R ελαττώνονται ελάχιστα αλλά δεν εξαφανίζονται σε σχέση με τις αντίστοιχες ζώνες της μορφής FLAG-HA-NFRKB WT (Εικόνα 35, διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 6, οι ζώνες σημειώνονται με μία κόκκινη αγκύλη), γεγονός που μας δείχνει πως το μετάλλαγμα FLAG-HA-NFRKB K488R K1083R δεν χάνει την δυνατότητα σουμοϋλίωσης.

Συμπερασματικά, καταλαβαίνουμε πως τόσο η μετάλλαξη στη θέση 488, όσο και η μετάλλαξη στην θέση 1083 δεν αρκούν για τη δημιουργία μεταλλάγματος του NFRKB που στερείται την ικανότητα σουμοϋλίωσης. Περαιτέρω βιοπληροφορική μελέτη απαιτείται για την ανάδειξη και άλλων υποψήφιας προς σουμοϋλίωση λυσίνων (βλ. Συζήτηση).

6. Συζήτηση

Ο NFRKB είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής και μία από τις 15 υπομονάδες του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης INO80 (INO80G). Μέχρι σήμερα έχει συσχετιστεί με κύριες λειτουργίες του κυττάρου, όπως η μεταγραφή και επιδιόρθωση του DNA, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ακριβώς ο ρόλος του. Ακόμη, βιβλιογραφικά δεδομένα συσχετίζουν τον NFRKB με παθολογικές καταστάσεις και τον καρκίνο. Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή (βλ. 1.3.2), ο NFRKB εμπλέκεται στον γαστρικό καρκίνο αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη UCHL5 (127), όπως και στα γλοιώματα του εγκεφάλου (128) αλλά και στον καρκίνο του ήπατος (118), στους οποίους εμφανίζει διαφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Ενδιαφέρον, όμως, παρουσιάζει το γεγονός πως ο NFRKB ως μεταγραφικός ρυθμιστής πιθανώς συμβάλλει στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω τροποποιήσεων στα επίπεδα της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Πράγματι, αδημοσίευτες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν πως ο NFRKB εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία μέσω της ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως μετά από την αποσιώπηση του γονιδίου του NFRKB, προκαλείται μία στατιστικά σημαντική μείωση στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF. Η υποξία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ογκογένεσης, καθώς ο αναπτυσσόμενος όγκος αντιμετωπίζει μειωμένη αιμάτωση και κατά συνέπεια, μειωμένη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά και οξυγόνο, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των HIF μεταγραφικών παραγόντων (66). Λαμβάνοντας υπόψη τα αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η πραγματοποίηση πειραμάτων που θα αποσαφηνίσουν περαιτέρω τον ρόλο του NFRKB στον καρκίνο αλλά και την επίδραση αυτού στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία.

Με πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης υπό την υπερέκφραση του NFRKB και του HIF-1α, δείχθηκε πως υπάρχει μία θετική (αλλά σχετικά μικρή και στατιστικά μη σημαντική) ρύθμιση του παράγοντα HIF από τον υπερεκφρασμένο NFRKB επιβεβαιώνοντας σε ένα βαθμό τα προηγούμενα πειράματα αποσιώπησης. Περαιτέρω πειράματα υπερέκφρασης του NFRKB σε συνθήκες υποξίας θα επιβεβαιώσουν το είδος της ρύθμισης. Παράλληλα, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων καρκινικών ιστών, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου του NFRKB εντοπίστηκε σε δύο τύπους καρκίνου, στους DLBC και THYM. Μάλιστα, περαιτέρω αναλύσεις συσχέτισαν θετικά την έκφραση του NFRKB με την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α μεταγραφικών παραγόντων και στους δύο τύπους καρκίνου (DLBC, THYM), υποδηλώνοντας

ένα επίπεδο αλληλεπίδρασης μεταξύ του NFRKB και των κυρίων μεταγραφικών παραγόντων της υποξίας (HIF). Επίσης, η ανάλυση αυτή αποκάλυψε πως μόνο στον καρκίνο DLBC, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NFRKB έχουν αρνητικό αντίκτυπο στο ποσοστό επιβίωσης αλλά και στην πρόγνωση της ασθένειας, δείχνοντας για άλλη μια φορά τη σημασία του NFRKB στον καρκίνο. Ο NFRKB φαίνεται επίσης από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (104) πως ρυθμίζεται σε μεταμεταφραστικό επίπεδο από τη υποξία μέσω αλλαγής της σουμοϋλίωσης του. Τα ευρήματα αυτά επαληθεύτηκαν και στον υπερεκφρασμένο NFRKB με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε νορμοξία και υποξία (Εικόνα 35). Γενικά, όμως, τίποτα δεν είναι γνωστό σχετικά με τον ρόλο της σουμοϋλίωσης του NFRKB κατά την υποξία ή για τη γενικότερη δράση της σουμοϋλίωσης στην λειτουργία του.

Η σουμοϋλίωση του NFRKB μπορεί να επιδράσει στην ικανότητα του να αλληλεπιδρά με πλήθος πρωτεϊνών αλλά και με ειδικές αλληλουχίες του DNA, έχοντας άμεσες συνέπειες στο μονοπάτι απόκρισης στην υποξία. Έτσι, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της σουμοϋλίωσης του παράγοντα αυτού, ξεκίνησε μία προσπάθεια δημιουργίας μεταλλαγμένων μορφών του που έχουν χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, προχώρησαν στην δημιουργία των πρώτων μεταλλαγμάτων FLAG-HA-NFRKB K488 και FLAG-HA-NFRKB K1083R με μεταλλάξεις στις λυσίνες στις θέσεις 488 και 1083 αντίστοιχα. Οι λυσίνες αυτές επιλέχθηκαν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα και με χρήση βιοπληροφορικών προγραμμάτων. Μελέτη, όμως, της ικανότητας σουμοϋλίωσης των δύο αυτών μορφών απέδειξε πως καμία από τις δύο μεταλλάξεις ξεχωριστά δεν οδήγησε σε πλήρη απώλεια της σουμοϋλίωσης (Διπλωματική Εργασία, Λακάκη Ελευθερία, 2022). Επόμενο βήμα λοιπόν, ήταν η δημιουργία και ο έλεγχος της σουμοϋλίωσης του διπλού μεταλλάγματος, μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, ο έλεγχος της έκφρασης της μεταλλαγμένης αυτής μορφής του NFRKB πραγματοποιήθηκε τόσο με την διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όσο και μέσω της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα και από τα δύο πειράματα έδειξαν πως η ύπαρξη των δύο μεταλλάξεων δεν διαφοροποίησε καθόλου τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R αφού η έκφραση της παρομοιάζει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (FLAG-HA-NFRKB WT) τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Όσον αφορά τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό, αυτός ακολουθεί το πρότυπο της πρωτεΐνης αγρίου τύπου

καθώς η μορφή FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα, με ελάχιστα ποσά της να εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα πιθανόν λόγω υπερέκφρασης της. Ο τελικός έλεγχος της σουμοϋλίωσης του διπλού μεταλλάγματος πραγματοποιήθηκε με την διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SUMO2/3 με σκοπό την κατακρήμνιση όλων των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού απέδειξαν πως το μετάλλαγμα FLAG-HA-NFRKB K488 K1083R εμφανίζει μεν μειωμένη σουμοϋλίωση σε σχέση με το αγρίου τύπου, αλλά διατηρεί την ικανότητα σουμοϋλίωσης, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα πως τόσο η μετάλλαξη της λυσίνης K488R, όσο και η μετάλλαξη K1083R δεν αρκούν για να δημιουργηθεί ένα μετάλλαγμα της πρωτεΐνης NFRKB που θα έχει απωλέσει παντελώς την ικανότητα σουμοϋλίωσης.

Στοχεύοντας λοιπόν στην κατασκευή ενός μεταλλάγματος που θα στερείται την ικανότητα σουμοϋλίωσης, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες χρησιμοποιώντας το εργαλείο πρόβλεψης θέσεων σουμοϋλίωσης JASSA (<http://www.jassa.fr/>) (133). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 36, βρέθηκαν τρεις επιπλέον πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης (134), οι λυσίνες K200, K327 και K359 (σημαίνονται με κόκκινο), οι οποίες δίνουν τα υψηλότερα σκορ και βρίσκονται μέσα σε συγκεκριμένα συναινετικά μοτίβα σουμοϋλίωσης.

Position K	Sequence	Best PS	Consensus direct		
			Type	PSd	DB Hit
K133	YRQLCFKSQYKRYLNSQQQYF	None	None	None	
K200	QRYLKVLRVKEECGDTALSS	High	Strong Consensus	High	37
K258	DKVELGDSDLKIMLKHHHEKR	Low	None	None	
K262	LGSDDLKIMLKHHHEKRKHQP	None	None	None	
K313	YDLAVLKKKVKEEKKKKKI	None	None	None	
K315	LAVLKKKVKEEKKKKKIKT	None	None	None	3
K318	LKKKVKEEKKKKIKTIKS	Low	None	None	
K319	KKKVKEEKKKKIKTIKSE	Low	None	None	1
K320	KKVKEEKKKKIKTIKSEA	None	None	None	1
K321	KVKEEKKKKIKTIKSEAE	None	None	None	
K324	EKEEKKKKIKTIKSEAEDLA	None	None	None	
K327	EKKKKIKTIKSEAEDLAEEL	High	NDSM	High	24
K359	APSPLAIPAKEEPLDLKEC	High	NDSM	High	31

Εικόνα 36. Βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του εργαλείου πρόβλεψης θέσεων σουμοϋλίωσης JASSA. Με κόκκινο σημαίνονται οι 3 λυσίνες που εμφανίζουν το μεγαλύτερο σκορ για θέσεις σουμοϋλίωσης. Πηγή: (133)

Μελλοντικά, λοιπόν, κρίνεται σκόπιμο να δημιουργηθούν και άλλα μεταλλάγματα στις τρεις νέες πιθανές λυσίνες που αναφέρονται παραπάνω. Σκοπός είναι η κατασκευή μίας μεταλλαγμένης μορφής του NFRKB που θα στερείται παντελώς την ικανότητα σουμοϋλίωσης, ώστε να μπορέσει να

μελετηθεί ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του NFRKB στην αλληλεπίδραση του με διάφορες πρωτεΐνες-στόχους και με την χρωματίνη, αλλά και ο ρόλος της στην ρύθμιση της μεταγραφής υποξικών γονιδίων, με δεδομένο τον ρόλο του NFRKB, ως θετικό ρυθμιστή του HIF-1α.

Καθώς, η υποξία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου, η διασαφήνιση των κυτταρικών μηχανισμών που επιστρατεύουν τα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να προσαρμοστούν στο υποξικό περιβάλλον του όγκου, πιθανώς να δημιουργήσει νέες προσεγγίσεις και να προσφέρει γνώσεις πάνω στο σχεδιασμό καλύτερων και πιο στοχευμένων μοριακών θεραπειών και φαρμάκων ενάντια του καρκίνου.

Βιβλιογραφία

1. Vu LD, Gevaert K, De Smet I. Protein Language: Post-Translational Modifications Talking to Each Other. *Trends Plant Sci.* 2018;23(12):1068-80.
2. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics.* 2014;14(4-5):513-24.
3. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 1997;88(1):97-107.
4. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 1996;135(6 Pt 1):1457-70.
5. Abbas T. The Role of Ubiquitination and SUMOylation in DNA Replication. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;40:189-220.
6. Nie M, Boddy MN. Cooperativity of the SUMO and Ubiquitin Pathways in Genome Stability. *Biomolecules.* 2016;6(1):14.
7. Eifler K, Vertegaal ACO. SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(12):779-93.
8. Cubeñas-Potts C, Matunis MJ. SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Dev Cell.* 2013;24(1):1-12.
9. Lyst MJ, Stancheva I. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 6):1389-92.
10. Sundvall M. Role of Ubiquitin and SUMO in Intracellular Trafficking. *Curr Issues Mol Biol.* 2020;35:99-108.
11. Hendriks IA, Vertegaal AC. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):581-95.
12. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, et al. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo j.* 1999;18(22):6462-71.
13. Kukkula A, Ojala VK, Mendez LM, Sistonen L, Elenius K, Sundvall M. Therapeutic Potential of Targeting the SUMO Pathway in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).
14. Sahin U, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V. Sumoylation in Physiology, Pathology and Therapy. *Cells.* 2022;11(5).
15. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):947-56.
16. Celen AB, Sahin U. Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *Febs j.* 2020;287(15):3110-40.
17. Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6252-8.
18. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35368-74.
19. Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, Lamond AI. Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(12):2298-310.
20. Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, Bohren KM. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(2):517-20.
21. Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep.* 2016;6:26509.
22. Pichler A, Fatouros C, Lee H, Eisenhardt N. SUMO conjugation - a mechanistic view. *Biomol Concepts.* 2017;8(1):13-36.

23. 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.
24. Tatham MH, Kim S, Yu B, Jaffray E, Song J, Zheng J, et al. Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry*. 2003;42(33):9959-69.
25. Tatham MH, Chen Y, Hay RT. Role of two residues proximal to the active site of Ubc9 in substrate recognition by the Ubc9.SUMO-1 thioester complex. *Biochemistry*. 2003;42(11):3168-79.
26. Xu J, He Y, Qiang B, Yuan J, Peng X, Pan XM. A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:8.
27. Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *Embo j*. 2006;25(21):5083-93.
28. Hietakangas V, Ankar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):45-50.
29. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, et al. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell*. 2010;39(4):641-52.
30. Zhu J, Zhu S, Guzzo CM, Ellis NA, Sung KS, Choi CY, et al. Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29405-15.
31. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:357-85.
32. Schmidt D, Müller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):2872-7.
33. Andrews EA, Palecek J, Sergeant J, Taylor E, Lehmann AR, Watts FZ. Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2005;25(1):185-96.
34. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*. 2002;108(1):109-20.
35. Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*. 2003;113(1):127-37.
36. Zhao X, Blobel G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4777-82.
37. Weger S, Hammer E, Heilbronn R. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 2005;579(22):5007-12.
38. Mukhopadhyay D, Dasso M. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(6):286-95.
39. Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride HM. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 7):1178-88.
40. Chang HM, Yeh ETH. SUMO: From Bench to Bedside. *Physiol Rev*. 2020;100(4):1599-619.
41. Shin EJ, Shin HM, Nam E, Kim WS, Kim JH, Oh BH, et al. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep*. 2012;13(4):339-46.
42. Mullen JR, Chen CF, Brill SJ. Wss1 is a SUMO-dependent isopeptidase that interacts genetically with the Slx5-Slx8 SUMO-targeted ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*. 2010;30(15):3737-48.
43. Schulz S, Chachami G, Kozackiewicz L, Winter U, Stankovic-Valentin N, Haas P, et al. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep*. 2012;13(10):930-8.
44. Ryu HY, Ahn SH, Hochstrasser M. SUMO and cellular adaptive mechanisms. *Exp Mol Med*. 2020;52(6):931-9.
45. Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 5):874-8.
46. Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, et al. Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 2001;276(43):40263-7.

47. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell*. 2007;131(2):309-23.
48. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell*. 2006;21(3):349-57.
49. Xu Z, Lam LS, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SW. Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *Faseb j*. 2008;22(1):127-37.
50. Qu J, Liu GH, Wu K, Han P, Wang P, Li J, et al. Nitric oxide destabilizes Pias3 and regulates sumoylation. *PLoS One*. 2007;2(10):e1085.
51. Van Damme E, Laukens K, Dang TH, Van Ostade X. A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci*. 2010;6(1):51-67.
52. Boggio R, Chiocca S. Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(4):430-6.
53. Mattoscio D, Segré CV, Chiocca S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson. *World J Virol*. 2013;2(2):79-90.
54. Müller S, Dejean A. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol*. 1999;73(6):5137-43.
55. Bernstock JD, Yang W, Ye DG, Shen Y, Pluchino S, Lee YJ, et al. SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(1):5-16.
56. Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol*. 2014;542:425-55.
57. Datwyler AL, Lättig-Tünnemann G, Yang W, Paschen W, Lee SL, Dirnagl U, et al. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(11):2152-9.
58. Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(5):950-62.
59. Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjöland H, et al. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1 α in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett*. 2004;569(1-3):293-300.
60. Kunz K, Wagner K, Mendler L, Hölper S, Dehne N, Müller S. SUMO Signaling by Hypoxic Inactivation of SUMO-Specific Isopeptidases. *Cell Rep*. 2016;16(11):3075-86.
61. Wilson JW, Shakir D, Batie M, Frost M, Rocha S. Oxygen-sensing mechanisms in cells. *Febs j*. 2020;287(18):3888-906.
62. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(4):1474-80.
63. Sarkar S, Banerjee PK, Selvamurthy W. High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol Cell Biochem*. 2003;253(1-2):287-305.
64. Lindholm ME, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Exp Physiol*. 2016;101(1):28-32.
65. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *Embo j*. 2012;31(11):2448-60.
66. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016;2(12):758-70.
67. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*. 2011;14(3):191-201.
68. Zhang M, Qiu Q, Li Z, Sachdeva M, Min H, Cardona DM, et al. HIF-1 α Regulates the Response of Primary Sarcomas to Radiation Therapy through a Cell Autonomous Mechanism. *Radiat Res*. 2015;183(6):594-609.

69. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
70. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):678-85.
71. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510-4.
72. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2011;12(1):9-22.
73. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11(1):72-82.
74. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *Faseb j.* 2003;17(2):271-3.
75. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3 α is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *Faseb j.* 2005;19(11):1396-406.
76. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 2001;414(6863):550-4.
77. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, et al. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol.* 1996;16(4):1706-13.
78. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9361-74.
79. Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor-1 α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer.* 2007;96(8):1284-92.
80. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-17.
81. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(14):4587-602.
82. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells.* 2019;8(3).
83. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004;95(2):146-53.
84. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):1-15.
85. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001;15(20):2675-86.
86. Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(18):3569-82.
87. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature.* 2008;453(7196):807-11.
88. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J.* 2006;396(3):517-27.
89. Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S. SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2009;284(7):4123-31.
90. Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem.* 2008;283(50):34495-9.
91. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 α expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(5):420-6.

92. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, Sée V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
93. Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells.* 2020;9(11).
94. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(1):394-400.
95. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouysségur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360(3):646-52.
96. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α . *Nucleic Acids Res.* 2010;38(6):1922-31.
97. Kang X, Li J, Zou Y, Yi J, Zhang H, Cao M, et al. PIASy stimulates HIF1 α SUMOylation and negatively regulates HIF1 α activity in response to hypoxia. *Oncogene.* 2010;29(41):5568-78.
98. Li J, Xu Y, Long XD, Wang W, Jiao HK, Mei Z, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity. *Cancer Cell.* 2014;25(1):118-31.
99. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell.* 2003;11(4):1043-54.
100. Kuo HY, Chang CC, Jeng JC, Hu HM, Lin DY, Maul GG, et al. SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):16973-8.
101. Núñez-O'Mara A, Gerpe-Pita A, Pozo S, Carlevaris O, Urzelai B, Lopitz-Otsoa F, et al. PHD3-SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity. *J Cell Sci.* 2015;128(1):40-9.
102. Sallais J, Alahari S, Tagliaferro A, Bhattacharjee J, Post M, Caniggia I. Factor inhibiting HIF1-A novel target of SUMOylation in the human placenta. *Oncotarget.* 2017;8(69):114002-18.
103. Cai Q, Verma SC, Kumar P, Ma M, Robertson ES. Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS One.* 2010;5(3):e9720.
104. Chachami G, Stankovic-Valentin N, Karagiota A, Basagianni A, Plessmann U, Urlaub H, et al. Hypoxia-induced Changes in SUMO Conjugation Affect Transcriptional Regulation Under Low Oxygen. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(6):1197-209.
105. 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. *Mol Cell.* 2008;31(6):909-17.
106. 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.
107. Tosi A, Haas C, Herzog F, Gilmozzi A, Berninghausen O, Ungewickell C, et al. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell.* 2013;154(6):1207-19.
108. Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, et al. YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(9):872-4.
109. van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell.* 2004;119(6):777-88.
110. Poli J, Gasser SM, Papamichos-Chronakis M. The INO80 remodeler in transcription, replication and repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1731).
111. Chen L, Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, et al. Subunit organization of the human INO80 chromatin remodeling complex: an evolutionarily conserved core complex catalyzes ATP-dependent nucleosome remodeling. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11283-9.
112. 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. *Mol Cell.* 2015;57(5):887-900.
113. 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. *Mol Cell.* 2015;57(5):901-11.

114. 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. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):1016-26, 1-8.
115. Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, et al. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature.* 2010;468(7321):316-20.
116. Wang L, Du Y, Ward JM, Shimbo T, Lackford B, Zheng X, et al. INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell Stem Cell.* 2014;14(5):575-91.
117. Peng Q, Wan D, Zhou R, Luo H, Wang J, Ren L, et al. The biological function of metazoan-specific subunit nuclear factor related to kappaB binding protein of INO80 complex. *Int J Biol Macromol.* 2022;203:176-83.
118. 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 Cell Biol.* 2021;40(10):1298-307.
119. 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.
120. 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 Res.* 2006;66(13):6851-60.
121. 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. *Mol Cytogenet.* 2008;1:23.
122. 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.
123. Zhou B, Wang L, Zhang S, Bennett BD, He F, Zhang Y, et al. INO80 governs superenhancer-mediated oncogenic transcription and tumor growth in melanoma. *Genes Dev.* 2016;30(12):1440-53.
124. Zhang S, Zhou B, Wang L, Li P, Bennett BD, Snyder R, et al. INO80 is required for oncogenic transcription and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2017;36(10):1430-9.
125. Hu J, Liu J, Chen A, Lyu J, Ai G, Zeng Q, et al. Ino80 promotes cervical cancer tumorigenesis by activating Nanog expression. *Oncotarget.* 2016;7(44):72250-62.
126. 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 Genet Cytogenet.* 1999;113(2):126-33.
127. 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. *Cell Mol Biol Lett.* 2020;25:29.
128. 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.
129. Lee K, Byun K, Hong W, Chuang HY, Pack CG, Bayarsaikhan E, et al. Proteome-wide discovery of mislocated proteins in cancer. *Genome Res.* 2013;23(8):1283-94.
130. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(4):525-31.
131. Barysch SV, Dittner C, Flotho A, Becker J, Melchior F. Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. *Nat Protoc.* 2014;9(4):896-909.
132. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W556-w60.
133. Beauclair G, Bridier-Nahmias A, Zagury JF, Saïb A, Zamborlini A. JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics.* 2015;31(21):3483-91.

134. 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. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(10):927-36.