



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση του ρόλου της σουμοϋλίωσης στην αλληλεπίδραση του EXOSC10 με πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος»

«Investigation of the role of sumoylation in the interaction of EXOSC10 with RNA exosome proteins»

Σπύρου Νίκη, του Γεωργίου

Λάρισα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Σίμος Γεώργιος (μέλος): Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέπουσα την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας κ. Γεωργία Χαχάμη και με αυτή ολοκληρώνω τον κύκλο σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου κ. Γεωργία Χαχάμη για την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της και με την ομάδα της, την πολύτιμη καθοδήγησή της και τις υποδείξεις της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, οι οποίες με βοήθησαν να βελτιώσω τις ικανότητές μου ως ερευνήτρια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα μου κ. Αντώνιο Γιακουντή, Επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ. και το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Γεώργιο Σίμο, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ. για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας αλλά και για τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους. Ένας ακόμα λόγος που θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Σίμο είναι για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτωρ Χρύσα Φιλιπποπούλου για τη συνεργασία μας, την μεγάλη βοήθειά και στήριξη της σε κάθε στάδιο της εργασίας μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής που ήταν πρόθυμα να με βοηθήσουν όποτε χρειαζόταν.

Τέλος θέλω να πω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους, την αγάπη τους, την εμπιστοσύνη τους και που αποτέλεσαν μεγάλη βοήθεια για μένα ώστε να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	7
Abstract	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Υποξία.....	10
1.1.1 Γενικά.....	10
1.1.2 Απόκριση στην υποξία μέσω ρύθμισης μεταγραφής	11
1.1.2.1 Η ρύθμιση του επαγόμενου από την υποξία HIF-1α.....	12
1.1.3 Μη μεταγραφική απόκριση στην υποξία	15
1.2 Σουμοϋλίωση	16
1.2.1 Πρωτεΐνες SUMO.....	17
1.2.2 Μηχανισμός σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών	18
1.2.2.2 Μοτίβα σουμοϋλίωσης.....	21
1.2.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις κυτταρικές λειτουργίες και σε διάφορες ασθένειες.....	24
1.2.4 Η σουμοϋλίωση σε καταστάσεις στρες.....	27
1.2.5 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης σε συνθήκες υποξίας.....	28
1.3 Η πρωτεΐνη Exosome component 10 (Exosc10).....	29
1.3.1 Γενικά.....	29
1.3.2 Ο ρόλος της EXOSC10 στο RNA εξώσωμα	31
1.3.2.1 Οι συμπαραγόντες του RNA εξωσώματος και η αλληλεπίδραση τους με την EXOSC10.....	34
1.3.3 Αλληλεπιδράσεις της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος	36
1.3.4 Ρόλοι της EXOSC10 εκτός του RNA εξωσώματος.....	37
2. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας	38
3. Υλικά.....	39
3.1 Κυτταρικές σειρές.....	39
3.2 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.....	39
3.3 Αντισώματα	39
3.4 Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σε καθαρή μορφή	41
3.5 Χημικά.....	41
3.6 Σφαιρίδια	41
3.7 Διαλύματα.....	42
3.7.1) Για τις καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν:	42
3.7.2 Για τη δημιουργία ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος	43

3.7.3 Για τα πειράματα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν.....	43
3.7.4 Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν.....	44
3.7.5 Για τα πειράματα της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν	46
3.7.6 Για τα πειράματα συγκατακρήμνισης (in vitro pull down) χρησιμοποιήθηκε..	46
3.7.7 Για τα πειράματα της in vitro σουμοϋλίωσης χρησιμοποιήθηκαν.....	46
4. Μέθοδοι.....	47
4.1 Κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HeLa	47
4.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων.....	47
4.1.2 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών κυτταρικών σειρών.....	47
4.1.3 Επώαση σε συνθήκες υποξίας	48
4.1.4 Καταμέτρηση κυττάρων	48
4.2 Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών	48
4.2.1 Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	48
4.2.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες	50
4.2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση	51
4.2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	51
4.2.2.3 Παρασκευή πηκτής και ηλεκτροφόρηση	52
4.2.3 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών	52
4.2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	53
4.2.5 Ποσοτικοποίηση σήματος πρωτεϊνών	54
4.2.6 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	55
4.2.6.1 Παρασκευή πυρηνικού εκχυλίσματος.....	56
4.2.6.2 Ανοσοκατακρήμνιση	57
4.2.6.2.1 Προετοιμασία και εξισορρόπηση σφαιριδίων στο διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης	57
4.2.6.2.2 Ανοσοκατακρήμνιση και έκλουση.....	58
4.2.7 Δοκιμή in vitro συγκατακρήμνισης σε σουμοϋλιωμένες και μη πρωτεΐνες (in vitro pull down assay).....	58
4.2.7.1 Προετοιμασία των εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa	59
4.2.7.2 Προετοιμασία και εξισορρόπηση σφαιριδίων γλουταθείνης (GSH)	59
4.2.7.3 In vitro σουμοϋλίωση με τη χρήση ανασυνδυασμένης EXOSC10.....	60
4.2.7.4 Συγκατακρήμνιση με ενδογενείς πρωτεΐνες και έκλουση πρωτεϊνών.....	61
4.2.8 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	62
5. Αποτελέσματα.....	63

5.1 Μελέτη της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού ενδογενών πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας.....	63
5.1.1 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας.....	64
5.1.2 Μελέτη των ενδοκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας.....	66
5.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος	75
5.2.1 Εύρεση περιοχών SIM (SUMO interacting motifs) στις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος	76
5.2.2 Ανοσοκατακρήμνιση ενδογενούς MTR4 για έλεγχο αλληλεπίδρασης με την EXOSC10.....	81
5.2.3 Συγκατακρήμνιση χιμαιρικών σουμοϋλιωμένων και μη σουμοϋλιωμένων GST-EXOSC10 πρωτεϊνών με πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος.....	83
6.Συζήτηση.....	86
Βιβλιογραφία.....	91

Περίληψη

Ως υποξία ορίζεται η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου σε κύτταρα, ιστούς ή και σε ολόκληρους οργανισμούς. Τα κύτταρα προσαρμόζονται στην χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες και μηχανισμούς απόκρισης. Η σουμοϋλίωση (SUMOylation) είναι η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών-στόχων και φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση των μονοπατιών απόκρισης στην υποξία. Αποτελέσματα ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης του Εργαστηρίου μας σε καρκινικά κύτταρα έδειξε την ύπαρξη μιας ομάδας πρωτεϊνών, των οποίων τα επίπεδα σουμοϋλίωσης μεταβάλλονται στην υποξία, χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα της πρωτεϊνικής τους έκφρασης (100). Μια εξ αυτών των πρωτεϊνών, η οποία παρουσιάζει μείωση της σουμοϋλίωσης της κατά την υποξία είναι και η πρωτεΐνη EXOSC10 (Exosome Component 10). Η EXOSC10 είναι μία εξωριβονουκλεάση και μία εκ των δύο κυρίων καταλυτικών υπομονάδων του RNA εξωσώματος, ενός πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου με ρόλο στην επεξεργασία και την αποικοδόμηση διαφόρων RNA.

Κύριο θέμα μελέτης της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην αλληλεπίδρασή της με τις δομικές (EXOSC2, EXOSC3), καταλυτικές (DIS3) και αλληλεπιδρώσες (MTR4, MPP6, C1D) πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος. Αρχικά με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western δείχθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών του εξωσώματος δεν παρουσίασαν αλλαγές ανάμεσα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Παρόλα αυτά δύο συμπαράγοντες του εξωσώματος (συγκεκριμένα ο MTR4 και ο MPP6) παρουσίασαν αλλαγές στον κυτταρικό εντοπισμό τους με τον τελευταίο να δείχνει στατιστικά σημαντική μετακίνηση από το πυρηνίσκο προς το πυρηνόπλασμα. Ο παράγοντας MTR4 βρίσκεται σε κοινό σύμπλοκο με τις EXOSC10, C1D και MPP6 στο καπάκι του RNA εξωσώματος. Βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε πως η MTR4 (και σε μικρότερο βαθμό η MPP6 και η δομική EXOSC3) παρουσιάζει υψηλή πιθανότητα να διαθέτει περιοχές SIM (SUMO interaction motifs) με τις οποίες πιθανά αλληλεπιδρά με την EXOSC10 μέσω σουμοϋλίωσης. Πειράματα συγκατακρήμνισης σουμοϋλιωμένων, και μη σουμοϋλιωμένων μορφών της

EXOSC10 με ενδογενείς πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος έδειξαν πως ενώ η EXOSC10 αλληλεπιδρά και με την MTR4 και με την C1D, μόνο η αλληλεπίδραση με την C1D επηρεάζεται από το βαθμό σουμουλίωσης της EXOSC10. Συμπερασματικά στην παρούσα εργασία εντοπίστηκαν αλλαγές στην τοπολογία και αλληλεπίδραση των συμπαραγόντων του RNA εξωσώματος που πιθανά να οφείλονται στην εξαρτώμενη από την υποξία αποσουμουλίωση της EXOSC10.

Abstract

Hypoxia is defined as reduced oxygen availability in cells, tissues, or whole organisms. Cells adapt to low oxygen concentration by activating transcription factors and response mechanisms. SUMOylation is the covalent attachment of SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) proteins to lysine residues of target proteins and appears to be involved in the regulation of hypoxia response pathways. Quantitative proteomic analysis conducted in our laboratory on cancer cells revealed the presence of a group of proteins whose SUMOylation levels change during hypoxia, without altering their protein expression levels (100). One of these proteins that showed decreased SUMOylation during hypoxia is EXOSC10 (Exosome Component 10). EXOSC10 is an exoribonuclease and one of the two main catalytic subunits of the RNA exosome, a multiprotein complex with a role in the processing and degradation of various RNAs.

The main topic of this study was to investigate the role of SUMOylation of EXOSC10 in its interaction with structural (EXOSC2, EXOSC3), catalytic (DIS3), and interacting (MTR4, MPP6, C1D) proteins of the exosome. Initially, Western blot experiments showed that the expression levels of the proteins under study did not change between normoxia and hypoxia conditions. However, two exosome subunits (specifically, MTR4 and MPP6) exhibited changes in their cellular localization, with the latter showing statistically significant relocation from the nucleolus to the nucleoplasm. MTR4 is in a common complex with EXOSC10, C1D, and MPP6 in the exosome cap. Bioinformatics analysis indicated that MTR4 (and to a lesser extent, MPP6 and structural EXOSC3) have a high probability of possessing SIMs (SUMO interaction motifs) with which they may potentially interact with EXOSC10 through SUMOylation. In vitro pull down experiments with SUMOylated and non-SUMOylated forms of EXOSC10 and endogenous exosome proteins showed that while EXOSC10 interacts with both MTR4 and C1D, only the interaction with C1D is affected by the degree of SUMOylation of EXOSC10. In conclusion, this study identified changes in the topology and interaction of exosome subunits that may be attributed to hypoxia-dependent deSUMOylation of EXOSC10

1.Εισαγωγή

1.1 Υποξία

1.1.1 Γενικά

Ως υποξία ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία το οξυγόνο δεν είναι διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες, σε επίπεδο κυτάρου, ιστού και οργανισμού, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί η ομοιοστασία. Ως προς την ένταση η υποξία μπορεί να ποικίλει από ήπια έως σοβαρή με τα επίπεδα οξυγόνου στα κύτταρα να είναι 0,5%-2%, ενώ σε πιο σοβαρή μείωση του οξυγόνου (ανοξία) τα επίπεδα είναι μικρότερα του 0,5%. Ως προς τη διάρκεια η υποξία διακρίνεται σε οξεία και χρόνια μορφή. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί προσαρμογής στις υποξικές συνθήκες. Ειδικότερα συμβαίνουν αλλαγές τόσο σε επίπεδο γονιδίων όσο και στην έκφραση και ρύθμιση πρωτεϊνών. Οι κύριες αιτίες πρόκλησης υποξίας σε επίπεδο ιστού είναι η χαμηλή ροή αίματος στον ιστό και η χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου στο αίμα (1),(2).

Η υποξία εμφανίζεται τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Μία φυσιολογική κατάσταση που επάγει την υποξία αποτελεί το μεγάλο υψόμετρο (3). Ακόμα έχει φανεί πως ύστερα από έντονη άσκηση μπορεί να επαχθεί ανακατανομή του οξυγόνου στους ιστούς και υποξία (4). Επίσης η υποξία είναι χαρακτηριστικός παράγοντας βιολογικών διεργασιών όπως η εμβρυογένεση (5), ενώ παράλληλα επηρεάζει την επιβίωση και τις βιολογικές λειτουργίες των βλαστικών κυττάρων (6). Πιο συγκεκριμένα για τα βλαστικά κύτταρα έχει δειχθεί πως μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης μεταμοσχεύσεων και μεγαλύτερες θεραπευτικές δυνατότητες από τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες νορμοξίας (7),(8).

Παθολογικά φαινόμενα που επάγουν την υποξία μπορεί να αποτελούν η φλεγμονή, ο διαβήτης, η ισχαιμία και ο καρκίνος (3). Ένα βασικό χαρακτηριστικό των στερεών όγκων είναι η ύπαρξη υποξικών ή ακόμη και ανοξικών περιοχών στο κέντρο τους. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στην ανεπαρκή και άναρχη ανάπτυξη καθώς και στη λειτουργική ανωμαλία των αγγείων του όγκου (9). Τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται στην υποξία μέσω επαναπρογραμματισμού της γονιδιακής τους έκφρασης, με αποτέλεσμα την εξάπλωση και την αύξηση της επιθετικότητας του όγκου (10). Η υποξία

ρυθμίζοντας τον παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor), ενεργοποιεί την αγγειογένεση ενώ μπορεί να επάγει την διαδικασία EMT (epithelial-to-mesenchymal transition), η οποία είναι απαραίτητη για την ικανότητα διείσδυσης (invasion) και μετανάστευσης (migration) των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα η υποξία ρυθμίζει γονίδια πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα διάφορα μονοπάτια επαγωγής της διαδικασίας EMT (11). Επιπλέον επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τον αναερόβιο μεταβολισμό μέσω ρύθμισης πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της γλυκόλυσης. Ρόλο στην εξέλιξη του όγκου παίζει και η επαγόμενη από υποξία αυτοφαγία. Επιπρόσθετα το υποξικό περιβάλλον των όγκων έχει συσχετιστεί με την ανοσοαπόκριση, συμπεριλαμβανομένης της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας (12).

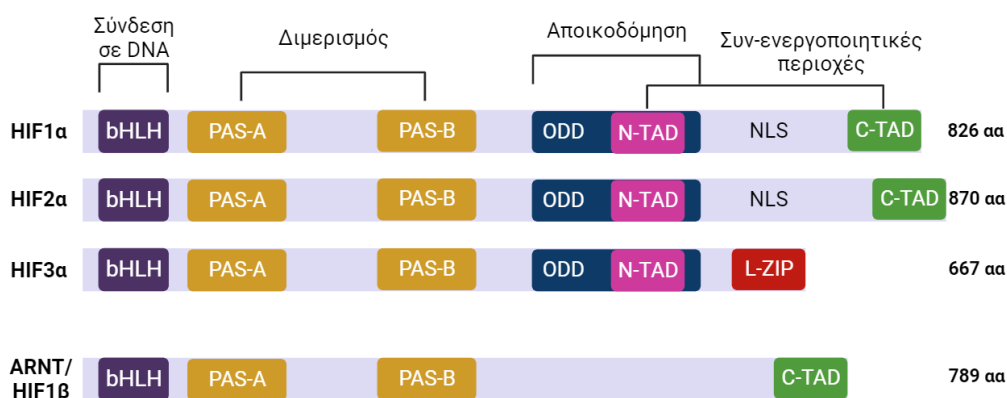
1.1.2 Απόκριση στην υποξία μέσω ρύθμισης μεταγραφής

Η προσαρμογή μέσω αλλαγής γονιδιακής έκφρασης στην υποξία γίνεται κυρίως από τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες (HIFs-Hypoxia Inducible Factors), οι οποίοι είναι μια οικογένεια παραγόντων μεταγραφής. Οι HIF παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση ενός ευρέως φάσματος γονιδίων ώστε να μπορέσει ανταπεξέλθει το κύτταρο στην αλλαγή της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στην κυτταρική προσαρμοστική απόκριση στην υποξία, όπως η ερυθροποίηση, η απόπτωση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, καθώς και η ογκογένεση (13).

Οι πρωτεΐνες HIF αποτελούνται από α/β ετεροδιμερή και ανήκουν στην bHLH-PAS (PER-ARNT-SIM) οικογένεια καθώς περιέχουν περιοχές έλικα-θηλειά-έλικα (helix-loop-helix, bHLH), οι οποίες προσδένονται στο DNA (εικόνα 1). Η β υπομονάδα τους (HIF-1b, EPAS1 ARNT) εκφράζεται συνέχεια, ενώ η α υπομονάδα ρυθμίζεται από τα επίπεδα οξυγόνου. Υπάρχουν τρία γονίδια για την ρυθμιζόμενη από οξυγόνο HIF-α υπομονάδα στον άνθρωπο: HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α (εικόνα 1). Ο HIF-1α περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Semenza και τους συνεργάτες του (14). Ο HIF-2α περιγράφεται από διάφορες ομάδες το 1997. Ο ανθρώπινος HIF-3α περιγράφεται από τη Makino και συνεργάτες τους (15). Είναι γνωστό πως οι HIF-1α και HIF-2α λειτουργούν ως κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία, ενώ οι ρόλοι που διαδραματίζει ο

HIF-3α στην υποξία είναι λιγότερο μελετημένοι. Η υπομονάδα HIF1β, επίσης γνωστή ως ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), κωδικοποιείται από δύο γονίδια ARNT1 και ARNT2 (16), (17).

Δομικά οι HIFα υπομονάδες περιέχουν μια αμινοτελική επικράτεια bHLH η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) του DNA, τα οποία περιλαμβάνουν την ακολουθία 5'-[A/G] CGTG-3'. Ακόμα περιέχουν 2 επικράτειες PAS, τις PAS A και PAS B, οι οποίες είναι περίπου 50 αμινοξέα σε έκταση και απέχουν μεταξύ τους 150 αμινοξέα. Οι επικράτειες PAS μεσολαβούν για να γίνει ο ετεροδιμερισμός με την HIFβ (ARNT) υπομονάδα. Όλες οι HIFα υπομονάδες περιέχουν την συν-ενεργοποιητική επικράτεια N-TAD και μία επικράτεια ODD (oxygen-dependent degradation domain). Η δεύτερη συν-ενεργοποιητική επικράτεια C-TAD, βρίσκεται στις υπομονάδες HIF-1α, HIF-2α και HIFβ. Επίσης μόνο η υπομονάδα HIF-3α διαθέτει μια επικράτεια φερμουάρ λευκίνης (LZIP). Τέλος όλες οι ισομορφές των HIF υπομονάδων διαθέτουν περιοχή εντοπισμού στον πυρήνα (NLS) (6),(13),(17).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των παραγόντων HIF και των δομικών τους επικρατειών. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

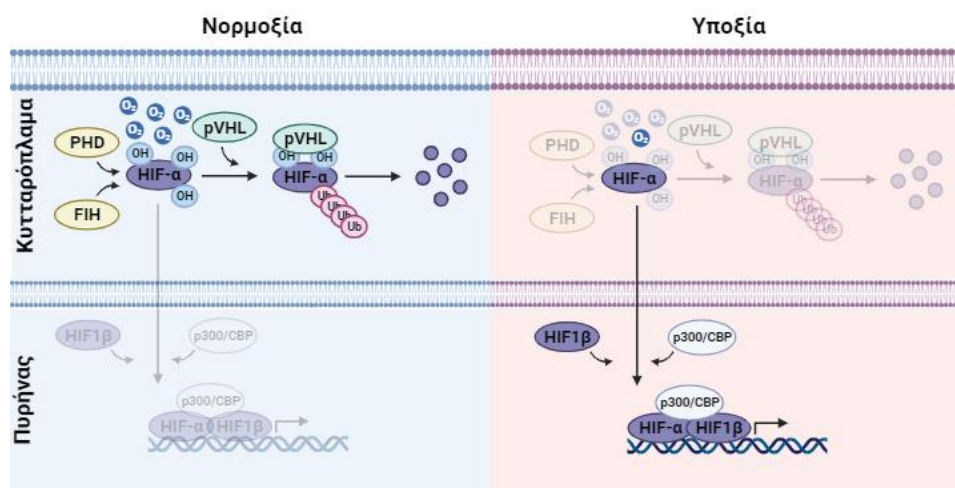
1.1.2.1 Η ρύθμιση του επαγόμενου από την υποξία HIF-1α

Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση:

Σε συνθήκες νορμοξίας ο παράγοντας HIF-1α φαίνεται να υποβάλλεται σε ουβικιτινίωση και ύστερα σε πρωτεοσωμική αποικοδόμηση (18). Ο μηχανισμός αυτός ξεκινάει με τη δράση των ενζύμων PHDs (prolyl-4-hydroxylases), οι οποίες απαιτούν το οξυγόνο ως υπόστρωμα. Συγκεκριμένα τα ένζυμα PHD υδροξυλιώνουν τα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564, τα οποία βρίσκονται στην

ODD επικράτεια του παράγοντα HIF-1α (19). Έπειτα τα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα προλίνης αναγνωρίζονται από τον παράγοντα von Hippel-Lindau (VHL), ο οποίος είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και μέρος του συμπλέγματος της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η πρόσδεση του pVHL οδηγεί στην ουβικιτινίωση του HIF-1α και στην αποικοδόμησή του από πρωτεάσωμα (20). Ασχέτως με την αποικοδόμηση του ο HIF-1α υδροξυλιώνεται και στο κατάλοιπο ασπαραγίνης 803 της C-TAD επικράτεια. Αυτή η υδροξυλίωση, οι οποία πραγματοποιείται από το ένζυμο FIH (factor-inhibiting HIF1), παρεμποδίζει τη πρόσδεση του συμπαραγόντα CBP/p300 (CREB-binding protein). Με αυτό τον τρόπο ο HIF-1α δεν μπορεί να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας (21).

Σε συνθήκες υποξίας τα ένζυμα PHD δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν πλέον το μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα για την υδροξυλίωση του HIF-1α. Επομένως ο HIF-1α διαφεύγει της ουβικιτινίωσης και συσσωρεύεται (22). Στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με την ARNT υπομονάδα και σχηματίζει ένα μεταγραφικό σύμπλεγμα με συμπαραγόντες μεταγραφής όπως το p300 και το CBP μέσω αλληλεπιδράσεων με τις επικράτειες συν-ενεργοποίησης N-TAD και C-TAD (23). Το διμερές HIF-1α/ARNT συνδέεται στα HRE των υποκινητών των γονιδίων στόχων (24) (εικόνα 2).



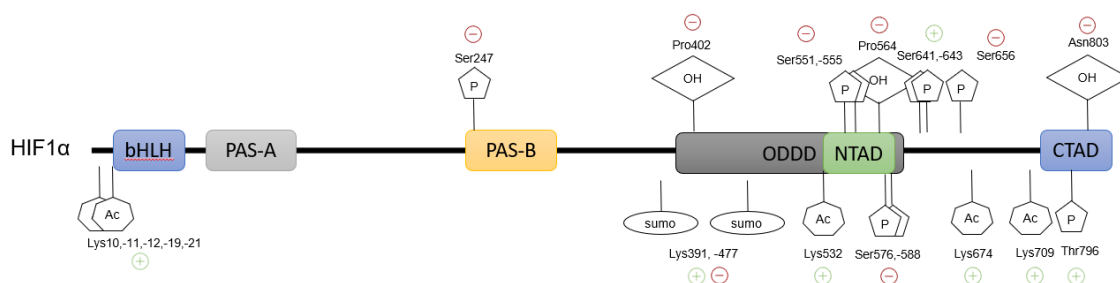
Εικόνα 2: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF σε νορμοξία και υποξία. Σε συνθήκες νορμοξίας οι PHD και FIH υδροξυλιώνουν τον HIFα σε κατάλοιπα προλίνης και ασπαραγίνης και μέσω της δράσης της pVHL ουβικιτινιώνεται και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Σε συνθήκες υποξίας οι υδρολάσες απενεργοποιούνται, ο HIFα σταθεροποιείται, εισάγεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον HIF1β και μαζί με τους συμπαραγόντες p300/CBP δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση:

Ρύθμιση του HIF-1α γίνεται και μη οξυγονο-εξαρτώμενα τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε επίπεδο μετάφρασης.

Σηματοδότηση μέσω μονοπατιών που συμμετέχουν οι JAK/STAT3 και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB έχουν συσχετιστεί με τη ρύθμιση του HIF-1α, αυξάνοντας τα επίπεδα mRNA του (25). Επίσης έχει αποδειχθεί πως η κινάση PKR (protein kinase R) καταστέλει τη μεταγραφή του HIF-1α μέσω αναστολής της σηματοδότησης STAT3 (26). Ακόμα η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI-3K/mTOR αυξάνει το ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-1α, οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων (27).

Η ρύθμιση της σταθερότητας και της δράσης του HIF-1α πραγματοποιείται και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Πέρα από την υδροξυλίωση και την ουβικιτινίωση, που προαναφέρθηκαν, ο HIF-1α υπόκειται και σε άλλες τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, S-νιτροζυλίωση, νεντυλίωση, φωσφορυλίωση και σουμοϋλίωση. Ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο, στο οποίο δρουν αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ενεργοποιητικό ή κατασταλτικό (25). Για παράδειγμα η ακετυλίωση στο κατάλοιπο K709, η οποία πραγματοποιείται από τον p300, αυξάνει τη σταθερότητα του HIF-1α κατά την υποξία (28) (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α.

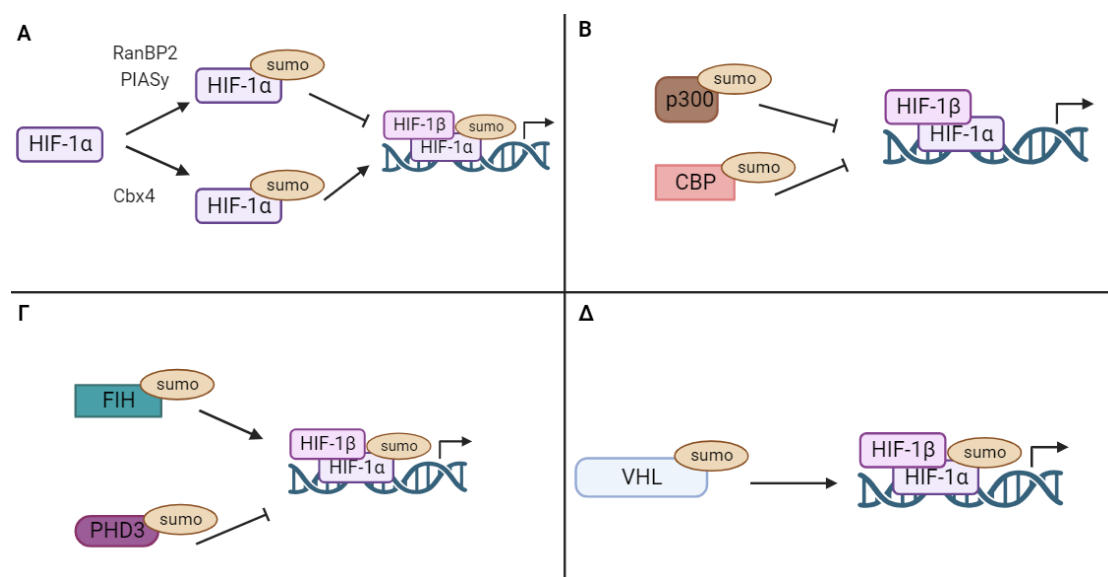
Ιδιαίτερα η σουμοϋλίωση (ομοιοπολική σύζευξη των πρωτεϊνών SUMO σε πρωτεΐνες, αναλύεται παρακάτω) φαίνεται να παίζει ρόλο τόσο στη ρύθμιση του ίδιου του HIF όσο και συμπαραγόντων του μονοπατιού της υποξίας. Το αποτέλεσμα που φέρει η σουμοϋλίωση στη λειτουργία του HIF-1α δεν είναι ξεκάθαρο λόγω των αντιπαραθέσεων μεταξύ ερευνών. Ο HIF-1α είναι γνωστό πως σουμοϋλιώνεται στα κατάλοιπα K391 και K477 και η πρώτη έρευνα έδειξε πως αυτή η τροποποίηση αύξησε τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και της

μεταγραφική της ενεργότητας (29). Ακόμα έχει φανεί πως η σουμοϋλίωση στις συγκεκριμένες θέσεις μέσω της SUMO E3 λιγάσης Cbx4 ενισχύει την μεταγραφική δράση του HIF-1α (30). Αντιθέτως άλλη μελέτη υπέδειξε πως η σουμοϋλίωση στις θέσεις K391 και K477 μέσω της SUMO E3 λιγάσης RanBP2/Nup538 οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α (31). Επιπλέον, στην υποξία, έχει αποδειχθεί πως η αλληλεπίδραση της SUMO E3 λιγάσης PIASy με τον HIF-1α αυξάνει τη σουμοϋλίωσή του και ρυθμίζει αρνητικά την σταθερότητα και την μεταγραφική του ενεργότητα (32) (εικόνα 3). Σουμοϋλίωση υφίστανται και στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον καταρράκτη υποξικής σηματοδότησης όπως οι συμπαραγόντες CBP/p300 και ο pVHL και οι υδροξυλάσες PHD και FIH (33). Ειδικότερα η σουμοϋλίωση των συμπαραγόντων CBP/p300 οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση της μεταγραφικής τους δράσης (34),(35), ενώ η αποσουμοϋλίωση της p300 ενισχύει την ικανότητα σύνδεσης της με τον HIF-1α (36). Ακόμα η σουμοϋλίωση του pVHL στην υποξία στο κατάλοιπο K171 καταστέλλει την δράση της ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και ως E3 λιγάση της ουβικιτίνης, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του HIF-1α. Επιπλέον η σουμοϋλιωμένη PHD3 φάνηκε να είναι πιο ισχυρός μεταγραφικός αναστολέας για τον HIF-1α, σε σχέση με την μη σουμοϋλιωμένη μορφή του (37). Τέλος η σουμοϋλίωση της FIH προωθεί την αποικοδόμησή της, άρα ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (38) (εικόνα 4).

1.1.3 Μη μεταγραφική απόκριση στην υποξία

Είναι γνωστό πως η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων από τους HIFs έχει κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία απόκρισης στην υποξία. Ωστόσο πλέον έχουν αναδειχθεί και οι μη μεταγραφικές διαδικασίες, που επηρεάζονται από την υποξία, όπως είναι σύνθεση πρωτεϊνών και η μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων mRNA. Ειδικότερα έχει φανεί πως η ανοξία αποτελεί το έναυσμα για ένα μηχανισμό φωσφορυλίωσης από τον eIF2α, ο οποίος θα οδηγήσει σε αναστολή του μονοπατιού αποικοδόμησης του RNA NMD (Nonsense-Mediated RNA Decay) (39). Ακόμα ένα παράδειγμα αποτελεί η μείωση του χρόνου ημιζωής συγκεκριμένων ομάδων mRNA σε μονοκύτταρα σε συνθήκες υποξίας (40).

Τελευταία μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και κυρίως η σουμοϋλίωση πρωτεϊνών φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του μονοπατιού της υποξίας. Παρακάτω αναλύεται διεξοδικά ο μηχανισμός σουμοϋλίωσης αλλά και ο γνωστός ρόλος του στο μονοπάτι της υποξίας.



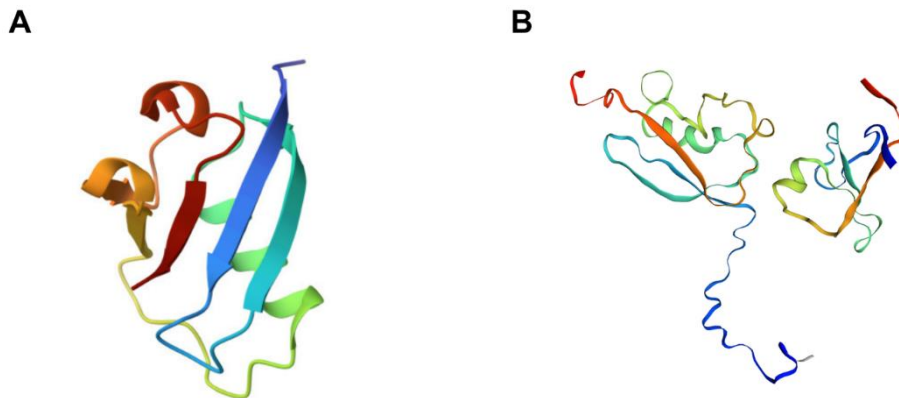
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία με SUMO πρωτεΐνες. Η κάθε αλληλεπίδραση έχει διαφορετικό αποτέλεσμα στη σταθερότητα και την ενεργότητα του HIF-1α. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

1.2 Σουμοϋλίωση

Η σουμοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία συναντάται σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ρύθμιση, την γονιδιακή έκφραση και τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Πιο συγκεκριμένα εμπλέκεται σε λειτουργίες του κυττάρου όπως την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, την δυναμική των χρωμοσωμάτων, την απόπτωση και τη βιογένεση του ριβοσώματος (41). Κατά τη σουμοϋλίωση πραγματοποιείται η αντιστρεπτή ομοιοπολική σύνδεση μίας SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) πρωτεΐνης σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου (33),(42). Η SUMO πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε πρώτη φορά μέσω της ικανότητά της να τροποποιεί ομοιοπολικά την πρωτεΐνη RanGAP1. Αυτή η τροποποίηση επιτρέπει τον εντοπισμό της RanGAP1 στους πυρηνικούς πόρους και την αλληλεπίδρασή της με την νουκλεοπορίνη RanBP2 (43),(44).

1.2.1 Πρωτεΐνες SUMO

Οι πρωτεΐνες SUMO ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών που μοιάζουν στην ουβικιτίνη (Ubiquitin-like proteins, Ubls). Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας μοιράζονται δομικές και εξελικτικές σχέσεις με την ουβικιτίνη. Χαρακτηρίζονται από κλασική αναδίπλωση της ουβικιτίνης (εικόνα 5A), οι οποία περιλαμβάνει μια δομή β-grasp fold. Η δομή αυτή αποτελείται από ένα τετραμερές β-πτυχωτό φύλλο, το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από μια κεντρική α-έλικα (εικόνα 5B) (45). Ακόμα οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας Ubl, όπως και η SUMO, περιέχουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης στο καρβοξυτελικό τους άκρο, το οποίο εμφανίζεται ύστερα από πρωτεόλυση και είναι απαραίτητο για τη σύζευξη της SUMO. Παρόλο τις δομικές αυτές ομοιότητες της SUMO με την ουβικιτίνη η ομολογία των γονιδίων τους είναι μόνο 18% (41). Αυτό που ξεχωρίζει τις SUMO πρωτεΐνες από τις υπόλοιπες της οικογένειας Ubl είναι το αμινοτελικό τους άκρο, 20 περίπου αμινοξέων, το οποίο έχει φανεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αλυσίδων SUMO (εικόνα 5B),(46).



Εικόνα 5: Τρισδιάστατο μοντέλο απεικόνισης της ουβικιτίνης (A) (UBQ) και της SUMO1 (B). A) Είναι διακριτό το β-φύλλο και η α-έλικα. Πηγή: PDB, κωδικός: 5DTC B) Διακρίνεται με μπλέ χρώμα το αμινοτελικό άκρο. Πηγή: SWISS-MODEL

Οι SUMO πρωτεΐνες είναι μόρια υψηλά συντηρημένα και έχουν βρεθεί σε πρωτόζωα, μετάρζωα, φυτά και μύκητες. Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί 4 ισομορφές SUMO πρωτεϊνών, οι SUMO1, SUMO2, SUMO3 και SUMO4 (47). Η SUMO1 διαθέτει 101 αμινοξέα με ένα εύκαμπτο αμινοτελικό άκρο ακολουθούμενο από την αναδίπλωση της ουβικιτίνης και ένα μικρό αμινοτελικό άκρο (48). Οι SUMO2 και SUMO3 αποτελούνται από 103 και 95 αμινοξέα αντίστοιχα και παρουσιάζουν ομοιότητα 97%. Λόγω αυτής της υψηλής

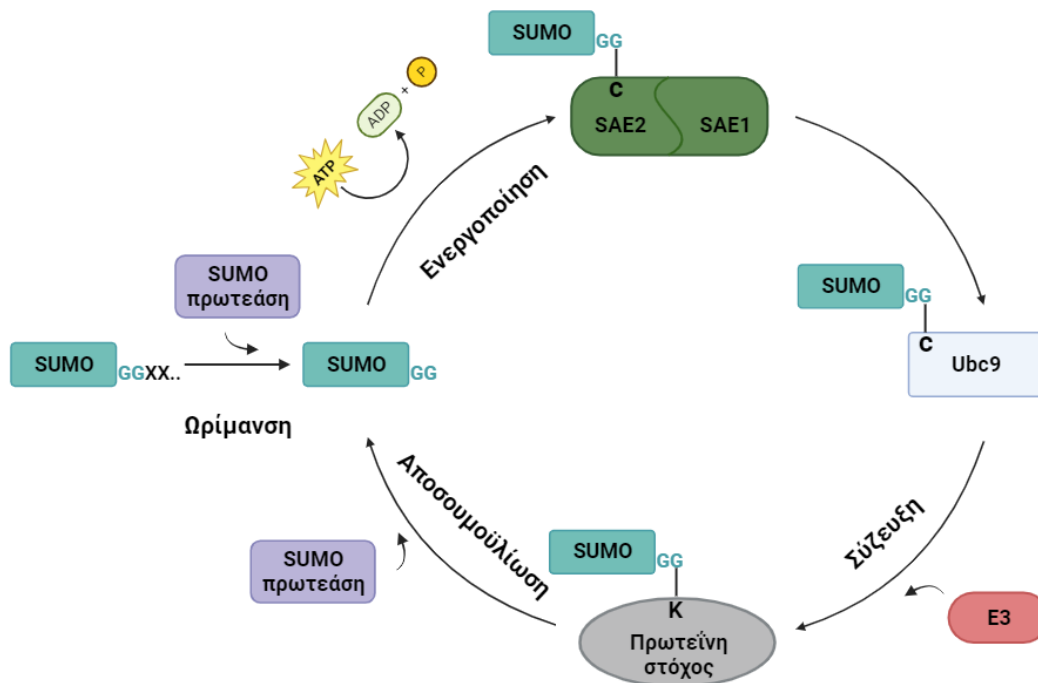
ομοιότητα που διαθέτουν αναφέρονται συχνά ως SUMO2/3. Επιπλέον οι SUMO1 και SUMO2 μοιράζονται ένα συντηρημένο κατάλοιπο λυσίνης 11, το οποίο μπορεί να σχηματίζει μία πολύ-SUMO αλυσίδα (49). Η SUMO1 διαφέρει αρκετά από τις SUMO2/3 αφού παρουσιάζει μόνο 46% ομοιότητα με αυτές (50). Η SUMO4 αδυνατεί να δώσει μία ώριμη μορφή κατάλληλη για σύζευξη σε πρωτεΐνη στόχο (51) για αυτό το λόγο έχει μελετηθεί λιγότερο. Έρευνα έχει δείξει την παρουσία και της ισομορφής SUMO5 στον άνθρωπο, η οποία υποστηρίζεται ότι εκφράζεται ιστοειδικά. (52).

Σημαντικό χαρακτηριστικό μεταξύ των SUMO ισομορφών είναι η εξειδίκευση σε υποστρώματα. Σε κάποιους στόχους των SUMO γίνεται σύζευξη μόνο από την SUMO1, σε άλλους μόνο από τις SUMO2/3 και σε άλλους από όλες τις ισομορφές (53). Ακόμα η συνολική συγκέντρωση των SUMO2/3 στο κύτταρο είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της SUMO1. Επίσης έχει φανεί πως υπάρχει διακριτή ρύθμιση της τροποποίησης SUMO-2/3 σε σύγκριση με την τροποποίηση SUMO-1 με την σουμοϋλίωση από SUMO-2/3 να αποτελεί στοιχείο της κυτταρικής απόκρισης στο περιβαλλοντικό στρες (54). Επιπρόσθετα οι SUMO 1-3 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ η SUMO4 εκφράζεται μόνο στους νεφρούς, τον σπλήνα και τους λεμφαδένες (51).

Οι SUMO ισομορφές εμφανίζουν διαφορές και στο ενδοκυτταρικό εντοπισμό. Ενώ οι SUMO2/3 έδειξαν πολύ παρόμοιες κατανομές σε όλο το πυρηνόπλασμα, η SUMO-1 κατανέμεται μοναδικά στην πυρηνική μεμβράνη και στον πυρήνα (55). Τα τελευταία χρόνια όμως έχει διατυπωθεί και ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (βλ. 1.2.4 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις κυτταρικές λειτουργίες και σε διάφορες ασθένειες).

1.2.2 Μηχανισμός σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών

Η σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών σε πρωτεΐνες-στόχους πραγματοποιείται από SUMO-ειδικά με τη χρήση ενέργειας από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (42). Αυτή η διαδικασία είναι παρόμοια με την ουβικιτινίωση και τα στάδιά της αναπαρίστανται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σουμοϋλίωσης. 1) Πρωτεολυτική ωρίμανση της SUMO πρωτεΐνης μέσω δράσης SUMO-ειδικής πρωτεάσης. 2) Εμφάνιση του μοτίβου γλυκίνης-γλυκίνης και 3) ενεργοποίηση από το ετεροδιμερές SAE1/SAE2. 4) Σύζευξη στη λυσίνη της πρωτεΐνης στόχο από την Ubc9 και μέσω της E3 λιγάσης. 5) Αντιστροφή της τροποποίησης από την SUMO-ειδική πρωτεάση. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

1.2.2.1 Ενζυμικό μονοπάτι σουμοϋλίωσης

Ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών

Η SUMO πρωτεΐνη έχει μέγεθος περίπου 11kDa και εκφράζεται ως ένα ανενεργό πρόδρομο μόριο στην αρχή. Για την ωρίμανση αυτού του πρόδρομου μορίου χρειάζεται τη δράση SUMO-ειδικών πρωτεασών της οικογένειας SENP (sentrin/SUMO-specific protease), οι οποίες θα κόψουν 4 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου και θα αποκαλύψουν ένα μοτίβο γλυκίνης-γλυκίνης. Μέσω αυτού του μοτίβου θα πραγματοποιηθεί η σύζευξη με κατάλοιπα λυσινών των πρωτεϊνών στόχων (56).

Ενεργοποίηση των SUMO πρωτεϊνών

Η ενεργοποίηση της πλέον «ώριμης» SUMO πρωτεΐνης πραγματοποιείται από το ενεργοποιητικό E1 ένζυμο, το οποίο είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από 2 υπομονάδες, τις SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1, Aos1) και SAE2 (SUMO-activating enzyme subunit 2, Uba2). Αρχικά το ετεροδιμερές καταναλώνει ενέργεια από

την υδρόλυση του ATP και σχηματίζει θειοεστερικό δεσμό μεταξύ του καταλοίπου κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της υπομονάδας SAE2/Uba2 και του καταλοίπου γλυκίνης του καρβοξυτελικού άκρου της SUMO πρωτεΐνης (57). Ύστερα πραγματοποιείται αλληλεπίδραση μεταξύ του E1 ενζύμου και του ενζύμου E2 Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη τελική σύζευξη, και η ενεργή SUMO πρωτεΐνη συνδέεται με θειοεστερικό δεσμό σε ένα νέο κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου E2 (58).

Σύζευξη SUMO πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες-στόχους

Σε αντίθεση με το μηχανισμό της ουβικιτίνης, στον οποίο συμμετέχουν πολλά E2 ένζυμα, για τη σουμοϋλίωση το μόνο γνωστό E2 ένζυμο που καταλύει τη σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών είναι η Ubc9. Η Ubc9 ολοκληρώνει τη διαδικασία της σουμοϋλίωσης με τη μεταφορά της SUMO από το κατάλοιπο κυστεΐνης 93 σε κατάλοιπο λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου σχηματίζοντας ένα ισοπεπτιδικό δεσμό (59). Παρόλο που πειράματα υποδεικνύουν ότι τα ένζυμα E1 και Ubc9 είναι ικανά να γίνουν για τη σουμοϋλίωση υποστρωμάτων, πολλές φορές είναι σημαντική η συμμετοχή μια E3 λιγάσης για την αποτελεσματική σύζευξη των SUMO πρωτεϊνών σε πρωτεΐνες-στόχους (60). Οι E3 λιγάσες αναγνωρίζουν υποστρώματα και προωθούν τη διαδικασία της σουμοϋλίωσης με 2 διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος μηχανισμός είναι μέσω σταθεροποίησης της επαφής μεταξύ του συμπλόκου SUMO-E2 με το υπόστρωμα και έπειτα σύνδεσης της SUMO πρωτεΐνης στο υπόστρωμα. Ο δεύτερος μηχανισμός πραγματοποιείται μέσω μείωσης της απόστασης μεταξύ του θειοεστερικού του συμπλόκου SUMO-E2 δεσμού με το κατάλοιπο λυσίνης του υποστρώματος (61).

Έχουν βρεθεί αρκετές πρωτεΐνες που έχουν δράση E3 SUMO λιγάσης και ανάλογα με τη δομή και το μηχανισμό τους κατηγοριοποιούνται σε 5 τύπους (62). Ο πρώτος τύπος και η μεγαλύτερη οικογένεια είναι οι Siz/PIAS RING E3 λιγάσες, όπως είναι οι PIAS πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα αυτές οι πρωτεΐνες οφείλουν τη δράση τους ως E3 λιγάσες στην συντηρημένη SP-RING επικράτεια που διαθέτουν, η οποία μπορεί να συνδεθεί με την Ubc9 (63). Ο δεύτερος τύπος είναι η υπεροικογένεια των TRIM (tripartite motif), οι οποίες διαθέτουν μια RING περιοχή και μια B-box περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα της σουμοϋλίωσης

(64). Άλλοι τύποι είναι οι E3 λιγάσες, που έχουν και δράση E3 λιγασών ουβικιτίνης, όπως οι TOPORS (topoisomerase I-binding RING finger protein), οι λιγάσες που περιέχουν SIM περιοχή (βλ. 1.2.2.2 Μοτίβα σουμοϋλίωσης), όπως η νουκλεοπορίνη RanBP2 και οι υπόλοιπες που δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, όπως η HDAC4 (62).

Αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών

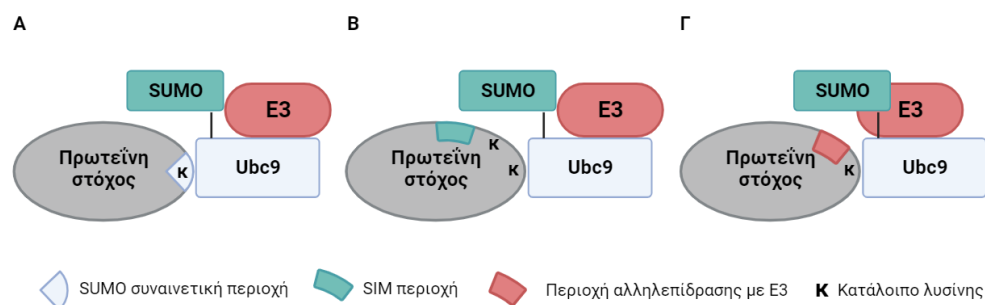
Το γεγονός ότι η σουμοϋλίωση είναι μια δυναμική και αντιστρεπτή διαδικασία οφείλεται στη δράση των SUMO ειδικών πρωτεασών ή αλλιώς SENPs, ο οποίες είναι υπεύθυνες και για την ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο υπάρχουν 6 SENPS (SEN1,2,3,5,6,7). Οι SENP1 και SENP2 έχουν μια προτίμηση για τις SUMO1 και SUMO2/3, ενώ οι SENP3 και SENP5 προτιμούν κυρίως τις SUMO2/3. Ακόμα οι SENP6 και SENP7 παρουσιάζουν προτίμηση στις SUMO2/3 και ειδικότερα στην αποσύζευξη SUMO2/3 αλυσίδων (56).

1.2.2.2 Μοτίβα σουμοϋλίωσης

Η Ubc9 έχει την ικανότητα να συνδέεται απευθείας σε πρωτεΐνες-στόχους αναγνωρίζοντας συγκεκριμένο το συναινετικό ψKxD/E μοτίβο (SUMO consensus motif, SCM). Σε αυτό το μοτίβο το ψ αντιστοιχεί σε ένα αλειφατικό αμινοξύ, το K αντιστοιχεί στο κατάλοιπο λυσίνης, στο οποίο συνδέεται η SUMO πρωτεΐνη, ακολουθούμενο από ένα οποιοδήποτε αμινοξύ και ένα ασπαραγινικό ή γλουταμινικό οξύ (47). Το αντίστροφο συναινετικό μοτίβο (E/D)XKψ έχει εντοπιστεί σε πρωτεΐνες που συνδέεται η SUMO2 (65). Επιπλέον έχουν βρεθεί εκτεταμένες παραλλαγές του συναινετικού μοτίβου που ενισχύουν τη σύνδεση με την Ubc9. Αυτή η ενίσχυση μπορεί να επιτευχθεί από την παρουσία μιας ακολουθίας αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων καθοδικά (προς το C-τελικό άκρο) της αλληλουχίας του κλασικού μοτίβου (Negatively charged amino-acid-Dependent Sumoylation Motif NDSM) (66), ή με την παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων ανοδικά (προς το N-τελικό άκρο) του μοτίβου (Hydrophobic Cluster Sumoylation Motif, HCSM) (65). Επιπλέον το ίδιο έχει παρατηρηθεί με τη φωσφορυλίωση σε προλίνη κοντά στο μοτίβο (Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif PDSM) (67). Παρόλο που έχει βρεθεί πως το 50% περίπου των πρωτεϊνών που σουμοϋλιώνονται διαθέτουν το τυπικό συναινετικό μοτίβο,

σε πολλές περιπτώσεις η λυσίνη του υποστρώματος που σουμοϋλιώνεται εντοπίζεται σε εναλλακτικά μοτίβα ή εκτός μοτίβων (68).

Πέρα από τα συναινετικά μοτίβα που βοηθούν στην επιλογή και την τροποποίηση των πρωτεϊνών υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που επιτρέπουν την επιλογή συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης για σύζευξη με SUMO πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες SUMO πέρα από την ομοιοπολική τους σύνδεση σε κατάλοιπα λυσίνης των υποστρωμάτων μπορούν να αλληλεπιδρούν και μη ομοιοπολικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες SIM (SUMO interaction motif) πρωτεϊνών. Σε πολλές περιπτώσεις για να πραγματοποιηθεί η σουμοϋλίωση είναι απαραίτητη η παρουσία SIM περιοχών κοντά σε κατάλοιπα λυσίνης με τη SUMO πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη-στόχο. Ακόμα πολλές φορές δεν είναι εύκολη η πρόσβαση του θειοεστερικού δεσμού του συμπλόκου Ubc9-SUMO σε κατάλοιπο λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου και μεσολαβεί η E3 λιγάση μέσω περιοχών του υποστρώματος που αναγνωρίζει (69).

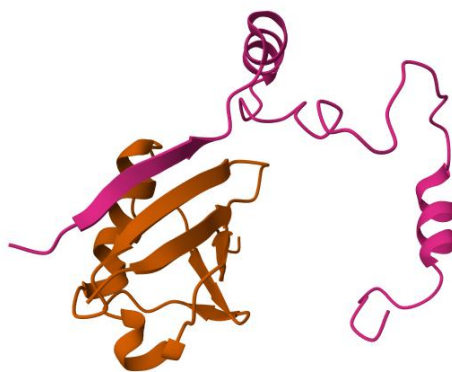


Εικόνα 7: Μηχανισμοί επιλογής του καταλοίπου λυσίνης. Α) Το κατάλοιπο λυσίνης βρίσκεται σε συναινετικό μοτίβο, αναγνωρίσιμο από την Ubc9, η οποία συνδέεται απευθείας. Β) Η SUMO πρωτεΐνη αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη-στόχο μέσω της περιοχής SIM επιστρατεύοντας το σύμπλοκο SUMO-Ubc9-E3. Γ) Αλληλεπίδραση της E3 με την πρωτεΐνη-στόχο καθοδηγεί το σύμπλοκο SUMO-Ubc9 για να γίνει η τροποποίηση σε συγκεκριμένο κατάλοιπο λυσίνης. (Δημιουργήθηκε με το *bioRender.com*)

Όπως προαναφέρθηκε η SUMO πρωτεΐνης μπορεί να αλληλεπιδράσει μη ομοιοπολικά με τις λεγόμενες SIM (SUMO interaction motif) περιοχές. Τυπικά αυτές οι περιοχές συγκροτούνται από 4 υδρόφοβα κατάλοιπα που πλαισιώνονται από όξινα κατάλοιπα ή από κατάλοιπα που μπορούν να φωσφορυλιωθούν, αν και οι διάφορες παραλλαγές των μοτίβων περιέχουν όξινο ή φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο στην δεύτερη ή στην τρίτη θέση (70). Οι

συνδυασμοί της αλληλουχίας των αμινοξέων που προκύπτουν είναι ψψψψ, ψχψψ ή ψψχψ, για τα οποία το ψ αντιστοιχεί σε κατάλοιπα βαλίνης, ισολευκίνης και λευκίνης και το χ αντιστοιχεί σε κατάλοιπα απαρτικού, γλουταμινικού οξέος και σερίνης (71). Γενικά αρκετές πλατφόρμες βιοπληροφορικής ανάλυσης έχουν αναπτυχθεί για την εύρεση πιθανών περιοχών SIM, όπως οι GPS-SUMO (72) και JASSA (73). Πιο συγκεκριμένα ο Beauclair και οι συνεργάτες κατά την δημιουργία του προγράμματος JASSA όρισαν 5 τύπους SIM μοτίβων, τα οποία είναι ΨΨχΨ (τύπος 1), ΨχΨΨ (τύπος 2), ΨΨΨΨ (τύπος 3), χΨΨΨ (τύπος 4) και ΨαΨαΨ (τύπος 5) (όπου Ψ = V, I ή L, α = D ή E και χ = οποιαδήποτε αμινοξέα) (73).

Οι SIM περιοχές είναι πιθανώς αποδιαταγμένες στην ελεύθερη μορφή, αλλά υιοθετούν δομή β-πτυχωτής αλυσίδας κατά τη σύνδεση τους, μέσω δεσμών υδρογόνου, στην υδρόφοβη αύλακα που σχηματίζεται ανάμεσα από την α-έλικα και του δεύτερου β-φύλλου των SUMO πρωτεϊνών (εικόνα 8). Αυτή η β-πτυχωτή αλυσίδα μπορεί να έχει παράλληλο ή αντιπαράλληλο προσανατολισμό από το β-φύλλο της SUMO πρωτεΐνης. Ειδικότερα ο προσανατολισμός αυτός εξαρτάται από τη θέση των αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων σε σχέση με τον υδροφοβικό πυρήνα του μοτίβου, δηλαδή αμινοτελικά (παράλληλο) ή καρβοξυτελικά (αντιπαράλληλο) (70) (71).



Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση SUMO1-RanBP2 μέσω SIM περιχής. Η SUMO1 παρουσιάζεται με πορτοκαλί χρώμα και η RanBP2 παρουσιάζεται με ρόζ χρώμα. Διακρίνεται η β-πτυχωτή αλυσίδα της SIM περιχής της RanBP2 ανάμεσα από την α-έλικα και το δεύτερο β-φύλλο της SUMO1. Πηγή: PDB, κωδικός:1Z5S

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ανθρώπινες SUMO1 και SUMO2/3 πρωτεΐνες εμφανίζουν παραλλαγές στα κατάλοιπα που έρχονται σε επαφή με τις SIMs, καθώς επηρεάζεται έτσι η συγγένεια μεταξύ SUMO πρωτεΐνης και SIM

περιοχής. Επίσης αυτές οι παραλλαγές είναι κυρίως υπεύθυνες για την εξειδίκευση των ισομορφών SUMO σε ορισμένες αλληλεπιδράσεις (71). Παράδειγμα αποτελεί η SIM περιοχή της DPP9, οι οποία συνδέεται επιλεκτικά στη SUMO1 και όχι στη SUMO2 (74). Επιπλέον έρευνα έχει δείξει πως πολλές SIM περιοχές έχουν διαφορετικό βαθμό αγχιστείας για την SUMO1 και τη SUMO2 (75).

Οι περιοχές SIM παίζουν ρόλο στο μονοπάτι της σουμοϋλίωσης. Αρχικά έχει φανεί η σημαντικότητα τους στην δράση των E3 λιγασών. Η πρώτη παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στο σύμπλοκο RanBP2-Ubc9-RanGAP1-SUMO, στο οποίο η SIM περιοχή της RanBP2 συνδέεται στη SUMO (εικόνα 9) (76). Επίσης πρόσφατα αποδείχθηκε πως πολλές E3 λιγασές της οικογένειας PIAS, όπως οι PIAS1, PIAS2 και PIAS3, διαθέτουν μια λειτουργική SIM περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο (77). Ακόμα σημαντικές είναι οι περιοχές SIM και για τις πρωτεΐνες-στόχους της σουμοϋλίωσης. Για παράδειγμα οι πολλές περιοχές SIM της πρωτεΐνης PML φαίνεται να παίζουν ρόλο στην συσσώρευση των SUMO στα πυρηνικά σωμάτια (78). Τέλος μέλη της οικογένειας των SENPs διαθέτουν SIM περιοχές, οι οποίες εμπλέκονται με διάφορους τρόπους στη δράση των ισοπεπτιδασών (79).

Σε βιολογικές λειτουργίες οι αλληλεπιδράσεις που προσφέρουν οι SIM περιοχές μπορούν να ρυθμίσουν σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε συνθήκες στρες. Επιπλέον συμμετέχουν σε λειτουργίες, όπως η διόρθωση του DNA, ενώ παράλληλα παίζουν κυρίαρχους ρόλους στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών (80).

1.2.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις κυτταρικές λειτουργίες και σε διάφορες ασθένειες

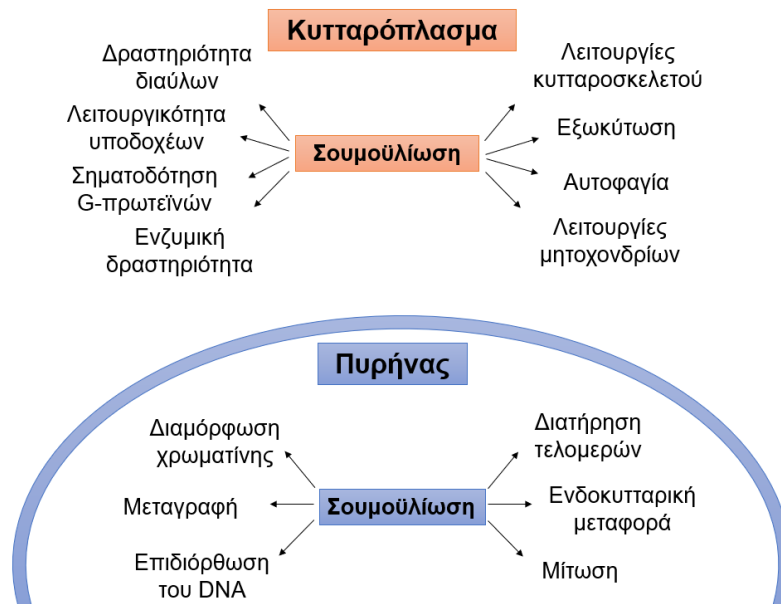
Πρωτεΐνες-στόχοι της σουμοϋλίωσης έχει φανεί πως συμβάλουν σε όλες τις πτυχές της κυτταρικής οργάνωσης και λειτουργίας. Λόγω της αυξημένης παρουσίας της πρωτεΐνης SUMO στον πυρήνα, έχουν μελετηθεί οι ρόλοι της κυρίως στο πλαίσιο των διεργασιών του πυρήνα όπως η διαμόρφωση της χρωματίνης, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση του DNA, η διατήρηση των τελομερών, η ενδοκυτταρική μεταφορά και η μίτωση (εικόνα 9) (69).

Η σουμοϋλίωση έχει συσχετιστεί με την επιγενετική ρύθμιση και την εφαρμογή κληρονομήσιμων αλλαγών στη χρωματίνη. Συγκεκριμένα έχει προταθεί από τους επιστήμονες πως η σουμοϋλίωση της H4 ιστόνης οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή επιτρέποντας τη στρατολόγηση των αποακετυλάσων HDAC και της ετεροχρωματίνης 1 (HP1) (81).

Επιπλέον έχει βρεθεί πως η σουμοϋλίωση μπορεί να ρυθμίζει τη βλαστικότητα και την ταυτότητα των κυττάρων. Παράδειγμα αποτελεί η σουμοϋλίωση που υπόκεινται οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού (c-MYC, KLF4, SOX2, OCT4) των σωματικών κυττάρων σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) (82).

Από τις πιο χαρακτηριστικές περιπτώσεις σουμοϋλίωσης πρωτεΐνης-στόχου, η οποία έχει σημαντικό ρόλο στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό είναι της RanGAP1. Η τροποποίησή της οδηγεί στον εντοπισμό της στους πυρηνικούς πόρους και στην αλληλεπίδραση με την νουκλεοπορίνη RanBP2 (76).

Σουμοϋλίωση πραγματοποιείται και σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος επηρεάζοντας την δραστηριότητα των διαύλων, την λειτουργικότητα των υποδοχέων, τη σηματοδότηση G-πρωτεϊνών, την ενζυμική δραστηριότητα, τις λειτουργίες του κυτταροσκελετού, την εξωκύτωση, την αυτοφαγία και τις λειτουργίες των μιτοχονδρίων (εικόνα 9) (83).

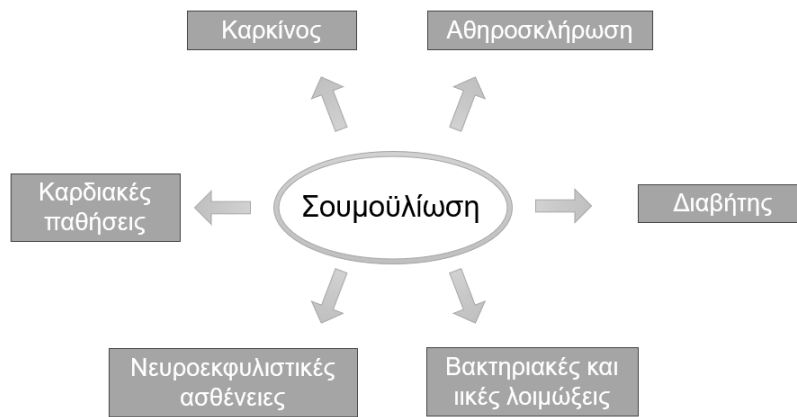


Εικόνα 9: Η συμμετοχή της σουμοϋλίωσης στις κυτταρικές λειτουργίες.

Πέρα από τη σημασία της σουμυλίωσης σε φυσιολογικές συνθήκες η συγκεκριμένη τροποποίηση φαίνεται πως παίζει ρόλο και στην εξέλιξη ασθενειών όπως ο καρκίνος. Η έκφραση των E1, E2 και E3 λιγασών της σουμυλίωσης έχει αποδειχθεί πως ενισχύεται σε πολλούς τύπους καρκίνου (84). Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασης Ubc9 (E2 λιγάση) έχουν ανιχνευθεί αυξημένα σε αδενοκαρκίνωμα και κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών, ενώ της PIAS3 (E3 λιγάση) έχει βρεθεί να ενισχύεται σε καρκίνο των πνευμόνων, του μαστού και του παχέος εντέρου (85). Ομοίως αυξημένα επίπεδα του ετεροδιμερούς SAE1/2 (E1 λιγάση) έχουν ανιχνευθεί σε καρκίνο του ήπατος (hepatocellular carcinoma, HCC) (86). Ακόμα οι SENPs (SUMO πρωτεάσες) μπορούν να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του ήπατος (87).

Οι καρδιακές παθήσεις είναι μια κατηγορία ασθενειών που έχει συσχετιστεί με τη σουμυλίωση. Συγκεκριμένα ανακαλύφθηκε πως η έκφραση της ενδογενούς SUMO1 μειώνεται στην καρδιακή ανεπάρκεια, το οποίο οδηγεί σε μειωμένη σουμυλιωμένη SERCA2a, τη βασική ATPάση για την επαναπρόσληψη ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο (88).

Ακόμα μια κατηγορία ασθενειών που έχει μελετηθεί ο ρόλος της σουμυλίωσης είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Στη νόσο του Huntington η σουμυλίωση σε μια παθολογική μορφή της υπεύθυνης για την ασθένεια πρωτεΐνης (Huntington) οδηγεί σε ενίσχυση του νευροεκφυλισμού σε ποντικούς-μοντέλα (89). Στην νόσο του Parkinson έχει βρεθεί πως η σουμυλιωμένη DJ-1 συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ρύθμιση του οξειδωτικού στρες (90). Ακόμα στη νόσο του Alzheimer, η οποία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση β-αμυλοειδών πλακών και την παρουσία εμπλοκών νευροϊνιδίων αποτελούμενα από tau πρωτεΐνη δείχθηκε πως η πρωτεΐνη tau μπορεί να σουμυλιώνεται και να ουβικιτινώνεται. Έρευνα έδειξε πως η αναστολή της οδού αποικοδόμησης του πρωτεασώματος αυξάνει την ουβικιτινίωση του tau και μειώνει την σουμυλίωσή του, υποδηλώνοντας ότι η SUMO και η ουβικιτίνη ενδέχεται να ανταγωνίζονται για τη ρύθμιση της σταθερότητας του tau (92). Επιπρόσθετα η σουμυλίωση έχει μελετηθεί και σε άλλες ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης και σε διάφορες βακτηριακές και ιικές λοιμώξεις (84),(47).



Εικόνα 10: Ασθένειες που εμπλέκεται η σουμοϋλίωση

1.2.4 Η σουμοϋλίωση σε καταστάσεις στρες

Το μονοπάτι της σουμοϋλίωσης έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε καταστάσεις στρες, όπως είναι το οξειδωτικό, το θερμικό στρες και η ιική προσβολή. Αρχικά το οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια ανισορροπία μεταξύ της υπερβολικής παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και της περιορισμένης ικανότητας αποτοξίνωσης αυτών. Οι αλλαγές στα επίπεδα σουμοϋλίωσης σε αυτή τη κατάσταση καθορίζεται από τη διάρκεια και την ένταση του στρες. Παρουσιάζεται αναστολή της σουμοϋλίωσης σε ήπιο οξειδωτικό στρες (συγκέντρωση $H_2O_2 < 1mM$) (92), ενώ ο αντίθετο συμβαίνει όσο αυξάνεται η ένταση (συγκέντρωση $H_2O_2 100 mM$) (93). Σε κατάσταση θερμικού στρες παρουσιάζεται μια συσσώρευση τροποποιήσεων με SUMO2/3 σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, τα οποία είναι κυρίως πυρηνικές πρωτεΐνες (94). Μια κατάσταση στρες προκαλείται και από την προσβολή παθογόνων όπως είναι οι ιοί. Κεντρικό ρόλο στην απόκριση σε ιική προσβολή παίζει η ιντερφερόνη, η οποία οδηγεί στην αύξηση των πυρηνικών σωματίων PML (promyelocytic leukemia protein). Η λειτουργία της PML στην αντιική απόκριση ρυθμίζεται από τη σουμοϋλίωσή της (95).

Η σουμοϋλίωση έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και σε καταστάσεις ισχαιμία, με την πιο κοινή την εγκεφαλική ισχαιμία. Συγκεκριμένα σε κατάσταση ισχαιμία παρεμποδίζεται η φυσιολογική ροή του αίματος στον ιστό, με αποτέλεσμα την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου σε αυτό. Σε παροδική εγκεφαλική ισχαιμία έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια δραματική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σουμοϋλίωση, με πιο έντονες των SUMO2/3.

Αυτή η αύξηση παρατηρείται αμέσως μετά την επαναιμάτωση, όταν τα κύτταρα προσπαθούν να ανακάμψουν από το σοβαρό μεταβολικό στρες που προκλήθηκε από την ισχαιμία. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει πως πιθανότατα η σουμοϋλίωση να είναι μια ενδογενής νευροπροστατευτική απόκριση σε στρες ικανή να προστατεύει τους νευρώνες από βλάβες που προκαλούνται από ισχαιμία (96). Παρόλα αυτά υπάρχουν και έρευνες που δεν δείχνουν αλλαγή στη σύζευξη των SUMO2/3. Επομένως είναι πιθανό η τροποποίηση μέσω σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες υποξίας να είναι αποτέλεσμα κυτταρικής βλάβης και όχι προσαρμοστικός μηχανισμός (97).

1.2.5 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης σε συνθήκες υποξίας

Η υποξία είναι μία κατάσταση που έχει επίσης συσχετιστεί με αλλαγές στα επίπεδα σουμοϋλίωσης των πρωτεϊνών. Η σημασία της σουμοϋλίωσης έχει αποδειχθεί ξεκάθαρα στον εγκέφαλο κατά την υποξία (98). Πιο συγκεκριμένα σε πειράματα αποσιώπησης των SUMO1 και SUMO2/3 σε πρωτογενείς νευρώνες σε συνθήκες στέρησης οξυγόνου, παρατηρήθηκε επαγωγή κυτταρικού θανάτου (99). Έτσι υποδηλώνεται πως η σουμοϋλίωση πρόκειται για ένα μηχανισμό ανοχής απέναντι στην υποξία. Επίσης όπως προαναφέρθηκε η σουμοϋλίωση τροποποιεί ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της υποξίας (βλ. 1.1.3, εικόνα 4).

Παρόλη την έρευνα γύρω από τη σουμοϋλίωση και το ρόλο της σε πρωτεΐνες απόκρισης στη υποξία, δεν είναι ακόμα απολύτως γνωστό εάν η υποξία επηρεάζει γενικά το μηχανισμό σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών ή μόνο συγκεκριμένες πρωτεΐνες με άμεσο αντίκτυπο την απόκριση στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Με σκοπό τη διευκρίνιση της σχέσης μεταξύ της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία και της σουμοϋλίωσης πραγματοποιήθηκε έρευνα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από την ερευνητική ομάδα της κ. Χαχάμης όπου ερευνήθηκαν οι αλλαγές του προτύπου σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών κατά την υποξία σε καρκινικά κύτταρα HeLa (100). Ειδικότερα η έρευνα αυτή είχε ως στόχο την απόκτηση γνώσης σχετικά με διαφορές των συνολικών SUMO1-πρωτεωμάτων και SUMO2/3-πρωτεωμάτων σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας. Για το σκοπό αυτό

πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών και ανάλυση με ποσοτική πρωτεομική. Από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκε μία ομάδα πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα σουμοϋλίωσης αλλάζουν σε συνθήκες υποξίας χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασής τους (100). Σε αυτήν την ομάδα ανήκει και η πρωτεΐνη EXOSC10, μία εξωριβονουκλεάση, και μέρος του RNA εξωσώματος της οποίας η σουμοϋλίωση μειώνεται δραματικά κατά την υποξία. Η διερεύνηση της σουμοϋλίωσης και του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής σε συνθήκες υποξίας είναι αντικείμενο μελέτης στο Εργαστήριο και η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος αυτής.

1.3 Η πρωτεΐνη Exosome component 10 (Exosc10)

1.3.1 Γενικά

Κατά τη διαίρεση και τη διαφοροποίηση των ευκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιείται σύνθεση, επεξεργασία και αποικοδόμηση διάφορων τύπων RNA με συντονισμένο τρόπο. Η 3'-5' εξωριβονουκλεάση Rrp6 (ribosomal RNA-processing protein 6) ή όπως ονομάζεται στα θηλαστικά EXOSC10 (Exosome component 10) συμμετέχει σε αυτές τις διαδικασίες ως καταλυτική υπομονάδα του πυρηνικού RNA εξωσώματος (101).

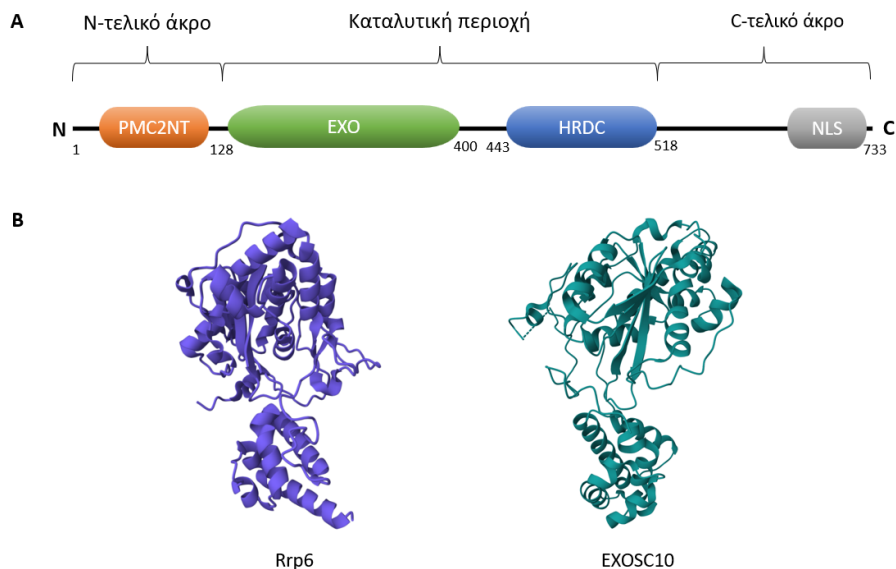
Το RNA εξώσωμα και συνεπώς και η EXOSC10 έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό στη ζύμη *S. Cerevisiae*, καθώς σε αυτή ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά. Στον άνθρωπο το RNA εξώσωμα ήταν γνωστό ως σύμπλοκο PM/Scl (polymyositis-scleroderma) λόγω των αυτοαντισωμάτων anti-PM/Scl, που εντοπίζονταν σε ασθενείς με μυοσίτιδα, σκληρόδερμα ή και με τα δύο. Ο χαρακτηρισμός του RNA εξωσώματος στη ζύμη αποτέλεσε αρωγός στην ενίσχυση της γνώσης για το σύμπλοκο PM/Scl και για το ανθρώπινο RNA εξώσωμα (102).

Το γονίδιο της πρωτεΐνης EXOSC10 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1p36.22) και έχει μέγεθος 33.252bp. Διαθέτει 24 εξόνια και από αυτό προκύπτουν 2 ισομορφές. Η πρώτη ισομορφή, η οποία είναι η κυριότερη, αποτελείται από 885 αμινοξέα και η δεύτερη ισομορφή αποτελείται από 860 αμινοξέα.

Η καταλυτική υπομονάδα Rrp6 (EXOSC10) έχει δράση 3' → 5' εξωριβονουκλεάσης και αποτελείται από τις εξής επικράτειες (εικόνα 11):

- Μια N-τελική περιοχή PMC2NT (Polycystin 2 N-terminal domain), η οποία αλληλεπιδρά με το RNA εξώσωμα και με συμπαραγοντές του,
- Μια καταλυτική περιοχή EXO, η οποία της προσδίδει την δράση εξωριβονουκλεάσης και είναι χαρακτηριστική για όλα τα μέλη της οικογένειας DEDD νουκλεασών στις οποίες ανήκει και η EXOSC10 (103),
- Μία περιοχή HRDC (helicase and RNase D C-terminal), της οποίας η δράση δεν είναι πλήρως γνωστή όμως έχει φανεί πως συνδέεται με την EXO περιοχή και ρυθμίζει τη δράση της (104),
- Μια περιοχή NLS (Nuclear localization signal) για τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

Δεν υπάρχουν δομικά δεδομένα που να δείχνουν άμεσες συνδέσεις μεταξύ της ανθρώπινης EXOSC10 και τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος, όμως έχει προταθεί πως εντοπίζεται σε παρόμοια θέση με αυτή της Rrp6 στη ζύμη (105). Η πρωτεΐνη EXOSC10 εντοπίζεται κυρίως στους πυρηνίσκους και στον πυρήνα των κυττάρων, το οποίο συνάδει με την λειτουργία της στην επεξεργασία snoRNA και rRNA. Παράλληλα μικρά επίπεδά της ανιχνεύονται και στο κυτταρόπλασμα (106).

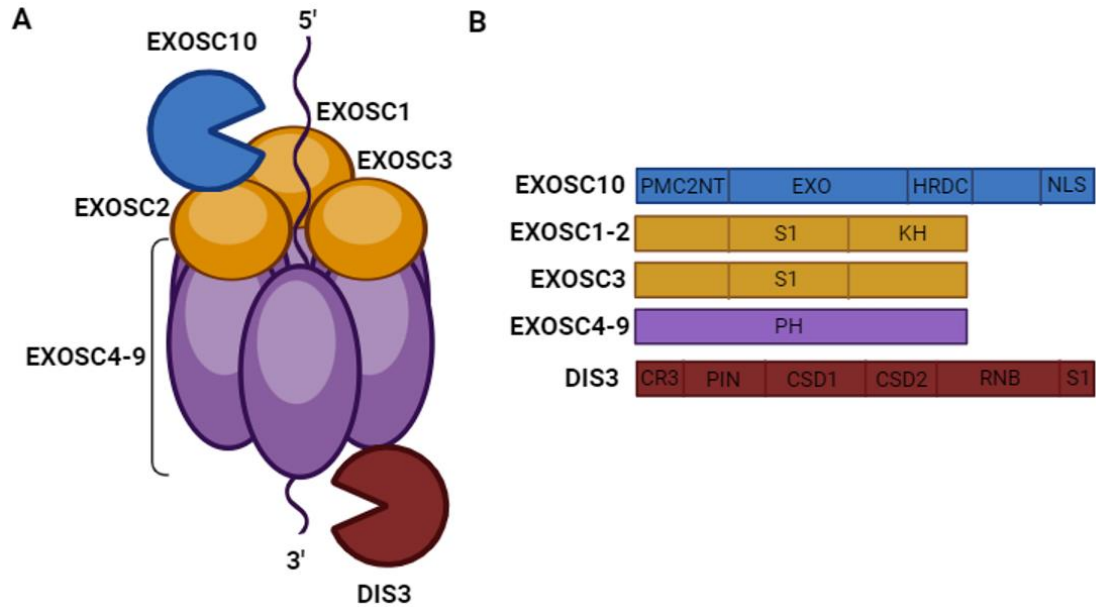


Εικόνα 11: Επικράτειες της Rrp6 και δομές των Rrp6 και EXOSC10. Α) Σχηματική απεικόνιση των επικρατειών της Rrp6. Β) Δομή της Rrp6 (μπλέ, PDB: 2HBM) της ζύμης και δομή της EXOSC10 του ανθρώπου (πράσινο, PDB: 3SAG)

1.3.2 Ο ρόλος της EXOSC10 στο RNA εξώσωμα

Το RNA εξώσωμα είναι ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο συντηρημένο σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι λειτουργίες του είναι η επεξεργασία και η αποικοδόμηση διαφόρων τύπων RNA σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα στον πυρήνα επεξεργάζεται μη κωδικοποιητικά και ελαττωματικά RNAs. Στο κυτταρόπλασμα συμβάλει στο κύκλο ζωής του mRNA (mRNA turnover) και στον ποιοτικό έλεγχο των RNAs, ενώ συμβάλει και στην ωρίμανση rRNAs, snoRNAs και snRNAs. (107).

Όσο αφορά τη δομή, το RNA εξώσωμα αποτελείται τόσο από δομικές όσο και από καταλυτικές υπομονάδες. Ειδικότερα διαθέτει ένα καταλυτικά ανενεργό σύμπλοκο, τον κεντρικό πυρήνα (EXO9), αποτελούμενο από 9 δομικές πρωτεΐνες. Ο κεντρικός πυρήνας έχει σχήμα βαρελιού και χωρίζεται σε 2 σύμπλοκα. Το ένα σύμπλοκο περιλαμβάνει 3 πρωτεΐνες (EXOSC1-3 ή Rrp4, Rrp40 και Csl4), οι οποίες έχουν περιοχές που συνδέονται στο RNA, τις S1 και KH, και με τη μεταξύ τους σύνδεση σχηματίζουν μια δομή «καλύπτρας» (ή αλλιώς καπάκι) πάνω από το δεύτερο σύμπλοκο. Η δεύτερη δομή είναι δαχτυλίου αποτελούμενο από 6 υπομονάδες (EXOSC4-9 ή Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 και Mtr3), οι οποίες διαθέτουν περιοχές ομόλογες της βακτηριακής RNAσης PH και συνδέονται μεταξύ τους με 3 ετεροδιμερικούς δεσμούς. Αυτές οι 2 δομές δημιουργούν ένα κανάλι, από το οποίο μπορούν να περάσουν τα διάφορα RNA υποστρώματα και από τη πλευρά της καλύπτρας είναι ο πόρος εισόδου και από την πλευρά του βαρελιού που δεν συνδέεται με την καλύπτρα είναι ο πόρος εξόδου (εικόνα 12). Κοντά σε αυτούς τους πόρους είναι τοποθετημένες οι 2 καταλυτικές υπομονάδες του RNA εξωσώματος. Συγκεκριμένα η EXOSC10 κοντά στον πόρο εισόδου και η Dis3 κοντά στον πόρο εξόδου. Ο ρόλος τους είναι να αποικοδομούν ή να κόβουν το 3' άκρο των RNA υποστρωμάτων (εικόνα 13) (108).

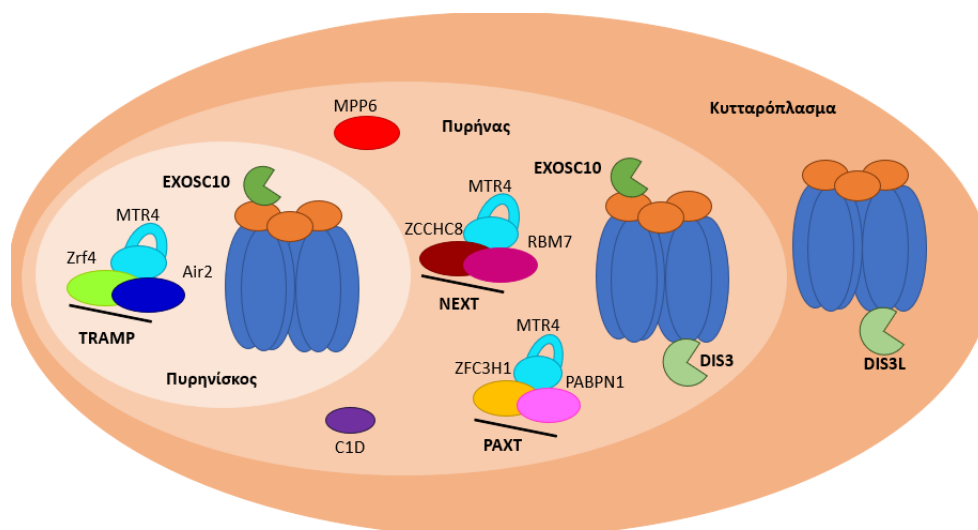


Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του RNA εξωσώματος. A) Το σύμπλοκο εξωσώματος και αναπαράσταση εισόδου του RNA υποστρώματος. B) Οι λειτουργικές περιοχές των υπομονάδων: EXO, RNB, περιοχή δραστηριότητας εξωριβονουκλεάσης; PIN, Pilt N terminal, περιοχή δραστηριότητας ενδοριβονουκλεάσης; HRDC, helicase and RNase D C-terminal domain, παίζει ρόλο στην σύνδεση με το RNA; PMC2NT, περιοχή στο N-τελικό άκρο των εξωριβονουκλεασών με περιοχές HRDC; NLS, σήμα εντοπισμού στον πυρήνα; S1, περιοχή σύνδεσης με το RNA; KH, περιοχή σύνδεσης με το RNA (K-homology); PH, περιοχή με ομολογία με την βακτηριακή RNase PH; CR3, πρωτεϊνικό μοτίβο που περιέχει 3 κατάλοιπα Cys; CSD, cold-shock RNA-binding domain. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Στο ευκαρυωτικό κύτταρο υπάρχουν 3 ισομορφές της πρωτεΐνης DIS3. Οι ισομορφές DIS3 και DIS3L1 συνδέονται στο RNA εξώσωμα και εντοπίζονται στο πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Η τρίτη ισομορφή είναι η DIS3L2, η οποία δεν συνδέεται στο RNA εξώσωμα και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Επίσης καμία από τις ισομορφές δεν εντοπίζεται στους πυρηνίσκους (109).

Υπάρχουν 2 κύριες μορφές του RNA εξωσώματος στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η μία μορφή, η οποία εντοπίζεται στο πυρήνα, διαθέτει το κεντρικό της πυρήνα και τις 2 καταλυτικές της υπομονάδες. Η άλλη μορφή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και πέρα από τον κεντρικό της πυρήνα διαθέτει και τη μία μόνο καταλυτική της υπομονάδα, την DIS3 (συγκεκριμένα την ισομορφή DIS3L1). Στα ανθρώπινα κύτταρα έχει παρατηρηθεί και μία τρίτη μορφή, η οποία εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και όπως στην περίπτωση της δεύτερης

διαθέτει μία μόνο καταλυτική υπομονάδα, όμως αυτή τη φορά είναι η EXOSC10. Ακόμα η κάθε μορφή, αφού βρίσκεται σε διαφορετικό διαμέρισμα του κυττάρου, αλληλεπιδρά και με διαφορετικούς συμπαραγόντες προσδίδοντάς του εξειδίκευση για το υπόστρωμα (εικόνα 14) (106).



Εικόνα 14: Οι 3 μορφές του RNA εξωσώματος. Όλες οι μορφές διαθέτουν τον κεντρικό τους πυρήνα, αλλά διαφέρουν στις καταλυτικές τους υπομονάδες. Σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα αλληλεπιδρούν με μία πληθώρα διαφορετικών συμπαραγόντων.

1.3.2.1 Οι συμπαραγόντες του RNA εξωσώματος και η αλληλεπίδραση τους με την EXOSC10

MTR4

Ένας από τους κύριους συμπαραγόντες που προσδίδει αυξημένη εξειδίκευση στο RNA εξώσωμα είναι η πρωτεΐνη MTR4. Πρόκειται για μια RNA ελικάση, η οποία αποτελεί την γέφυρα μεταξύ του RNA υποστρώματος και της αποικοδόμησής του. Έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει το RNA είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες (110). Η MTR4 διαθέτει τις εξής περιοχές (εικόνα 15):

- Δύο περιοχές RecA1 και RecA2 (RecA-like domains), οι οποίες περιέχουν κατάλοιπα σχετιζόμενα με σύνδεση σε RNA και νουκλεοτίδια και με υδρόλυση,
- Δύο περιοχές WH (winged helix), οι οποίες εγκαθιδρύουν αλληλεπιδράσεις με DNA και άλλες πρωτεΐνες,
- Μια περιοχή Arch,

- Μια περιοχή HB (helical bundle), η οποία αλληλεπιδρά με RNA υποστρώματα επηρεάζοντας την προτίμηση της MTR4 ως προς αυτά.



Εικόνα 15: Οι λειτουργικές περιοχές της MTR4

Η MTR4 συμμετέχει σε πολλά σύμπλοκα και μέσα από αυτά ενισχύεται η δράση της στο RNA εξώσωμα. Παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο TRAMP (Ttf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation) το οποίο έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει ελλαττωματικά RNAs σε πυρηνίσκους και πυρηνόπλσμα. Συγκεκριμένα το σύμπλοκο Ttf4p/Air2p αρχικά πολυαδενυλιώνει το 3' άκρο των ελλαττωματικών RNA και έπειτα μέσω της σύνδεσης του με την MTR4 επιτρέπει στο εξώσωμα να ξεκινήσει την αποικοδόμηση τους (111). Ένα ακόμα σημαντικό σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχει η MTR4 είναι το PAXT (poly(A) tail exosome targeting), που εντοπίζεται στο πυρηνόπλσμα. Σχηματίζεται το διμερές MTR4-ZFC3H1, το οποίο αποτελεί το πυρήνα του PAXT, μέσω της δράσης της PABP1 και βοηθάει στην στόχευση των μακρύτερων και πολυαδενυλιωμένων πυρηνικών RNA από τι εξώσωμα (112). Ακόμα η MTR4 αποτελεί μέρος και του συμπλόκου NEXT (nuclear exosome-targeting). Αυτό το σύμπλοκο έχει δράση 3' → 5' ελικάσης και διαταράσσει τα δίκλινα RNA, ενισχύοντας την αποδοτικότητα της MTR4 (113).

MPP6

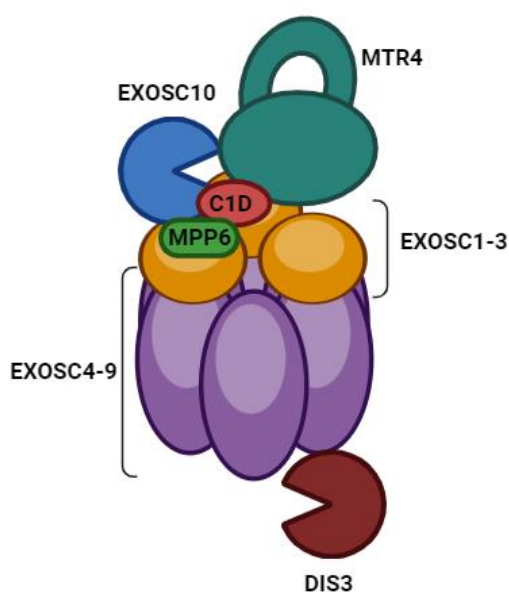
Η πρωτεΐνη MPP6 έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με το ανθρώπινο RNA εξώσωμα και πρόκειται για μια πρωτεΐνη που δεν έχει αντίστοιχη στη ζύμη. Επίσης έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την MTR4 και την EXOSC10, ενώ παράλληλα έχει φανεί πως συμμετέχει στην ωρίμανση του 5.8S rRNA. Τέλος η MPP6 είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο RNA, με ιδιαίτερη προτίμηση σε αλληλουχίες πλούσιες σε πυριμιδίνη (114).

C1D

Η C1D έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη σύνδεσης σε RNA αλλά και DNA, καθώς έχει φανεί πως συμμετέχει στη διόρθωση δίκλωνων ρήξεων του DNA

(115). Είναι από τις λίγες πρωτεΐνες που έχει φανεί ότι συνδέεται άμεσα με την EXOSC10 (116). Επιπλέον φαίνεται πως συμμετέχει και αυτή μαζί με την MPP6 στην ωρίμανση του 5.8S rRNA και πιστεύεται πως χρησιμοποιεί την EXOSC10 για να εισχωρήσει στον πυρήνα. Τέλος φάνηκε σε πειράματα κατακρήμνισης ότι οι C1D και MPP6 συγκατακρημνίζονται με την EXOSC10 (117).

1.3.3 Αλληλεπιδράσεις της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος
Γενικότερα παρόλες τις προσπάθειες κρυσταλλογράφησης της EXOSC10 στο μέσα στο σύμπλοκο του RNA εξωσώματος ακόμα δεν υπάρχουν δομικά δεδομένα που να δείχνουν ξεκάθαρα την αλληλεπίδραση τη EXOSC10 με πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος. Μέχρι στιγμής έχει κρυσταλλογραφηθεί ένα πολύ μικρό κομμάτι της EXOSC10 (11 αμινοξέα περίπου), από τα οποία φαίνεται αλληλεπίδραση με τις EXOSC6 και EXOSC8. Επίσης έχει αποδειχθεί αλληλεπίδραση της C1D με την περιοχή PMC2NT της EXOSC10 και πιστεύεται πως αυτή η σύνδεση δημιουργεί μια θέση για την πρόσδεση της MTR4. Επιπλέον φάνηκε πως η MTR4 συνδέεται στο εξώσωμα και συγκεκριμένα στην EXOSC2 μέσω της MPP6 (105). Αυτή η θέση σύνδεσης φαίνεται να επικαλύπτεται με την θέση σύνδεσης της Rrp6 στη ζύμη (118). Επομένως υποθέτοντας ότι η ανθρώπινη EXOSC10 συνδέεται με παρόμοιο τρόπο με την Rrp6 προκύπτει το συμπέρασμα πως η EXOSC10 και η MTR4 ανταγωνίζονται για αλληλεπίδραση με τον κεντρικό πυρήνα του εξωσώματος.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του RNA εξωσώματος και των συμπαράγοντων του.

1.3.4 Ρόλοι της EXOSC10 εκτός του RNA εξωσώματος

Πλέον έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες που αποδεικνύουν ότι η EXOSC10 έχει την ικανότητα να λειτουργεί με τρόπο ανεξάρτητο από τον κεντρικό πυρήνα του RNA εξωσώματος. Αρχική απόδειξη για αυτή την ανεξάρτητη λειτουργία της EXOSC10 είναι το γεγονός πως ο κεντρικός πυρήνας ξεκινάει την επεξεργασία του 3' άκρου του 5.8S rRNA και πολλών snRNAs και snoRNAs και σε δεύτερο βήμα δρα η EXOSC10 (119). Όντως φάνηκε πως σε έλλειψη της καρβοξυτελικής επικράτειας της EXOSC10 διαταράσσεται η ικανότητα σύνδεσης με το RNA εξώσωμα, ενώ δεν επηρεάστηκε η επεξεργασία του 3' άκρου αυτών των RNAs. Παράλληλα η EXOSC10 σε αυτή την περίπτωση δεν έχασε της δράση εξωριβονουκλεάσης όπως φαίνεται από το γεγονός ότι πραγματοποιεί επεξεργασία 3'-άκρου του 5.8S rRNA και του snoRNA (120). Επιπλέον έχει φανεί πως η EXOSC10 μπορεί να δράσει ανεξάρτητα και από τον κεντρικό πυρήνα του RNA εξωσώματος. Συγκεκριμένα σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε πως η EXOSC10 επάγει την επιβίωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της θερμικού στρες μέσω της οδού CWI (cell wall integrity). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της EXOSC10 δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά υποδηλώνει ότι συνεργάζεται με τη πρωτεΐνη Mpk1p και τον παράγοντα Paf1p και δεν απαιτείται η καταλυτική του δράση (121).

2. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Τελευταία δεδομένα του Εργαστηρίου μας (Filippopoulou et al, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546038>, CMLS 2023 under review) δείχνουν πως η εξαρτώμενη από την υποξία μείωση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 επηρεάζει την έκφραση mRNAs, τα οποία κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικά για την απόκριση στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου.

Προκειμένου να εξηγηθούν οι αλλαγές στα επίπεδα mRNA εξαιτίας της οξυγονοεξαρτώμενης αποσουμοϋλίωσης της EXOSC10 ξεκίνησε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μια προκαταρκτική μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος οι οποίες κατ' επέκταση είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση RNA υποστρωμάτων.

Στόχος του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των δομικών (EXOSC2, EXOSC3), καταλυτικών υπομονάδων (DIS3) και συμπαραγόντων (MTR4, MPP6, C1D) του RNA εξωσώματος στην υποξία.

Ο στόχος του δεύτερου μέρους είναι η διερεύνηση της ύπαρξης πιθανών περιοχών SIM στις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος μέσω βιοπληροφορικών εργαλείων και η μελέτη της επίδρασης της σουμοϋλίωσης στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με την EXOSC10 με πειράματα κατακρήμνισης.

3.Υλικά

3.1 Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η σειρά HeLa. Η καρκινική σειρά HeLa αποτελείται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.

3.2 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

Για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa έγινε χρήση του εξής θρεπτικού μέσου: Το πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), το οποίο είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών κυττάρων θηλαστικών. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (4500 mg/L), L-γλουταμίνη (4 mM) και πυροσταφυλικό νατρίου (110 mg/L). Επίσης περιέχει ερυθρό της φαινόλης (15 mg/L), το οποίο είναι ένας δείκτης pH. Για τη χρήση του είναι απαραίτητη η προσθήκη 10% απενεργοποιημένου FBS (Fetal Bovine Serum) και αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (1000U/l). Το DMEM και το FBS είναι της εταιρείας Gibco και τα αντιβιοτικά είναι της εταιρείας Biowest.

3.3 Αντισώματα

α) Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και στη παρούσα μελέτη αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western: αναφέρονται με τη σειρά τα ονόματα των αντισωμάτων, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθαν, οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο (WB: Western Blot, IF: Immunofluorescence), οι τύποι των αντισωμάτων και οι εταιρείες από τις οποίες έχουν προέλευση.

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση για WB	Αραίωση για IF	Τύπος	Εταιρείες
Anti-HIF1α	Ποντικός	1/100	1/100	Μονοκλωνικό	BD Biosciences
Anti-HIF1α	Κουνέλι	1/100	1/100	Μονοκλωνικό	(Lyberopoulou et al, 2017)
Anti-tubulin	Ποντικός	1/10000	-	Μονοκλωνικό	Cell Signaling
Anti-EXOSC10	Ποντικός	1/1000	-	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
Anti-EXOSC2	Ποντικός	1/1000	1/500	Μονοκλωνικό	Proteintech

<i>Anti-EXOSC3</i>	Κουνέλι	1/1000	1/500	Πολυκλωνικό	Proteintech
<i>Anti-DIS3</i>	Κουνέλι	1/1000	1/500	Πολυκλωνικό	Proteintech
<i>Anti-MTR4</i>	Κουνέλι	1/1000	1/500	Πολυκλωνικό	Proteintech
<i>Anti-MPP6</i>	Κουνέλι	1/1000	1/500	Πολυκλωνικό	Proteintech
<i>Anti-C1D</i>	Κουνέλι	1/1000	1/1000	Πολυκλωνικό	Proteintech
<i>Anti-GST</i>	Κουνέλι	1/1000	-	Πολυκλωνικό	Ευγενική χορηγία F. Melchior Lab
<i>Anti-Flag</i>	Ποντικός	1/100	-	Μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich

β) Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Τα συγκεκριμένα αντισώματα αναγνωρίζουν τις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG των αντισωμάτων του ποντικού ή του κουνελιού (Πίνακας 1). Επίσης αυτά τα αντισώματα είναι σημασμένα με ένα φθορόχρωμα (Alexa 488: πράσινο, Alexa 594: κόκκινο).

Πίνακας 2: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη τεχνική της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού: αναφέρονται με τη σειρά τα ονόματα των αντισωμάτων, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθαν, οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, οι τύποι των αντισωμάτων και οι εταιρείες από τις οποίες έχουν προέλευση.

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Εταιρεία
<i>Anti-rabbit Alexa 488</i>	Κουνέλι	1/1000	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
<i>Anti-mouse Alexa 488</i>	Ποντικός	1/1000	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
<i>Anti-rabbit Alexa 594</i>	Κουνέλι	1/1000	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
<i>Anti-mouse Alexa 594</i>	Ποντικός	1/1000	Μονοκλωνικό	Santa Cruz

γ) Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Τα συγκεκριμένα αντισώματα αναγνωρίζουν τις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG των αντισωμάτων του ποντικού ή του κουνελιού (Πίνακας 1). Επίσης αυτά τα αντισώματα φέρουν συζευγμένο το ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase).

Πίνακας 3: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western: αναφέρονται με τη σειρά τα ονόματα των αντισωμάτων, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθαν, οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, οι τύποι των αντισωμάτων και οι εταιρείες από τις οποίες έχουν προέλευση.

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Εταιρεία
<i>Anti-mouse</i>	Ποντικός	1/5000	Μονοκλωνικό	Cell Signaling
<i>Anti-rabbit</i>	Κουνέλι	1/5000	Μονοκλωνικό	Cell Signaling

3.4 Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σε καθαρή μορφή

Για τη μέθοδο της *in vitro* σουμοϋλίωση ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν μορφές της GST-EXOSC10 πρωτεΐνης οι οποίες είχαν απομονωθεί από προηγούμενα πειράματα της υποψήφιας διδάκτωρος κ. Χ. Φιλιππούλου σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο (122). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σε καθαρή μορφή τα ένζυμα του μηχανισμού σουμοϋλίωσης, οι οποίες αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στη τεχνική της *in vitro* σουμοϋλίωσης: Αναφέρονται με τη σειρά το όνομα των πρωτεϊνών και η δράση τους.

Πρωτεΐνες	Δράση	Συγκεντρώσεις
<i>Sumo 1</i>	Μετα-μεταφραστική τροποποίηση	9μM
<i>UBA2</i>	E1 λιγάση	500 nM
<i>UBC9</i>	E2 λιγάση	70 nM
<i>GST-EXOSC10 WT</i>	3' – 5' εξωριβονουκλεάση	0,25 μM
<i>GST-EXOSC10 K583</i>	3' – 5' εξωριβονουκλεάση (αποσουμοϋλιωμένη μορφή)	0,25 μM
<i>RanBP2</i>	E3 λιγάση	100 nM

3.5 Χημικά

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρίες Sigma-Aldrich και AppliChem.

3.6 Σφαιρίδια

Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ήταν τα εξής:

- Σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A: Φέρουν την πρωτεΐνη A, η οποία είναι μια γενετικά τροποποιημένη πρωτεΐνη που περιέχει

πέντε περιοχές δέσμευσης IgG της φυσικής πρωτεΐνης A και επιτρέπει τη σύνδεση με ανοσοσφαιρίνες (IgG) αντισωμάτων κουνελιού.

Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα συγκατακρήμνισης ήταν τα εξής:

- Σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης: Φέρουν ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία επιτρέπει τη σύνδεση της S-τρασνφεράσης της γλουταθειόνης (GST).

3.7 Διαλύματα

3.7.1) Για τις καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν:

A) Ορός εμβρύου βοός (FBS): Ενισχύει την ανάπτυξη των κυττάρων στη καλλιέργεια καθώς έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αυξητικούς παράγοντες, ενώ παράλληλα έχει χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων και συστατικών που αναστέλλουν την ανάπτυξη. Επίσης διαθέτει χαμηλά επίπεδα ενδοτοξίνης (≤ 10 EU/ml) και αιμοσφαιρίνης (≤ 25 mg/dl). Για να χρησιμοποιηθεί απαιτείται η απενεργοποίηση του με επώαση στους 56° C για 30 λεπτά. Ο συγκεκριμένος ορός που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα πτυχιακή είναι της εταιρείας Gibco.

B) Διάλυμα τρυψίνης 0,2%: Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται για την αποκόλληση προσκολλημένων κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες. Συγκεκριμένα διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυ-τελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης των πρωτεϊνών που προσκολλώνται στο πλαστικό του πιάτου επιτρέποντας την αποκόλληση κατά τη συλλογή των κυττάρων. Παρέχεται από την εταιρεία Gibco.

Γ) Διάλυμα PBS 10x: Περιέχει την εξής σύσταση για όγκο 500 ml:

- 40g NaCl
- 1g KCl
- 7,098g Na_2HPO_4
- 1,2g KH_2PO_4

Το συγκεκριμένο διάλυμα για να χρησιμοποιηθεί αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 1x και αποστειρώνεται. Χρησιμοποιείται κυρίως για πλύσεις των κυττάρων.

3.7.2 Για τη δημιουργία ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος

A) Για τη λύση των κυττάρων και ανάλυση τους μέσω ανοσοαποτύπωσης Western χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που αναφέρεται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 5: Διάλυμα RIPA :

Διάλυμα RIPA	Συγκέντρωση
SDS	0,1% v/v
EDTA	5 mM
EGTA	5mM
NEM	20mM
PI	10μl σε 1000μl
NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (1/3)	20 mM
NaCl	150mM
Triton X-100	1% v/v
Δεοξυχολικό νάτριο	0,5% v/w

B) Για τη λύση των κυττάρων και τη χρησιμοποίησή τους σε πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down) χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που αναφέρεται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6):

Πίνακας 6: Διάλυμα Λύσης:

Διάλυμα Λύσης	Συγκέντρωση
HEPES (pH 7.8)	50mM
KCl	60mM
MgOAc	5mM
NP-40	0,05%
NaF	1mM
NEM	20mM
Γλυκερόλη	5%
Triton X-100	0.5%
Αναστολείς πρωτεασών(mix PI)	10μl σε 1000μl

3.7.3 Για τα πειράματα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν:

A) Διάλυμα φορμαλδεΐδης περιεκτικότητας 3,7% v/v σε PBS 1x: Χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στις καλυπτρίδες. Συγκεκριμένα η φορμαλδεΐδη οδηγεί στο σχηματισμό δεσμών μεταξύ των

πρωτεϊνών των κυττάρων, χωρίς να καταστραφεί η δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να διατηρείται η αντιγονικότητά τους.

Β) Διάλυμα Triton x-100 περιεκτικότητας 0,2% v/v σε PBS 1x: Χρησιμοποιείται για τη διαπερατοποίηση των μεμβρανών των κυττάρων με τη βοήθεια του απορρυπαντικού Triton X-100, το οποίο δεσμεύεται στα λιπίδια της μεμβράνης.

Γ) Διάλυμα PBS 1x: Χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των κυττάρων

Δ) Διάλυμα PBS-tween 0,1%: Περιέχει PBS 1x και tween σε περιεκτικότητα 0,1% v/v, το οποίο είναι ένα μη ιονικό απορρυπαντικό.

Ε) Διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) περιεκτικότητας 3% v/w σε PBS-tween20 0,1%: Χρησιμοποιείται για το μπλοκάρισμα των κυττάρων. Συγκεκριμένα η BSA λόγω της μεγάλης ποσότητάς της συνδέεται σε μη ειδικές θέσεις στα κύτταρα. Επίσης το διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί πρέπει να φιλτραρισθεί. Η BSA προέρχεται από την εταιρεία Sigma-Aldrich σε μορφή σκόνης.

Ζ) Διάλυμα BSA περιεκτικότητας 1% v/w σε PBS-tween20 0,1%: Σε αυτό το διάλυμα αραιώνονται τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.

Η) Διάλυμα διατήρησης Mowiol, το οποίο περιέχει τη χρωστική DAPI: Χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση των καλυπτριδών στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Το DAPI είναι η χρωστική που θα χρωματίσει την χρωματίνη με σκοπό την απεικόνιση των πυρήνων των κυττάρων. Το διάλυμα προέρχεται από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

3.7.4 Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν:

Α) Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Separating Buffer): Περιέχει 0,375 M Tris-HCl με pH 8,8, το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα, 2 mM EDTA, το οποίο είναι χειλικός παράγοντας και με τη δέσμευση ιόντων απενεργοποιεί τις εξαρτώμενες από Mg πρωτεάσες και 0,1% v/v SDS. Χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του πηκτώματος διαχωρισμού.

Β) Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (Stacking Buffer): Περιέχει 0,125 M Tris-HCl με pH 6,8, το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα, 2 mM EDTA και 0,1% v/v SDS. Χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης.

Γ) Διάλυμα ακρυλαμιδίου: Χρησιμοποιείται ως συστατικό για τα πηκτώματα διαχωρισμού και επιστοίβαξης.

Δ) Διάλυμα APS (υπερθειικό αμμώνιο) περιεκτικότητας 10% v/v: Χρησιμοποιείται ως συστατικό για τα πηκτώματα διαχωρισμού και επιστοίβαξης.

Ε) Διάλυμα TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο) περιεκτικότητας 25% v/v: Χρησιμοποιείται ως συστατικό για τα πηκτώματα διαχωρισμού και επιστοίβαξης.

Ζ) Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer): Περιέχει 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA και 0,1% SDS.

Η) Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer): Περιέχει 125mM Tris-Borate με pH 8,5, 0,2% SDS και 0,5 mM DTT

Θ) Διάλυμα χρωστικής Ponceau s 2%: Περιέχει 2% Ponceau, 30% τριχλωροοξικό οξύ και 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ. Χρησιμοποιείται για να το βάψιμο και οπτικοποίηση των θέσεων των πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.

Ι) Διάλυμα γάλακτος περιεκτικότητας 5% v/w (Blocking buffer): Χρησιμοποιείται για το μπλοκάρισμα των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν την ικανότητα να συνδέονται σε μη ειδικές θέσεις στα κύτταρα. Το διάλυμα περιέχει 5% v/w σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος διαλυμένη σε διάλυμα PBS-tween20 0,1% ή TBS-tween20 0,1%.

Κ) Pre stained marker (P7719S): Είναι ένας μάρτυρας μεγέθους πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση. Προέρχεται από την εταιρεία New England Biolabs

Λ) Immobilion Crescendo Western HRP Substrate: Υπόστρωμα της HRP που βρίσκεται συζευγμένη στο δεύτερο αντίσωμα. Προέρχεται από την εταιρεία Millipore.

Μ) Διάλυμα λουμινόλης: Στα 10 ml λουμινόλης (1,25 mM λουμινόλης σε διαλύτη 0,1 M Tris-HCl pH 8,3) προστίθενται 100 μl κουμαρικού οξέος (τελική συγκέντρωση 6,8 mM) και 30 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου (τελική συγκέντρωση 0,1% v/v). Χρησιμοποιείται για τον ίδιο σκοπό με το παραπάνω.

Ν) Διάλυμα SDS Laemmli (2x): Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x για το σχηματισμό υδρόφοβων δεσμών με τις πρωτεΐνες και την αποδιάταξή τους. Περιέχει 50mM TRIS με pH 6,8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης και 10% γλυκερόλη.

Ξ) Διάλυμα DTT 1M: Προστίθεται σε 2x διάλυμα SDS σε τελική συγκέντρωση 100mM για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα δείγματα

Ο) Αντιδραστήριο Bradford: Περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες.

3.7.5 Για τα πειράματα της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν:

Α) Διάλυμα NP-40 (0,3% v/v): Πρόκειται για μη ιονικό απορρυπαντικό το οποίο θα οδηγήσει σε διάσπαση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών.

Β) Διάλυμα λύσης: Περιέχει 10mM TRIS-HCl pH 7,5, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 20mM NEM (N-Ethylmaleimide), το οποίο είναι αναστολέας των SUMO-ισοπεπτιδασών και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (10μl στο 1 ml).

Γ) Διάλυμα RIPA: Περιέχει 50mM TRIS-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA (χειλικός παράγοντας), 0,5% v/v Triton x100, 20mM NEM, μείγμα αναστολέων πρωτεασών (10μl στο 1ml) και αναστολείς φωσφατασών (Sigma-Aldrich).

Δ) Διάλυμα πλύσεων: Περιέχει 50mM TRIS-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 10mM NEM

Ε) Διάλυμα SDS Laemmli (1x) με DTT (100mM): Χρησιμοποιείται για πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα δείγματα

3.7.6 Για τα πειράματα συγκατακρήμνισης (in vitro pull down) χρησιμοποιήθηκε:

Α) Διάλυμα SAB: Περιέχει 20mM HEPES pH 7,3, 110mM οξικό κάλιο, 2mM οξικό μαγνήσιο, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0,05% v/v tween και 0,1mM AEBSF.

3.7.7 Για τα πειράματα της in vitro σουμυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν:

Α) Διάλυμα SAB: Περιέχει 20mM HEPES pH 7,3, 110mM οξικό κάλιο, 2mM οξικό μαγνήσιο, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0,05% v/v tween, 0,2 mg/ml BSA, μείγμα αναστολέων πρωτεασών (PI mix και AEBSF).

4. Μέθοδοι

4.1 Κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HeLa

Όλες οι διαδικασίες που αφορούν τις κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θαλάμους νηματικής ροής με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών.

4.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Κύτταρα που βρίσκονταν αποθηκευμένα σε σωλήνες κρυοσυντήρησης (cryovials) σε δεξαμενή υγρού αζώτου μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C για 2 με 3 λεπτά και έπειτα προστέθηκε σταδιακά με αργό ρυθμό 10 ml θρεπτικού μέσου (DMEM). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1000 στροφές και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε επαναιώρηση του ιζήματος σε 8ml θρεπτικού μέσου, μεταφορά σε πλαστικό πιάτο καλλιέργειας διαμέτρου 100mm και επώαση των κυττάρων στους 37° C και σε 5% CO₂.

4.1.2 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέσα στον επωαστικό κλίβανο (37° C ,5% CO₂) έως ότου να φτάσουν σε πληρότητα 100%. Σε αυτό το σημείο ξεκινά η διαδικασία τρυψινοποίησης και ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Πρώτα απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα πλένονται με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x, για την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου. Έπειτα προστίθεται διάλυμα τρυψίνης με το οποίο έγινε επώαση για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο για την αποκόλληση των κυττάρων από το πιάτο. Ύστερα γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου στα κύτταρα, όγκου τετραπλάσιου τουλάχιστον του όγκου της τρυψίνης, καθώς ο ορός που εμπεριέχεται στο θρεπτικό υλικό οδηγεί σε απενεργοποίηση της τρυψίνης. Ακολουθεί δημιουργία νέας καλλιέργειας σε 6cm και 10cm πιάτα με κατάλληλη αραίωση του αιωρήματος των κυττάρων (1/5 ή 1/10).

4.1.3 Επώαση σε συνθήκες υποξίας

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

4.1.4 Καταμέτρηση κυττάρων

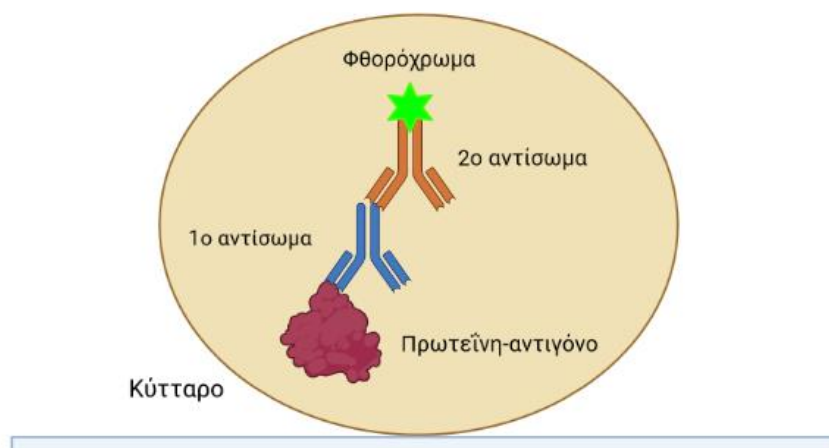
Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση της πλάκα Neubauer. Αυτή η πλάκα διαθέτει τέσσερα τετράγωνα πλαίσια στα οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Με τη χρήση μικροσκοπίου είναι δυνατή η μέτρηση των κυττάρων του αιωρήματος που προστέθηκαν στη πλάκα. Γίνεται μέτρηση των κυττάρων που βρίσκονται μέσα στα τέσσερα τετράγωνα πλαίσια. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων/ml δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$[(\text{Αριθμός κυττάρων } 1^{\text{ου}} + 2^{\text{ου}} + 3^{\text{ου}} + 4^{\text{ου}} \text{ τετραγώνου}) / 4] * 10^4 = \text{αριθμός κυττάρων στο 1ml.}$$

4.2 Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών

4.2.1 Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού

Αρχή της μεθόδου: Η μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και την παρατήρηση του κυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με φθοριοχρώματα για την ανίχνευση αντιγόνων ή άλλων αντισωμάτων (εικόνα 17). Τα φθοριοχρώματα είναι φθορίζουσες χημικές ενώσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα να εκπέμπουν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ύστερα από διέγερση με φως μικρότερου μήκους κύματος. Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι τα εξής: Πρώτα τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες σε μονοστοιβάδες. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλδεΰδη, διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών με απορρυπαντικό και προσθήκη αντισώματος, ειδικού για την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ύστερα προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες του πρώτου αντισώματος και επιπλέον φέρει φθοριόχρωμα. Ακολουθεί σταθεροποίηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες και πραγματοποιείται παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 17: Απεικόνιση της αρχής της μεθόδου της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

Για την επίστρωση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες και για τον χειρισμό των καλυπτρίδων στα διάφορα στάδια του ανοσοφθορισμού έγινε χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Τα κύτταρα HeLa προσκολλήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες. Την επόμενη μέρα (ποσοστό επικάλυψης της καλυπτρίδας περίπου στο 70%) ακολούθησε πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS 1x. Οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε 12 well πιάτα και επώαστηκαν με διάλυμα φορμαλδεΐδης 3,7% σε PBS 1x για πέντε λεπτά, για τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δυο πλύσεις με διάλυμα PBS 1x και ακολούθησε επώαση με διάλυμα 0,2% Triton x -100 σε PBS 1x για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS 1x και επώαση με διάλυμα 3% BSA σε PBS-tween 0,1% για μία ώρα. Έπειτα έγινε επώαση με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο ήταν αραιωμένο σε διάλυμα 1% BSA σε PBS-tween 0,1%. Η επώαση εξαρτάται από το είδος του αντισώματος και έγινε από 2 ώρες μέχρι ολονύκτια στους 4° C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με διάλυμα 1% BSA σε PBS-tween 0,1% (φιλτραρισμένο). Έπειτα οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό έναντι των IgG του πρώτου αντισώματος και φέρει το φθοριόχρωμα Alexa (488 ή 594) και αραιώθηκε σε διάλυμα 1% BSA σε PBS-tween 0,1% (φιλτραρισμένο). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις

με διάλυμα PBS 1x και μία πλύση με αποστειρωμένο νερό. Οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με 10 μl διαλύματος διατήρησης MOWIOL στο οποίο είχε προστεθεί η χρωστική DAPI. Οι καλυπτρίδες σφραγίστηκαν με βερνίκι νυχιών. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2 και η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Zen. Η επεξεργασία των εικόνων του ανοσοφθορισμού έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.

4.2.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Αρχή της μεθόδου: Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική κατά την οποία ένα μόριο με φορτίο μπορεί να μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Με βάση αυτό το φαινόμενο και τη χρήση ενός πηκτώματος, το οποίο λειτουργεί ως μοριακό κόσκινο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη μάζα τους και το φορτίο τους. Συγκεκριμένα μόρια που είναι μικρά συγκριτικά με τους πόρους στο πηγμα (πολυακρυλαμίδιο) κινούνται εύκολα μέσω του πηγματος, ενώ όσο πιο μεγάλα είναι τα μόρια σε σχέση με τους πόρους τόσο πιο δύσκολη είναι η μετακίνησή τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μία λεπτή κάθετη πλάκα από πολυακρυλαμίδιο και η κατεύθυνση της ροής είναι από την κάθοδο (αρνητικό φορτίο) στην άνοδο (θετικό φορτίο). Με την παρουσία του απορρυπαντικού SDS όλες οι πρωτεΐνες είναι αποδιαταγμένες και φορτισμένες αρνητικά. Επομένως κατά την ηλεκτροφόρηση όλες οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο (πυθμένα της πηκτής) και εν τέλει πιο κάτω στη πηκτή να είναι οι πιο μικρής μάζας πρωτεΐνες και πιο πάνω να είναι οι πιο μεγάλης μάζας πρωτεΐνες (εικόνα 18). Η διαχωριστική ικανότητα της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου, τα οποία με τη βοήθεια των πολυμεριστικών παραγόντων APS (υπερθειικό αμμώνιο) και TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο) σχηματίζουν το πηκτωμα σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία

4.2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα πιάτα καλλιέργειας. Έπειτα ακολούθησαν πλύσεις των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x. Ύστερα απομακρύνθηκε εντελώς το διάλυμα PBS 1x και προστέθηκε διάλυμα RIPA (βλ. Υλικά 3.7.2). Ακολούθησε απόξυση, λύση των κυττάρων από το πιάτο και μεταφορά τους σε erpendorf. Τα κύτταρα έμειναν στον πάγο για 30 λεπτά, ενώ έγινε ήπια ανακίνηση κάθε 5 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο αποτέλεσε το κυτταρικό εκχύλισμα (εικόνα 18, βημά 1). Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford.

4.2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου: Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 να συνδέεται στις πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες. Συγκεκριμένα η μέθοδος βασίζεται στη σύνδεση βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών με τη χρωστική. Αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος του διαλύματος από μπλε σε καφέ. Με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά από τα κυτταρικά εκχυλίσματα λήφθηκαν 5 μl. Σε αυτά τα 5 μl έγινε προσθήκη 95 μl δις απιονισμένο νερό (ddH₂O) και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Χρειάστηκαν 2 διαλύματα, τα οποία λειτούργησαν ως τυφλά και περιείχαν 5 μl διαλύματος RIPA, 95 μl δις απιονισμένο νερό και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 595 nm και υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA) και της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας (O.D.). Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε προσθήκη στα κυτταρικά εκχυλίσματα διαλύματος SDS Laemmli (2x) και 0,1 mM DTT σε τελική συγκέντρωση 1x. Ακολούθησε επώαση στους 95° C για 5 λεπτά. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

4.2.2.3 Παρασκευή πηκτής και ηλεκτροφόρηση

Αρχικά έγινε συναρμολόγηση της συσκευής, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του πηκτώματος ακρυλαμιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από 2 επιμέρους πηκτώματα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel). Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελεί το $\frac{3}{4}$ του συνολικού πηκτώματος και το πήκτωμα επιστοίβαξης αποτελεί το $\frac{1}{4}$. Η σύσταση του κάθε πηκτώματος αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7). Πρώτα έγινε η παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού, το οποίο αφέθηκε να πολυμεριστεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα παρασκευάστηκε το πήκτωμα επιστοίβαξης. Ακολούθησε η δημιουργία θέσεων εισαγωγής των δειγμάτων με τη βοήθεια ειδικού καλουπιού (χτένας) και αναμονή για 20 με 30 λεπτά για να πήξει το διάλυμα. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστέθηκε στη συσκευή το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (βλ. Υλικά 3.7.4) και φορτώθηκαν τα δείγματα στις θέσεις εισαγωγής με πιπέτα Hamilton. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση ρεύματος (90 V αρχικά και 120 V αφού πέρασαν οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα διαχωρισμού) (εικόνα 18, βημά 2).

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

Συστατικά	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα επιστοίβαξης
Ακρυλαμίδιο	7%, 15% και Gradient 4-20%	4%
APS	0,04% v/v	0,0625% v/v
TEMED	0,1% v/v	0,1% v/v
Ρυθμιστικό διάλυμα	Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης
ddH ₂ O	ddH ₂ O	ddH ₂ O

4.2.3 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου: Η ηλεκτρομεταφορά είναι μια μέθοδος κατά την οποία διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται από μία πηκτή (πολυακρυλαμιδίου) σε ένα φύλλο πολυμερούς (π.χ. μεμβράνη νιτροκυτταρίνης). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα μεταφοράς αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών (λόγω συμπλοκοποίησης με το SDS) προς το θετικό πόλο της συσκευής

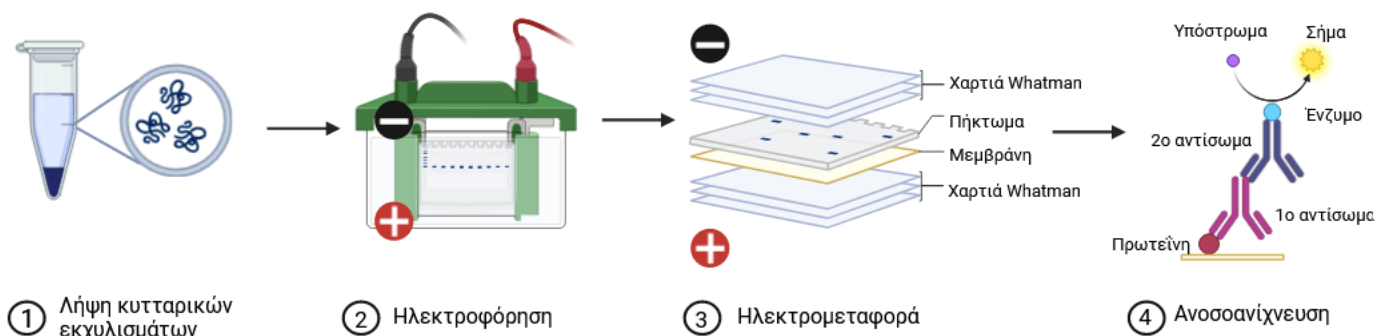
ηλεκτροφόρησης κατά την παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Κατά τη μεταφορά τους, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες παγιδεύονται και μονιμοποιούνται στο φύλλο του πολυμερούς.

Πειραματική διαδικασία

Το πήκτωμα μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.γ) επωάστηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x (βλ. Υλικά 3.7.4) για 10 λεπτά. Στο ίδιο διάλυμα επωάστηκαν για 10 λεπτά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τα 6 χαρτιά Whatman. Όλα τα παραπάνω υλικά επιστρώθηκαν στη συσκευή reqlab® Semi-Dry Blotter (VWR) με την εξής σειρά: 3 χαρτιά Whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και 3 χαρτιά Whatman (εικόνα 18, βήμα 3). Κατά την επίστρωση πρέπει να αποκλειστούν οι φυσαλίδες μεταξύ των υλικών, ώστε να υπάρχει καλή ροή του ρεύματος. Αφού συνδεθεί η συσκευή με το τροφοδοτικό, η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε σε σταθερή ένταση ρεύματος (20 mA) για 75 λεπτά. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς και για την επιβεβαίωση της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, αυτή βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau s. Η μεμβράνη ξεβάφτηκε για λίγα λεπτά με απιονισμένο νερό και έπειτα φωτογραφήθηκε με τη χρήση του Imager Uvitec Cambridge.

4.2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αρχή της μεθόδου: Η ανοσοαποτύπωση κατά Western επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών, η οποίες είναι καθηλωμένες πάνω σε ένα φύλλο πολυμερούς. Οι καθηλωμένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται από ειδικά αντισώματα για αυτές. Ύστερα γίνεται χρήση δεύτερου αντισώματος, το οποίο θα ανιχνεύσει το πρώτο αντίσωμα, άρα και το σύμπλοκο πρώτου αντισώματος με πρωτεΐνη-στόχο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, το οποίο παράγει έγχρωμο προϊόν. Με τη προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου και την έκθεση του φύλλου σε φως, εκπέμπεται φθορισμός στο σημείο που βρίσκεται η πρωτεΐνη-στόχος (εικόνα 18, βήμα 4).



Εικόνα 18: Απεικόνιση των μεθόδων ηλεκτροφόρησης ,ηλεκτρομεταφοράς και ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

Η μεμβράνη επωάστηκε με διάλυμα γάλακτος περιεκτικότητας 5% (βλ. Υλικά 3.7.4) για 1 ώρα, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης από την καζεΐνη του γάλατος. Ύστερα η μεμβράνη επωάστηκε υπό ανάδευση ολονύκτια στους 4° C με το πρώτο αντίσωμα (διαλυμένο σε διάλυμα γάλακτος περιεκτικότητας 5%). Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με TBS-tween20 0,1% και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος. Επίσης το δεύτερο αντίσωμα φέρει το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου HRP (horse radish peroxidase). Μετά τη σύνδεση και του δεύτερου αντισώματος ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών, προκειμένου να απομακρυνθεί ότι πιθανώς είχε συνδεθεί μη ειδικά. Έπειτα η μεμβράνη επωάστηκε με 1 λεπτό με το εμφανιστικό (Immobilion Crescendo Western HRP Substrate ή διάλυμα λουμινόλης), το οποίο αντιδρά λόγω της HRP δίνοντας φωταύγεια. Το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύθηκε με τη χρήση του Imager Uvitec Cambridge. Τέλος, ως μάρτυρας ισοφόρτωσης (loading control) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη.

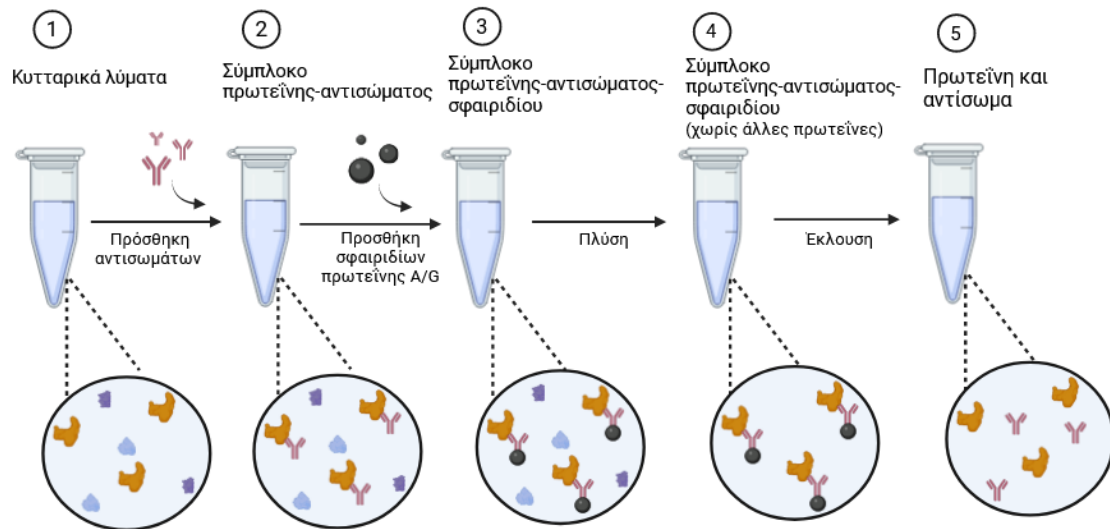
4.2.5 Ποσοτικοποίηση σήματος πρωτεϊνών

Για την εκτίμηση της ποσότητας του σήματος των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η χρήση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας UVIBAND επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζωνών των πρωτεϊνών με μέτρηση της έντασης του σήματος τους. Η κανονικοποίηση των τιμών έντασης των ζωνών

της κάθε πρωτεΐνης στόχου πραγματοποιήθηκε ως προς τη τιμή έντασης των ζωνών της πρωτεΐνης ελέγχου ισοφύτρωσης (τουμπουλίνη). Τα κανονικοποιημένα δεδομένα συγκρίθηκαν μεταξύ των συνθηκών νορμοξίας και υποξίας. Τέλος, η σχετική ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε ως προς τη συνθήκη της νορμοξίας.

4.2.6 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου: Η ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation-IP) είναι μια μικρής κλίμακας χρωματογραφία συγγένειας, η οποία χρησιμοποιεί ένα ειδικό αντίσωμα το οποίο είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό υπόστρωμα όπως μαγνητικά σωματίδια ή ρητίνη (π.χ. αγαρόζη) με σκοπό την κατακρήμνιση και την απομόνωση του αντιγόνου-στόχου. Ως υπόστρωμα για το ακινητοποιημένο αντίσωμα χρησιμοποιούνται σφαιρίδια, όπως σφαιρίδια αγαρόζης. Η ακινητοποίηση του αντισώματος στα σφαιρίδια γίνεται μέσω πρωτεϊνών (A ή G), οι οποίες είναι συνδεδεμένες στα σφαιρίδια και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με ανοσοσφαιρίνες (Ig). Επομένως κατά την επώαση πραγματοποιείται η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-στόχου με ειδικό αντίσωμα, το οποίο παραλαμβάνεται έπειτα από ήπια φυγοκέντρηση. Η διαδικασία απεικονίζεται συνοπτικά στην εικόνα 19. Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να καταργηθούν οι μη ομοιοπολικές και οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών.



Εικόνα 19: Απεικόνιση συνοπτικής διαδικασίας της μεθόδου της ανοσοκατακρήμισης
(Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

Πειραματική διαδικασία

4.2.6.1 Παρασκευή πυρηνικού εκχυλίσματος

Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από τα πιάτα καλλιέργειας (10cm). Έπειτα ακολούθησε επώαση με τρυψίνη για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 400 x g για 4 λεπτά στους 4° C. Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση των κυττάρων του ιζήματος σε παγωμένο PBS 1x. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στα 400 x g για 4 λεπτά στους 4° C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 300μl του διαλύματος λύσης (βλ. Υλικά 3.7.5.B). Από εκείνο το σημείο η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο. Τα κύτταρα παρέμειναν στο διάλυμα λύσης σε πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του όγκου του δείγματος ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα διαλύματος NP-40 που θα προστεθεί (τελική συγκέντρωση 0,3% v/v). Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά με το NP-40 για κυτταρική λύση. Η κυτταρική λύση επαληθεύθηκε με την παρατήρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Χρησιμοποιήθηκε και ο ομογενοποιητής τύπου glass-Teflon (10 χτυπήματα σε πάγο), ο οποίος ενδείκνυται σε περιπτώσεις δύσκολης λύσης των κυττάρων. Μετά τη λύση φυλάχθηκαν 30μl δείγματος σε διάλυμα SDS Laemmli με DTT (βλ. Υλικά 3.5.7.E) (ολικό εκχύλισμα). Ακολούθησε βράσιμο στους 95° C για 5 λεπτά και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20° C. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα

1200 x g για 5 λεπτά στους 4° C, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε διάλυμα λύσης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στα 1200 x g για 5 λεπτά στους 4° C και αφαίρεση του υπερκειμένου, το οποίο περιέχει το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Στο ίζημα που προέκυψε περιέχονταν οι πυρήνες των κυττάρων. Για τη λύση των πυρήνων το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 300μl διάλυμα RIPA (βλ. Υλικά 3.7.5). Έπειτα από επώαση 15 λεπτών η λύση επαληθεύθηκε με παρατήρηση των πυρήνων σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία του λύματος με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonicator) για 25 λεπτά με παλμούς των 0,5 δευτερολέπτων. Η λύση επαληθεύθηκε με παρατήρηση των πυρήνων στο μικροσκόπιο σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στα 15.000 x g για 5 λεπτά στους 4° C και φυλάχθηκαν 30μl δείγματος σε διάλυμα SDS Laemmli με DTT (πυρηνικό εκχύλισμα). Ακολούθησε επώαση στους 95° C για 5 λεπτά και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C. Επίσης πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.2).

4.2.6.2 Ανοσοκατακρήμνιση

Το πυρηνικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε παραπάνω (σύνολο 532 mg) επωάστηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της MTR4 (4μg) για 4 ώρες υπό ανάδευση στους 4° C.

4.2.6.2.1 Προετοιμασία και εξισορρόπηση σφαιριδίων στο διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης

Πρώτα 10μl σφαιριδίων φυγοκεντρήθηκαν στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C για την απομάκρυνση του διαλύματος φύλαξης (αιθανόλης 20%). Για την εξισορρόπηση των σφαιριδίων πρωτεΐνης A σε διάλυμα RIPA έγινε προσθήκη του διαλύματος RIPA στα σφαιρίδια, ανάδευση σε κυκλική τροχιά για 5 λεπτά στους 4° C και φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές ακόμα.

4.2.6.2.2 Ανοσοκατακρήμιση και έκλουση

Το εκχύλισμα των πυρήνων, το οποίο επώαστηκε με το αντίσωμα, προστέθηκε στα εξισοροπημένα σφαιρίδια και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες υπό ανάδευση σε κυκλική τροχιά στους 4° C. Μετά το πέρας των 2 ωρών πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Έπειτα έγινε επώαση των σφαιριδίων με το διάλυμα πλύσεων υπό ανάδευση σε κυκλική τροχιά για 2 λεπτά στους 4° C και κατόπιν φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές. Η έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια έγινε με επώαση σε 30μl διαλύματος 2x SDS Laemmli για 10 λεπτά στους 37° C. Με αυτόν τον τρόπο αποδεσμεύτηκε η πρωτεΐνη από το αντίσωμα και τα σφαιρίδια. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 13.000 x g για 1 λεπτό, συλλογή του υπερκειμένου, και μεταφορά σε άλλο errendorf. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα 1 φορά, ώστε να αποφευχθεί η λήψη σφαιριδίων. Στη συνέχεια προστέθηκε DTT για να πραγματοποιηθεί πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τέλος έγινε επώαση στους 95° C για 5 λεπτά και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 4.2.4)

4.2.7 Δοκιμή in vitro συγκατακρήμισης σε σουμοϋλιωμένες και μη πρωτεΐνες (in vitro pull down assay)

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος της in vitro συγκατακρήμισης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών in vitro. Είναι σημαντική επίσης για την επιβεβαίωση μιας προβλεπόμενης αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή τον εντοπισμό νέων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η τεχνική είναι απαραίτητη η χρήση μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με συγκεκριμένο επίτοπο (π.χ. GST), η οποία προσδένεται σε σφαιρίδια (π.χ. γλουταθειόνης σεφαρόζης) λόγω της αγχιστείας του επιτόπου που φέρει. Η συνδεδεμένη σε σφαιρίδια πρωτεΐνη θα λειτουργήσει ως «δόλωμα» για της πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μαζί της. Στην παρούσα έρευνα για τη μελέτη αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης EXOSC10 με παράγοντες του εξωσώματος από κυτταρικά εκχυλίσματα και της επίδρασης της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε αυτή, το

πειραματικό πρωτόκολλο της συγκατακρήμνισης τροποποιήθηκε ώστε να περιλαμβάνει και την παρουσία της σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης δολώματος. Για το σκοπό αυτό στις καθλωμένες ανασυνδυασμένες EXOSC10 έγινε *in vitro* σουμοϋλίωση πάνω στα σφαιρίδια και στη συνέχεια επώαση με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία περιέχουν τους ενδογενείς παράγοντες του RNA εξωσώματος.

Πειραματική διαδικασία

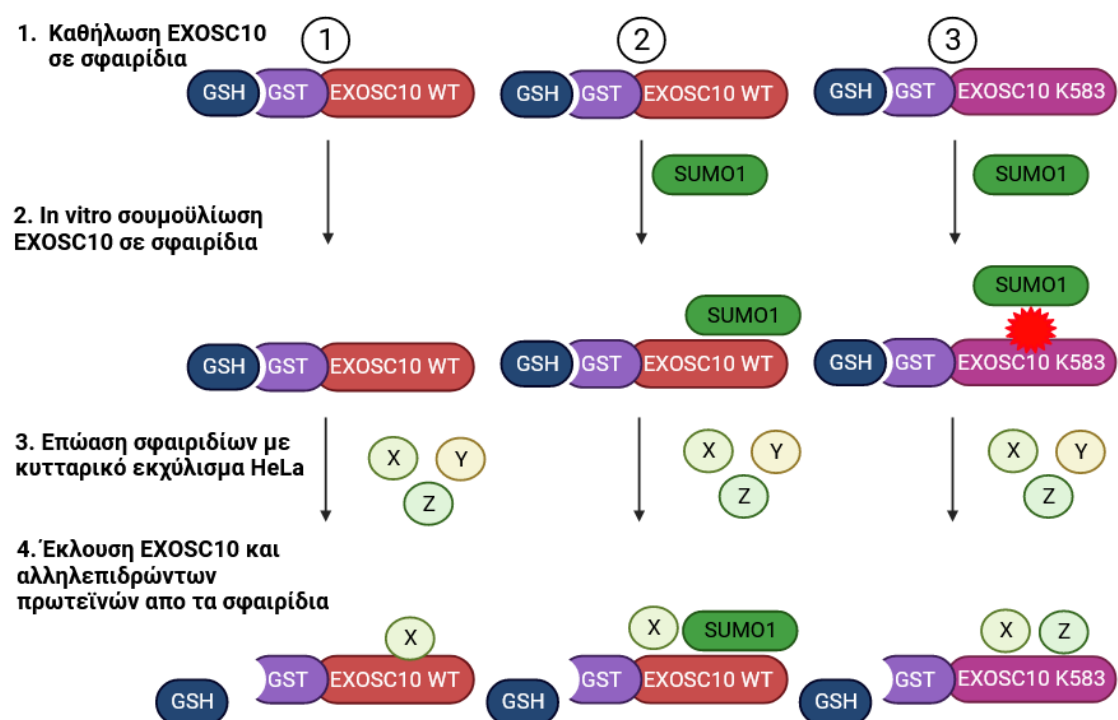
4.2.7.1 Προετοιμασία των εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από 2 πιάτα 100mm κυττάρων HeLa (ποσοστό επίστρωσης την ημέρα λύσης περίπου στο 70-80%). Ακολούθησαν πλύσεις των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x. Ύστερα απομακρύνθηκε εντελώς το διάλυμα PBS 1x και προστέθηκε 150 μl (για κάθε πιάτο) διάλυμα λύσης (βλ. Υλικά 3.7.2). Ακολούθησε απόξυση, λύση των κυττάρων από το πιάτο και μεταφορά τους σε erpendorf. Τα εκχυλίσματα που περιείχαν τους ενδογενείς παράγοντες του εξωσώματος πάγωσαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω στην διαδικασία *in vitro* συγκατακρήμνισης.

4.2.7.2 Προετοιμασία και εξισορρόπηση σφαιριδίων γλουταθεινής (GSH)

Αρχικά σφαιρίδια γλουταθεινής φυγοκεντρήθηκαν στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C και ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου. Για την εξισορρόπηση των σφαιριδίων γλουταθεινής σε διάλυμα SAB (βλ. Υλικά 3.7.6) πραγματοποιήθηκε προσθήκη του διαλύματος SAB στα σφαιρίδια, ανάδευση σε κυκλική τροχιά για 5 λεπτά στους 4° C και φυγοκέντρωση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές ακόμα. Ακολούθησε επαναιώρηση των σφαιριδίων σε διάλυμα SAB και διαμοιρασμός των σφαιριδίων σε 3 erpendorfs (10μl στις αντιδράσεις 1 και 2 και 20μl στην αντίδραση 3). Έπειτα προστέθηκε διάλυμα SAB ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1200μl. Ύστερα πραγματοποιήθηκε γρήγορη απόψυξη (από τους -80° C, βλ. Μέθοδοι 4.2.7.1) των καθαρισμένων ανασυνδυασμένων μορφών EXOSC10, δηλαδή των GST-EXOSC10 WT (αγρίου τύπου) και GST-EXOSC10 K583 (μετάλλαξη στην λυσίνη 583) (βλ. Υλικά 3.4). Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 50μl

(τελική συγκέντρωση 8,3 ng/μl) των καθαρισμένων πρωτεϊνών σε κάθε αντίδραση (EXOSC10 WT σε αντιδράσεις 1, 2 και EXOSC10 K583 σε αντίδραση 3) και πραγματοποιήθηκε επώαση με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς για 1 ώρα στους 4° C (εικόνα 20, βήμα 1). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C, προσθήκη διαλύματος SAB και ανάδευση για 2 λεπτά. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 1 φορά ακόμα. Στη συνέχεια ακολούθησε η σουμοϋλίωση των μορφών GST-EXOSC10.



Εικόνα 20: Απεικόνιση δοκιμαστικού πειραματικού πρωτοκόλλου *in vitro* συγκατακρήμνισης. (Δημιουργήθηκε με το bioRender.com)

4.2.7.3 In vitro σουμοϋλίωση με τη χρήση ανασυνδυασμένης EXOSC10

Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε SAB buffer (βλ. Υλικά 3.7.7). Οι δοκιμές *in vitro* σουμοϋλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε 60μl αντιδράσεων (στις αντιδράσεις 2 και 3, όχι στην 1) (εικόνα 21, βήμα 2). Έγινε υπολογισμός των ποσοτήτων των SUMO1, UBA (E1 λιγάση), UBC9 (E2 λιγάση), RanBP2 (E3 λιγάση) και ATP που αναφέρονται στον πίνακα 8 σύμφωνα με γνωστά δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Werner et al, 2009) (βλ Υλικά 3.4). Επίσης έγινε υπολογισμός της ποσότητας του διαλύματος SAB που χρειάστηκε για να φτάσει ο συνολικός όγκος στα 60μl. Στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, τα οποία φέρουν

καθλωμένες τις μορφές GST-EXOSC10 (WT και K583) (βλ. Υλικά 3.4) έγινε προσθήκη των 60μl για κάθε αντίδραση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο. Τέλος πραγματοποιήθηκε επώαση υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 30° C.

Πίνακας 8: Ποσότητες συστατικών *in vitro* σουμοϋλίωσης

Συστατικά (συγκεντρώσεις στοκ)	Αντίδραση 2 (GST-EXOSC10 WT) (τελικές συγκεντρώσεις)	Αντίδραση 3 (GST-EXOSC10 K583) (τελικές συγκεντρώσεις)
SUMO1(3,15 μM)	1,71μl (9 μM)	1,71μl (9 μM)
E1 (1,62 μM)	2,3 μl (500 nM)	2,3 μl (500 nM)
E2 (1,8 μM)	18,51 μl (70 nM)	18,51 μl (70 nM)
E3 (1,36 μM)	4,41 μl (100 nM)	4,41 μl (100 nM)
ATP (100 mM)	3 μl (5 mM)	3 μl (5 mM)
Διάλυμα SAB	30,07 μl	30,07 μl
Ολικό	60 μl	60 μl

4.2.7.4 Συγκατακρήμιση με ενδογενείς πρωτεΐνες και έκλυση πρωτεϊνών

Επεξεργασία κυτταρικών εκχυλισμάτων: Κατά τη διάρκεια των 2 ωρών που έγινε η σουμοϋλίωση των μορφών GST-EXOSC10 παράλληλα πραγματοποιήθηκε απόψυξη των κυτταρικών εκχυλισμάτων και φυγοκέντρωση στα 11.000 x g για 30 λεπτά στους 4° C. Από το κυτταρικό εκχύλισμα λήφθηκε δείγμα 30μl ως δείγμα control. Έγινε προσθήκη διαλύματος SDS Laemmli με DTT και ακολούθησε επώαση στους 95° C για 5 λεπτά. Επίσης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.β).

Επεξεργασία σφαιριδίων με προσδεμένες τις μορφές GST-EXOSC10: Μετά το πέρας των 2 ωρών της σουμοϋλίωσης, έγινε φυγοκέντρωση στα σφαιρίδια που φέρουν τις μορφές GST-EXOSC10 (αντιδράσεις 2 και 3) στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκειμένου ώστε να απομακρυνθούν τα συστατικά της *in vitro* σουμοϋλίωσης και επαναιώρηση των σφαιριδίων σε διάλυμα SAB.

Στα σφαιρίδια που έχουν προσδεμένες τις μορφές GST-EXOSC10 WT και K583, οι οποίες έχουν υποστεί σουμοϋλίωση (αντιδράσεις 2 και 3), και στα σφαιρίδια με προσδεμένη την GST-EXOSC10 WT (αντίδραση 1), η οποία δεν

έχει υποστεί σουμοϋλίωση, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C και αφαίρεση του υπερκειμένου προσεκτικά με λεπτή σύριγγα. Έπειτα έγινε προσθήκη του κυτταρικού εκχυλίσματος (βλ. Μέθοδοι 4.2.7.1) και ακολούθησε ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4° C (εικόνα 4, βήμα 3). Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 700 x g για 5 λεπτά στους 4° C, αφαίρεση του υπερκειμένου, προσθήκη διαλύματος SAB και ανάδευση σε κυκλική τροχιά για 5 λεπτά στους 4° C. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές ακόμα. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκειμένου προσεκτικά με λεπτή σύριγγα και έκλουση με επώαση σε 40μl διαλύματος SDS Laemmli για 10 λεπτά στους 37° C (εικόνα 4, βήμα 4). Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στα 13.000 x g για 1 λεπτό, συλλογή του υπερκειμένου και μεταφορά σε άλλο errendorf. Ακολούθησε προσθήκη 4μl DTT και επώαση στους 95° C για 5 λεπτά.

Λήφθηκαν δείγματα των 2μg από τις 2 καθαρισμένες μορφές της GST-EXOSC10 ως δείγματα control πριν την καθήλωση στα σφαιρίδια (εικόνα 21, βήμα 2), στα οποία έγινε προσθήκη διαλύματος SDS Laemmli με DTT και ακολούθησε επώαση στους 95° C για 5 λεπτά. Ακόμα έγινε λήψη δειγμάτων (το 1/6) από τα σφαιρίδια που φέρουν τις μορφές GST-EXOSC10 μετά την in vitro σουμοϋλίωση (αντιδράσεις 2 και 3) (εικόνα 4, βήμα 3), ως δείγματα control μετά τη σουμοϋλίωση και μετά την τελική έκλουση. Τέλος όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 4.2.4)

4.2.8 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motif) περιοχών στις πρωτεΐνες του εξωσώματος πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση, με τη χρήση των online εργαλείων GPS-SUMO (72) (<https://sumo.biocuckoo.cn/>) και JASSA (73) (<http://www.jassa.fr/>). Η αλληλουχία της υπό μελέτης πρωτεΐνης εισάγεται με τη μορφή FASTA. Επιλέγονται όρια thresholds χαμηλής, μεσαίας ή υψηλής πιθανότητας ύπαρξης sim. Στην παρούσα ανάλυση επιλέχθηκαν τα threshold υψηλής και μεσαίας πιθανότητας.

5. Αποτελέσματα

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας της κ. Χαχάμη στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής πάνω στις αλλαγές του πρότυπου σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας έδειξαν πως η εξωριβονουκλεάση Exosome component 10 (EXOSC10) μειώνει δραματικά της σουμοϋλίωσή της κατά την υποξία (100). Περαιτέρω έρευνα στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής της κ. Φιλιπποπούλου, έδειξε πως η σουμοϋλίωση της EXOSC10 μειώνεται κατά την υποξία εξαιτίας της μετακίνησης της EXOSC10 από τους πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα και της απομάκρυνσής από την SUMO ειδική E3 λιγάσης της, η οποία είναι η USP36. Επιπλέον αποδείχθηκε πως η μείωση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 επηρεάζει την έκφραση mRNAs, τα οποία αποτελούν στόχους της υποξίας, εμπλέκοντάς την στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία (Filipporoulou et al, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546038>, CMLS 2023 under review). Παρόλα αυτά ο μηχανισμός με το οποίο η αλλαγή της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 επηρεάζει την έκφραση ή σταθεροποίηση των mRNA παραμένει άγνωστος.

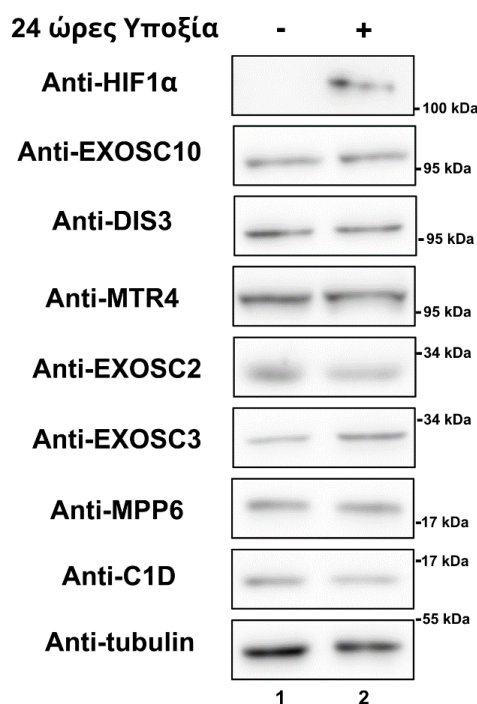
Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 στην αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος, προκειμένου να εξηγηθούν οι αλλαγές στα επίπεδα mRNA εξαιτίας της οξυγονοεξαρτώμενης αποσουμοϋλίωσης της EXOSC10.

5.1 Μελέτη της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού ενδογενών πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας

Το πρώτο μέρος της πτυχιακής εργασίας εστιάζεται στον αρχικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος όσον αφορά στην έκφραση και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους σε καρκινικά κύτταρα HeLa σε συνθήκες υποξίας. Για την επίτευξη αυτού του στόχου ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων δομικών (EXOSC2 και EXOSC3), καταλυτικών υπομονάδων (DIS3) αλλά και συμπαραγόντων που αλληλεπιδρούν με τον πυρήνα του RNA εξωσώματος (MTR4, MPP6 και C1D) καθώς και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός τους σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂-νορμοξία) και σε 1% O₂ (υποξία).

5.1.1 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας

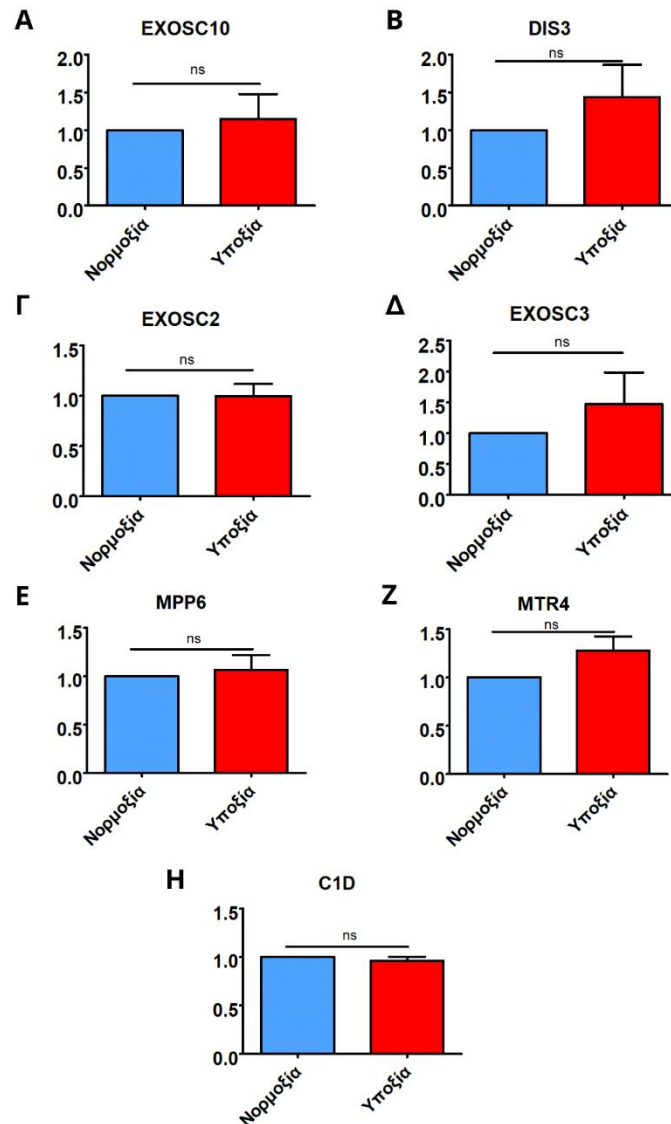
Για τη μελέτη της έκφρασης των ενδογενών πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση των καρκινικών κυττάρων HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Μετά το πέρας της επώασης, τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.3) και στη συνέχεια με ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (βλ. Μέθοδοι 4.2.3) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 4.2.4). Έγινε χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των EXOSC10 και EXOSC2 και των ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των EXOSC3, DIS3, MTR4, MPP6 και C1D. Επίσης έγινε χρήση και ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του HIF-1α ως μάρτυρας της υποξίας και της τουμπουλίνης ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.



Εικόνα 21: Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των EXOSC10, DIS3, MTR4, EXOSC2, EXOSC3, MPP6 και C1D σε συνθήκες νορμοξίας (διαδρομή 1) και υποξίας (διαδρομή 2). Για την ανοσοανίχνευση έγινε χρήση των αντισωμάτων, που αναφέρονται στα αριστερά της εικόνας. Ως μάρτυρας εφαρμογής της υποξίας χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του HIF-1α (πρώτο πάνελ) και ως μάρτυρας ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης (τελευταίο πάνελ). Στα δεξιά των εικόνων φαίνονται ενδεικτικά τα μοριακά βάρη (σε kDa).

Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στην εικόνα 21, η οποία είναι αντιπροσωπευτική τριών πειραμάτων. Φαίνεται ότι ο HIF-1α επάγεται κατά την επώαση των κυττάρων σε υποξία, μαρτυρώντας την ύπαρξη των υποξικών συνθηκών στην καλλιέργεια μας. Αναλυτικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα των δομικών υπομονάδων EXOSC2 και EXOSC3, της καταλυτικής υπομονάδας DIS3 και των συμπαραγόντων MTR4, MPP6 και C1D του RNA εξωσώματος δεν φαίνεται να αλλάζουν ανάμεσα στις συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Για την εύρεση στατιστικής σημαντικότητας, τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από 3 ανεξάρτητα πειράματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος UniBand (Imager Uvitec Cambridge) και κανονικοποιήθηκαν ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνης. Στην εικόνα 22 φαίνονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις σχετικές τιμές των ποσοτικοποιήσεων ως προς την νορμοξία (η συνθήκη της νορμοξίας αποτέλεσε την συνθήκη control). Από τα διαγράμματα φαίνεται πως σε καμία από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης ανάμεσα στις 2 συνθήκες (νορμοξία και υποξία). (EXOSC10: $P=0.6799$, DIS3: $P=0.3653$, EXOSC2: $P=0.9768$, EXOSC3: $P=0.4170$, MPP6: $P=0.6695$, MTR4: $P=0.1269$, C1D: $P=0.4077$, $p>0.05$ ns-μη στατιστικώς σημαντικό)

Συνεπώς συνολικά συμπεραίνουμε πως η έκφραση των δομικών, καταλυτικών υπομονάδων και συμπαραγόντων του RNA εξωσώματος δεν επηρεάζεται κατά την υποξία.



Εικόνα 22: Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων υπομονάδων του RNA εξωσώματος σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Α) Στον άξονα Υ, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές (ως προς την νορμοξία) των επιπέδων των πρωτεϊνών EXOSC10 (Α, $P=0.6799$), DIS3 (Β, $P=0.3653$), EXOSC2 (Γ, $P=0.9768$), EXOSC3 (Δ, $P=0.4170$), MPP6 (Ε, $P=0.6695$), MTR4 (Ζ, $P=0.1269$), και C1D (Η, $P=0.4077$) κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές τουμπουλίνων. Οι μπλέ μπάρες αντιστοιχούν στη νορμοξία και οι κόκκινες μπάρες αντιστοιχούν στην υποξία. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος UviBand (Imager Uvitec Cambridge) και η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος Graph Pad-Prism6.

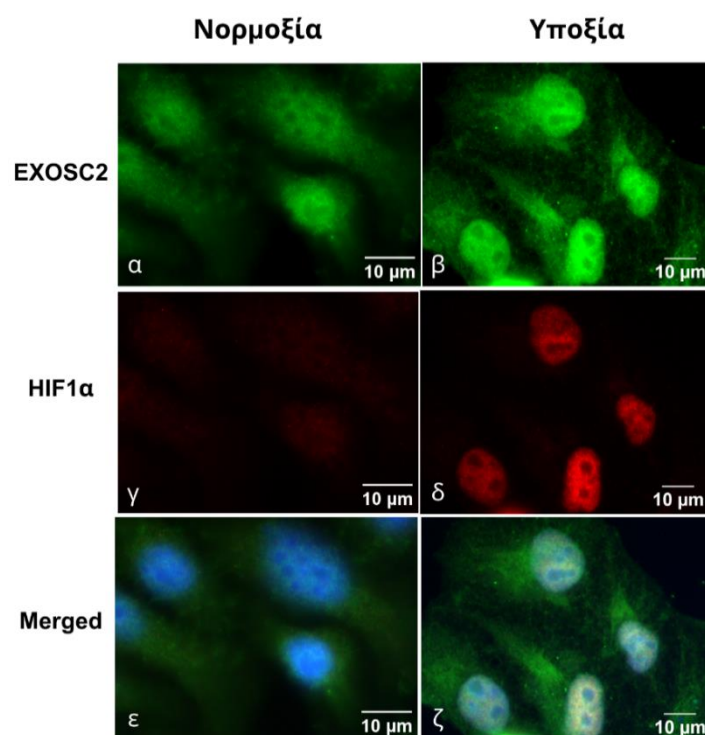
5.1.2 Μελέτη των ενδοκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος σε συνθήκες υποξίας

Για τον έλεγχο του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλ. Μέθοδοι 4.2.1). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε

24ώρη επώαση καρκινικών κυττάρων HeLa σε νορμοξία και υποξία. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλδεύδη και διαπερατοποίηση των μεμβρανών και επώαση με ειδικά αντισώματα έναντι των υπό μελέτη πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος και έναντι του HIF-1α με σκοπό την επιβεβαίωση της εφαρμογής της υποξίας. Ακόμα έγινε επώαση με DAPI για την οπτικοποίηση των πυρήνων και η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού τύπου Zeiss Axio Imager Z2.

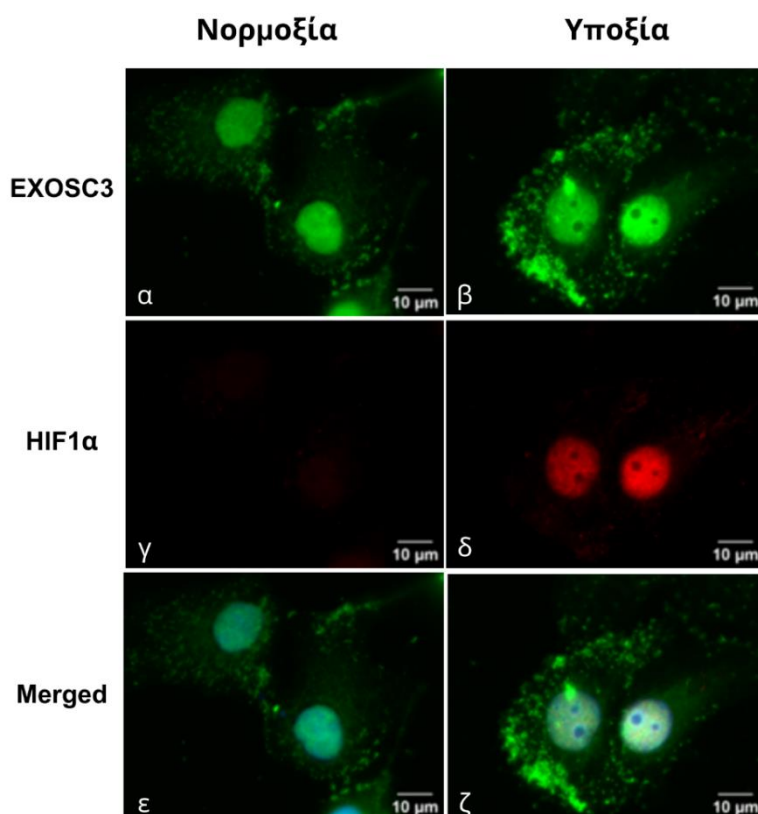
Δομικές υπομονάδες EXOSC2 και EXOSC3

Στην εικόνα 23 φαίνονται τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού έναντι της πρωτεΐνης EXOSC2. Αρχικά παρατηρείται ένα διάχυτο σήμα σε πυρήνες και κυτταρόπλασμα (εκτός πυρηνίσκου) και στις 2 συνθήκες, το οποίο πιθανώς να μην είναι ειδικό (εικόνες 23α και 23β) αφού από την βιβλιογραφία η EXOSC2 αναμένεται στον πυρηνίσκο και στον πυρήνα. Επιπλέον δεν φαίνεται να υπάρχει μεταβολή στον εντοπισμό της EXOSC2 μεταξύ των συνθηκών νορμοξίας και υποξίας.



Εικόνα 23: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης EXOSC2 με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της EXOSC2 (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των EXOSC2, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

Στην εικόνα 24 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης EXOSC3. Το σήμα που παρατηρείται είναι κυρίως πυρηνικό, ενώ εντοπίζεται και κυτταροπλασματικό σήμα σε συγκεκριμένες περιοχές και στη νορμοξία και στην υποξία (εικόνες 24α και 24β). Συνολικά δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της EXOSC3 ανάμεσα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.



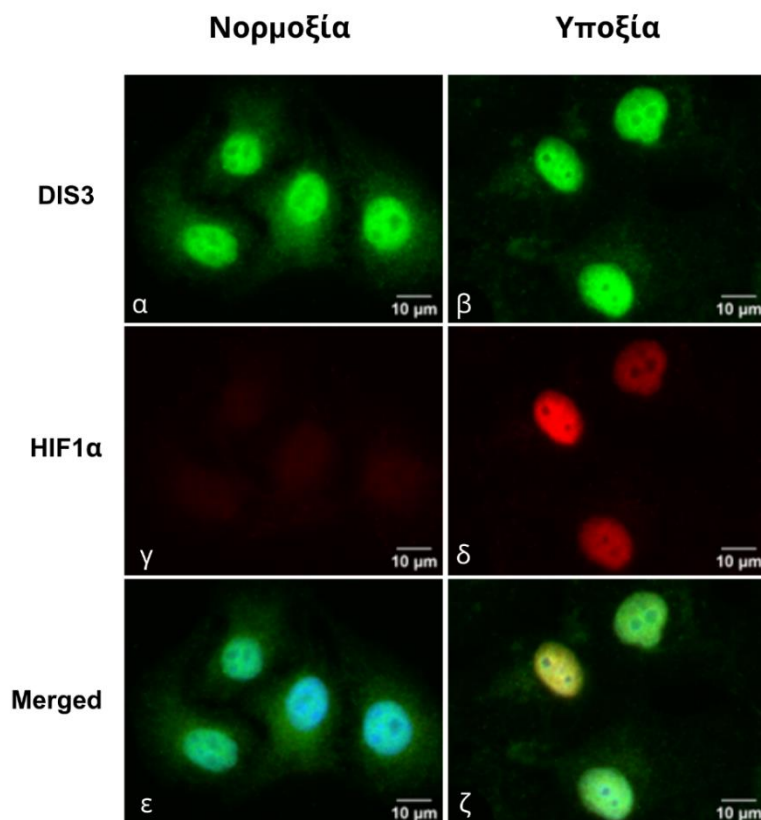
Εικόνα 24: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης EXOSC3 με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της EXOSC3 (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των EXOSC3, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

Και στις 2 περιπτώσεις, των EXOSC2 και EXOSC3, τα πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν με siRNA έναντι των 2 πρωτεϊνών για να πιστοποιηθεί αν το κυτταροπλασματικό σήμα είναι ειδικό ή μη ειδικό λόγω του συγκεκριμένου αντισώματος

Καταλυτική υπομονάδα DIS3

Τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης DIS3 απεικονίζονται στην εικόνα

25. Παρατηρείται εντοπισμός της DIS3 κυρίως στους πυρήνες αλλά υπάρχει κάποιο σήμα διάχυτο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (εικόνες 25α και 25β). Αυτή η παρατήρηση είναι αναμενόμενη καθώς η DIS3 εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό και πυρηνικό RNA εξώσωμα (109). Συνολικά δεν φαίνεται να υπάρχει μεταβολή του εντοπισμού της DIS3 ανάμεσα στις συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

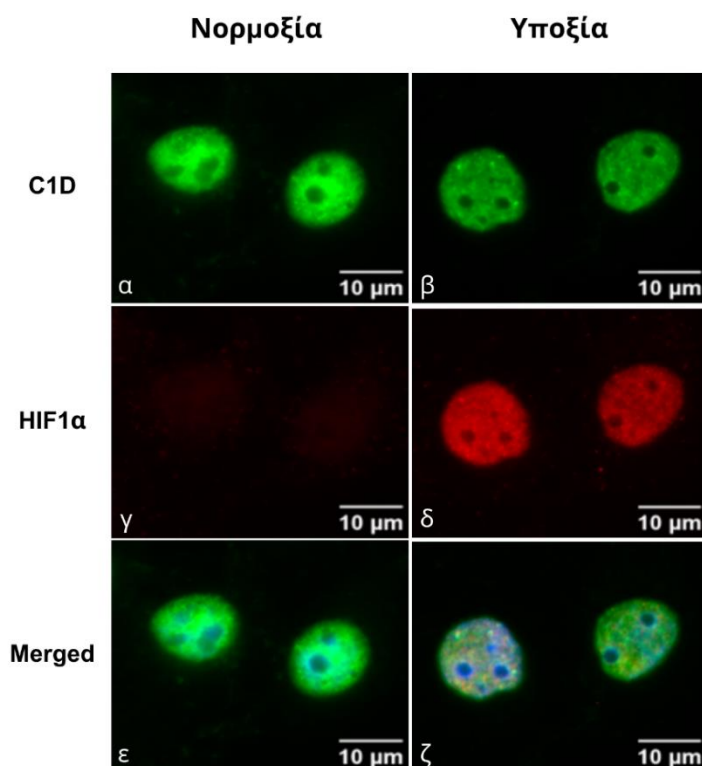


Εικόνα 25: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης DIS3 με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της DIS3 (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των DIS3, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

Συμπαράγοντες του RNA εξωσώματος C1D, MTR4 και MPP6

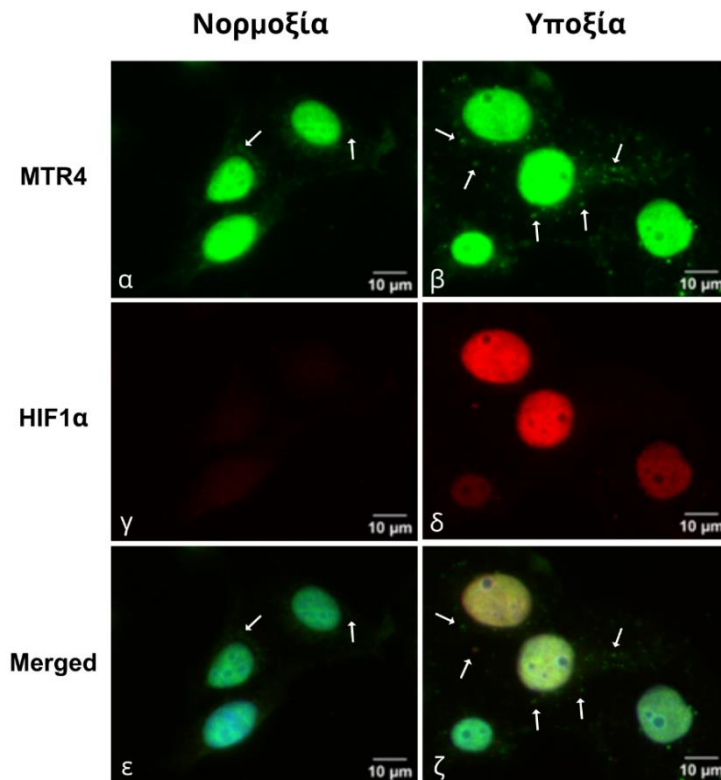
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο του εντοπισμού της πρωτεΐνης C1D μέσω μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού αποτυπώνονται στην εικόνα 26. Ο εντοπισμός της C1D φαίνεται εστιασμένος στο πυρηνόπλασμα των κυττάρων, χωρίς να αλλάζει μεταξύ των 2 συνθηκών (εικόνες 26α σε σύγκριση με την 26β και 26ε σε σύγκριση με την 26ζ). Αυτή η παρατήρηση δεν συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς ο εντοπισμός της C1D

φαίνεται στη βιβλιογραφία να είναι εστιασμένος στους πυρηνίσκους και όχι τόσο στο πυρηνόπλασμα. Χρήση περισσότερων και διαφορετικών αντισωμάτων έναντι της C1D θα πιστοποιήσει την ειδικότητα του σήματος.



Εικόνα 26: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης C1D με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της C1D (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των C1D, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

Στην εικόνα 27 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης MTR4 σε νορμοξία και υποξία. Σε συνθήκες νορμοξίας ο εντοπισμός της MTR4 φαίνεται να είναι κυρίως πυρηνικός (εικόνες 27α και 27ε). Παρόλα αυτά εντοπίζεται ένα αχνό σήμα της MTR4 και στο κυτταρόπλασμα υπό τη μορφή κοκκίων (υποδεικνύονται με τα άσπρα βελάκια) Στην υποξία η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα αλλά και στα κυτταροπλασματικά κοκκία, τα οποία σε αυτή την περίπτωση είναι περισσότερα και μεγαλύτερα αυτών που εντοπίζονται στην νορμοξία (εικόνα 27β και 27ζ αντίστοιχα). Γενικά το κυτταροπλασματικό σήμα της MTR4 φαίνεται να αυξάνεται στην υποξία.



Εικόνα 27: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης MTR4 με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της MTR4 (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των MTR4, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

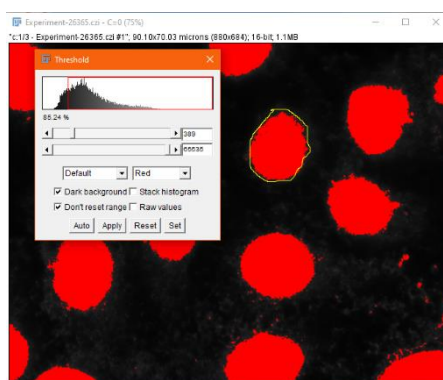
Λόγω των παραπάνω παρατηρήσεων πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των διαφορών του εντοπισμού της πρωτεΐνης MTR4, με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Αναλύθηκαν 12 εικόνες από ένα πείραμα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού (συνολικά 50 κύτταρα για κάθε συνθήκη). Τα όρια πυρήνων

και των κυττάρων προσδιορίστηκαν με το εργαλείο «threshold» (Image→Adjust→Threshold) (εικόνα 28). Για κάθε κύτταρο μετρήθηκε η ενσωματωμένη πυκνότητα του σήματος (integrated density) των πυρήνων και των κυττάρων και η περιοχή (area) που καθορίστηκε για το κάθε πυρήνα και κύτταρο (Analyze→Set measurements→Integrated density and Area, Analyze→Analyze particles). Για τον υπολογισμό της ενσωματωμένης πυκνότητας και της περιοχής του κυτταροπλάσματος έγινε αφαίρεση των τιμών ενσωματωμένης πυκνότητας και των τιμών περιοχής των πυρήνων από τις αντίστοιχες των κυττάρων ($\text{integrated density}_{\text{cytoplasm}} = \text{integrated density}_{\text{cell}} - \text{integrated density}_{\text{nucleus}}$) ($\text{area}_{\text{cytoplasm}} = \text{area}_{\text{cell}} - \text{area}_{\text{nucleus}}$). Επίσης έγινε

μέτρηση του ανοσοφθορισμού που δίνει το background (Analyze→Set measurements→mean background). Για τον υπολογισμό των CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) έγινε χρήση του εξής τύπου:

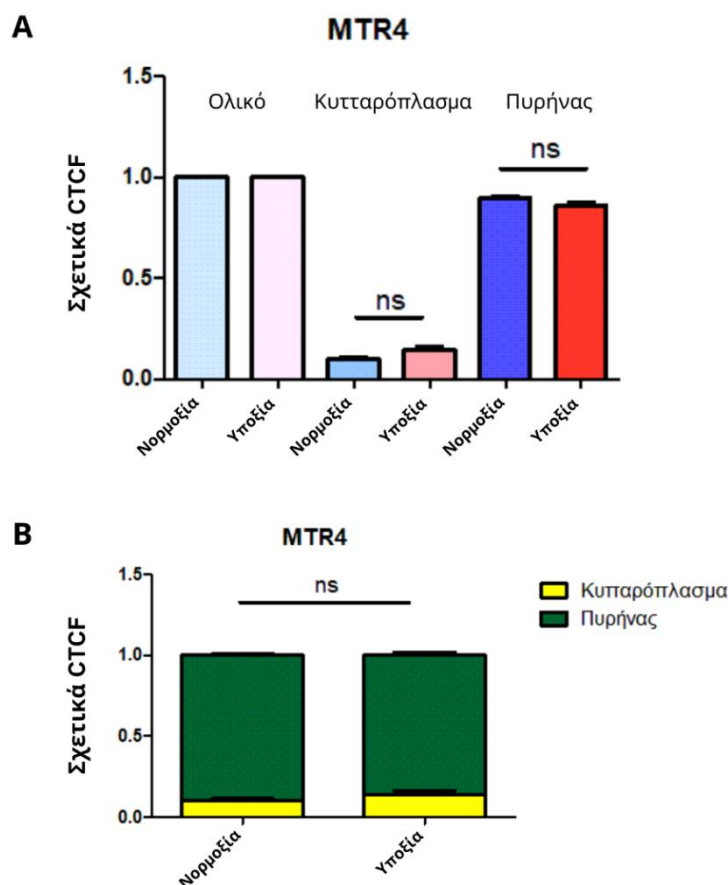
$CTCF = \text{Integrated density} - (\text{Area} * \text{Mean fluorescence of background readings})$.

Τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του σήματος στα κύτταρα, στους πυρήνες και στα κυτταροπλάσματα της MTR4 τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας, παρουσιάζονται στην εικόνα 29. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος Graph Pad-Prism6.



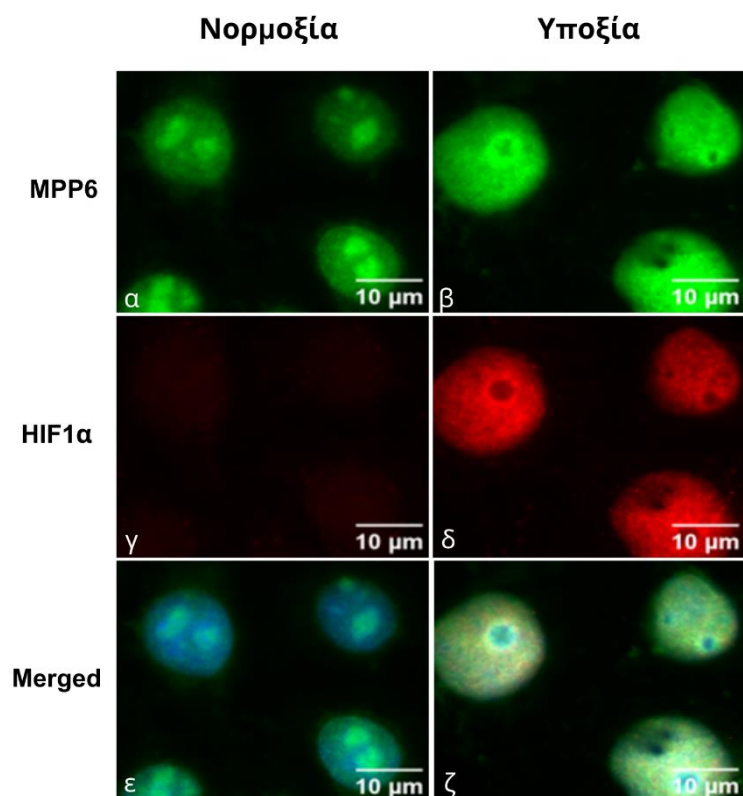
Εικόνα 28: Επεξεργασία εικόνα ανοσοφθορισμού με το εργαλείο *Threshold* του προγράμματος *ImageJ* για τον καθορισμό και το προσδιορισμό του σήματος ορισμένων πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 29 η διαφορά του σήματος της MTR4 στα κύτταρα ανάμεσα σε νορμοξία και υποξία δεν είναι στατιστικώς σημαντική (διαγράμματα A και B αντίστοιχα). Συγκεκριμένα ενώ παρατηρείται αύξηση του σήματος στο κυτταρόπλασμα και μείωση του πυρηνικού κατά την υποξία, αυτές οι αλλαγές είναι μη στατιστικώς σημαντικές ($P=0.616>0.05$).



Εικόνα 29: Ποσοτικοποίηση του σήματος ανοσοφθορισμού της πρωτεΐνης MTR4. Α) Απεικόνιση ποσοτικοποίησης ολικού σήματος εντός των κυττάρων (2 μπάρες αριστερά), του κυτταροπλασματικού σήματος (2 μπάρες στη μέση) και του πυρηνικού σήματος (2 μπάρες δεξιά) σε νορμοξία (μπλέ μπάρες) και υποξία (κόκκινες μπάρες). Β) Απεικόνιση ποσοτικοποίησης σήματος του κυτταροπλάσματος (κίτρινο) και του πυρήνα (πράσινο) σε σχέση με το ολικό σήμα του κυττάρου (σχετικό CTCF=1.0) σε νορμοξία και υποξία. Συμπεριλαμβάνονται αποτελέσματα από ένα πείραμα ανοσοφθορισμού από τα οποία αναλύθηκαν 12 εικόνες με το συνολικό αριθμό των κυττάρων να φτάνει τα 50 για κάθε συνθήκη ($n=50$, $P=0.616>0.05$). Για κάθε κύτταρο υπολογίστηκε το CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence), το οποίο κανονικοποιήθηκε ως προς το συνολικό CTCF του κυττάρου και η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς την νορμοξία. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

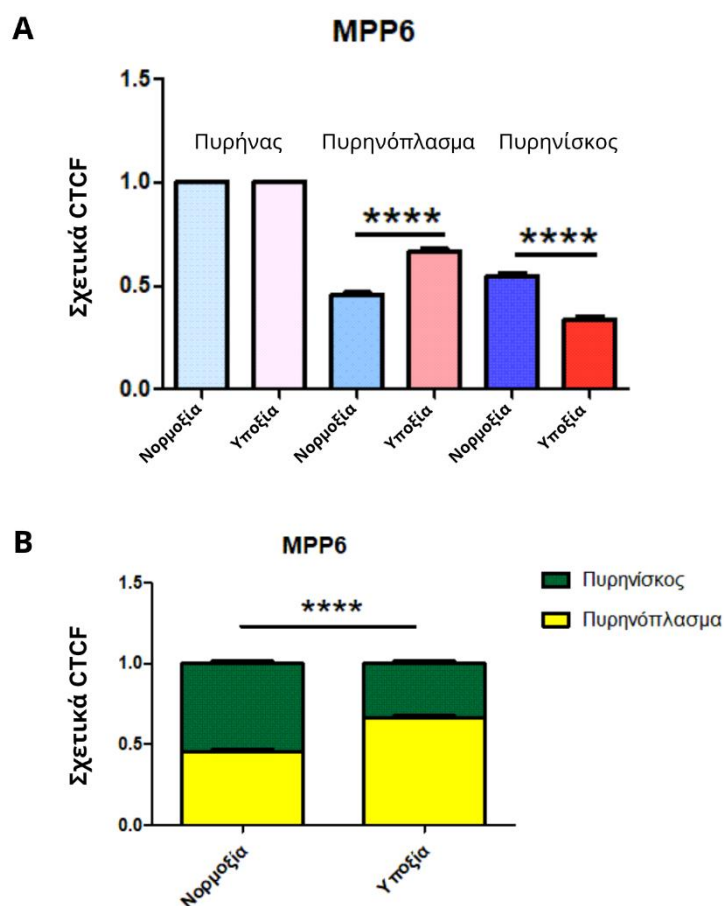
Τα αποτελέσματα από την μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο του εντοπισμού της πρωτεΐνης MPP6 αποτυπώνονται στην εικόνα 30. Σε συνθήκες νορμοξίας παρατηρείται εστιασμένος εντοπισμός της MPP6 στους πυρηνίσκους με ένα μικρό ποσοστό να βρίσκεται και στο πυρηνόπλασμα. Σε συνθήκες υποξίας το σήμα στο πυρηνόπλασμα φαίνεται να αυξάνεται. Επιπλέον το σήμα στους πυρηνίσκους φαίνεται να εντοπίζεται περισσότερο στη περιφέρεια των πυρηνίσκων.



Εικόνα 30: Έλεγχος ενδοκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης MPP6 με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Απεικόνιση του εντοπισμού της MPP6 (α και β), του HIF-1α (γ και δ) και των MPP6, HIF-1α μαζί με χρώση DAPI έναντι των πυρήνων (merged) (ε και ζ) σε νορμοξία και υποξία. Μεγέθυνση 100x.

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των διαφορών του εντοπισμού της πρωτεΐνης MPP6 με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Αναλύθηκαν 10 εικόνες από ένα πείραμα μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού (συνολικά 50 κύτταρα για κάθε συνθήκη). Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σήματος στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα της MPP6 τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας παρουσιάζονται στην εικόνα 31. Σύμφωνα με τα διαγράμματα Α και Β της εικόνας 11 παρατηρήθηκε μείωση του σήματος στους πυρηνίσκους κατά την υποξία, η οποία είναι στατιστικώς σημαντική (διάγραμμα Α, διαδρομές 5 και 6, $p < 0.0001$, **** και διάγραμμα Β πράσινες μπάρες σύγκριση μεταξύ νορμοξίας και υποξίας). Επίσης φαίνεται πως το σήμα του πυρηνοπλάσματος αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά στην υποξία (διάγραμμα Α, διαδρομές 3 και 4, $p < 0.0001$, **** και διάγραμμα Β κίτρινες μπάρες). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν μια αλλαγή εντοπισμού της MPP6 από τους πυρηνίσκους προς το πυρηνόπλασμα κατά την υποξία,

χωρίς όμως να παρουσιάζεται μεταβολή στα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης (βλ. διάγραμμα Α, διαδρομές 1 και 2).

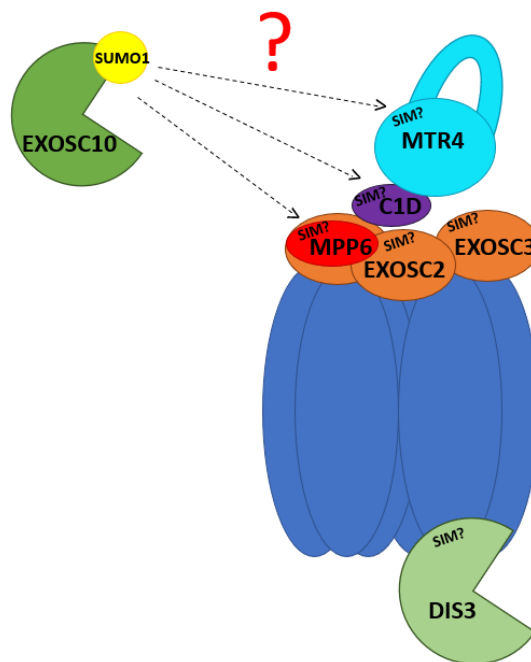


Εικόνα 31: Ποσοτικοποίηση του σήματος ανοσοφθορισμού της πρωτεΐνης MPP6. Α) Απεικόνιση ποσοτικοποίησης σήματος του πυρήνα (2 μπάρες αριστερά), του πυρηνοπλάσματος (2 μπάρες στη μέση) και των πυρηνίσκων (2 μπάρες δεξιά) σε νορμοξία (μπλέ μπάρες) και υποξία (κόκκινες μπάρες). Β) Απεικόνιση ποσοτικοποίησης σήματος του πυρηνόπλάσματος (κίτρινο) και του πυρηνίσκου (πράσινο) σε σχέση με το ολικό σήμα του πυρήνα σε νορμοξία και υποξία. Συμπεριλαμβάνονται αποτελέσματα από ένα πείραμα ανοσοφθορισμού από τα οποία αναλύθηκαν 10 εικόνες με το συνολικό αριθμό των κυττάρων να φτάνει τα 50 για κάθε συνθήκη ($n=50$, **** $P < 0.0001$). Για κάθε κύτταρο υπολογίστηκε το CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence), το οποίο κανονικοποιήθηκε ως προς το συνολικό CTCF του πυρήνα και η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς την νορμοξία. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος GraphPad-Prism6.

5.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος

Όπως προαναφέρθηκε, έρευνα στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της κ. Φιλιπποπούλου έδειξε πως η EXOSC10 εμπλέκεται στη προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία μέσω της επίδρασης που έχει η μείωση της σουμυλίωσης της σε mRNA, τα οποία αποτελούν στόχους της υποξίας.

Προκειμένου να εξηγηθεί η προτίμηση της μη σουμοϋλιωμένης EXOSC10 σε διαφορετικά mRNA υποστρώματα υποθέτουμε πως η σουμοϋλίωση/αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 πιθανά επηρεάζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της με τις δομικές ή λειτουργικές πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος ή με RNA υποστρώματα. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν οι πρωτεΐνες ή παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το εξώσωμα περιέχουν SIM (SUMO interacting motifs) περιοχές, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν ασθενικά και μη ομοιοπολικά με τη SUMO πρωτεΐνη που φέρει η EXOSC10 (εικόνα 32). Με αυτό τον τρόπο πιθανώς αυτή η αλληλεπίδραση να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην προσάρτηση συμπαραγόντων στο εξώσωμα όσο και στην αναγνώριση αλλά και στην αλληλεπίδραση συγκεκριμένων RNA (π.χ. των mRNA-στόχων της υποξίας) στο εξώσωμα.



Εικόνα 32: Πιθανό μοντέλο αλληλεπίδρασης της EXOSC10 και των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος μέσω SUMO-SIM αλληλεπιδράσεων.

5.2.1 Εύρεση περιοχών SIM (SUMO interacting motifs) στις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος

Για να διαπιστωθεί αν ισχύει η παραπάνω υπόθεση έγινε αρχικά εντοπισμός πιθανών περιοχών SIM στην δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών του εξωσώματος με τη χρήση των προγραμμάτων βιοπληροφορικής GPS-SUMO (72) και JASSA (73) (βλ. Μέθοδοι 4.2.8). Έγινε ανάλυση για τις δομικές

υπομονάδες EXOSC2 και EXOSC3, την καταλυτική υπομονάδα DIS3 και των συμπαραγόντων MTR4, MPP6 και C1D.

MTR4: Στις εικόνες 33 και 14 φαίνονται τα αποτελέσματα για τις πιο πιθανές περιοχές SIM, που μπορεί να διαθέτει η MTR4. Οι πιθανές περιοχές (υψηλό σκόρ) είναι οι 534-538, η οποία επιβεβαιώνεται και από τα 2 προγράμματα βιοπληροφορικής (GPS-SUMO score: 0.9127 / JASSA score: 4.463) 270-273 (JASSA score: 1.748) και 695-698, η οποία επίσης επιβεβαιώνεται και από τα 2 προγράμματα βιοπληροφορικής (JASSA score: 3.029 / GPS-SUMO score: 0.7176). Οι λιγότερο πιθανές περιοχές (μεσαίο σκόρ) είναι οι 157-161, 623-627, 389-393, 673-677 και 328-332 (GPS-SUMO score: 0.6239-0.7996). Το JASSA δεν δίνει αποτελέσματα με μεσαίο σκόρ, ενώ και τα 2 προγράμματα δίνουν και πιθανές περιοχές με χαμηλό όμως σκόρ, τα οποία δεν παρουσιάζονται.

ID	Position	Peptide	Score	Cut-off	Type	Source
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	534-538	RGMDDRG IVILM VDEKMSP	0.9127	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	157-161	CVDNNQ SVLVSA HTSAGKT	0.7996	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	623-627	VIPNEES VVIYY KIRQQLA	0.7728	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	389-393	MERNFQ PVIIFS SKKDCE	0.7575	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	693-697	NSGELD PLYVVE VLLRCSK	0.7176	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	673-677	GDDFGW GVVNF SKKSNVK	0.6621	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_056175.3 exosome RNA helicase MTR4 [Homo sapiens]	328-332	FPAGGD LHLV DENGDFR	0.6239	0.5	SUMO interaction	Pred.

Εικόνα 33: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη MTR4. Απεικονίζονται το όνομα της πρωτεΐνης, ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score, το cut-off, ο τύπος και η πηγή. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι η περιοχή με το υψηλότερο σκόρ.

Position site	Sequence	Type	a/S stretch	PS
AA 270-273	RGVVWEET IILL PDNVHYVF	SIM Type β	[N][SIM][N]	2.784
AA 534-537	RRGMDDRG IVIL MVDEKMSF	SIM Type β	[N][SIM][N]	4.463
AA 695-698	SGELDPLY VVEV LLRCSKES	SIM Type β	[Y][SIM][Y]	3.029

Εικόνα 34: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη MTR4. Απεικονίζονται ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score και ο τύπος SIM.

EXOSC3: Στην εικόνα 35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των πιο πιθανών περιοχών SIM στη πρωτεΐνη EXOSC3. Οι περιοχές με το πιο υψηλό σκορ και πιο πιθανές να εμφανίζουν SIM αλληλουχία είναι οι 117-121 και 159-163 (GPS-SUMO score: 0.9534 και 0.9322). Μεσαίο σκορ εμφάνισαν οι 63-67, 34-38 και 23-37 (GPS-SUMO score: 0.52-0.796). Το πρόγραμμα JASSA δεν επιβεβαίωσε τις παραπάνω πιθανές SIM περιοχές. Εμφανίστηκε μια διαφορετική πιθανή περιοχή μόνο με χαμηλό σκορ, η οποία δεν παρουσιάζεται.

ID	Position	Peptide	Score	Cut-off	Type	Source
NP_057126.2 exosome complex component RRP40 isoform 1 [Homo sapiens]	117-121	VPVKG DH VIG I VTAKSGDI	0.9534	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_057126.2 exosome complex component RRP40 isoform 1 [Homo sapiens]	159-163	RNRPNVQ V GD L IYGFVVA	0.9322	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_057126.2 exosome complex component RRP40 isoform 1 [Homo sapiens]	63-67	NARACSR V R V CGPGLRRC	0.796	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_057126.2 exosome complex component RRP40 isoform 1 [Homo sapiens]	34-38	VVLPGE E LL L PEQEDAEGP	0.5641	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_057126.2 exosome complex component RRP40 isoform 1 [Homo sapiens]	23-27	RARAART V L G Q V VLPGEEL	0.52	0.5	SUMO interaction	Pred.

Εικόνα 35: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη EXOSC3. Απεικονίζονται το όνομα της πρωτεΐνης, ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score, το cut-off, ο τύπος και η πηγή. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι οι περιοχές με το υψηλότερο σκορ.

DIS3: Τα αποτελέσματα για την εύρεση των πιο πιθανών περιοχών της DIS3 αποτυπώνονται στις εικόνες 36 και 37. Οι πιο πιθανές περιοχές με υψηλό σκορ είναι οι 88-91, 860-863, 861-864 σύμφωνα με το JASSA, υψηλό score: 17.448, 5.132 και 2.169 αντίστοιχα). Το GPS-SUMO επιβεβαίωσε μόνο τη θέση 860-864 (μεσαίο score: 0.7854) και έδωσε και άλλες πιθανές περιοχές με μεσαίο σκορ: 785-789, 540-544, 291-295, 852-856, 207-211, 16-20 και 275-279 (GPS-SUMO score: 0.5029-0.7141).

ID	Position	Peptide	Score	Cut-off	Type	Source
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	860-864	LFVVRKNAIVVLIIPKYGLEG	0.7854	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	785-789	PIRRYADVIVHRLLAIVAIG	0.7141	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	540-544	CEKRIDMVFELLSSNLCSL	0.6757	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	291-295	NRAVHEDIVAVELLPKRSQW	0.5784	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	852-856	IVSEEAYILFVRKNAIVVL	0.5748	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	207-211	SLTANPELIDRLACLSEEG	0.5268	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	16-20	KKTRAGGVMKIVREHYLRD	0.5222	0.5	SUMO interaction	Pred.
NP_055768.3 exosome complex exonuclease RRP44 isoform a [Homo sapiens]	275-279	DNEENKEIILQGLKHLNRA	0.5029	0.5	SUMO interaction	Pred.

Εικόνα 36: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη DIS3. Απεικονίζονται το όνομα της πρωτεΐνης, ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score, το cut-off, ο τύπος και η πηγή.

Position site	Sequence	Type	a/S stretch	PS
AA 88-91	LEDPAIRNIVIVLQTVLQEV	SIM Type β	[N][SIM][N]	27.448
AA 860-863	ILFVVRKNAIVVLIIPKYGLEG	SIM Type β	[N][SIM][N]	5.132
AA 861-864	LFVVRKNAIVVLIIPKYGLEGT	SIM Type β	[N][SIM][N]	2.169

Εικόνα 37: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη DIS3. Απεικονίζονται ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score και ο τύπος SIM.

MPP6: Στην εικόνες 38 και 39 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εύρεση πιθανών περιοχών SIM στην MPP6. Περιοχές με υψηλό σκορ δεν

βρέθηκαν σε κανένα από τα 2 προγράμματα. Οι περιοχές με μεσαίο σκορ είναι οι 70-74, 248-252, 77-81, 433-437, 201-205 και 168-172 (GPS-SUMO score: 0.5459-0.7308) και η 506-509 (JASSA score: 1.950). Επίσης και τα 2 προγράμματα δίνουν αποτελέσματα με χαμηλό σκορ, τα οποία δεν παρουσιάζονται.

ID	Position	Peptide	Score	Cut-off	Type	Source
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	70-74	ILEDITPLINVDENVAELV	0.7308	0.5	SUMO interaction	Pred.
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	248-252	LKFSKGEILQIVNREDPNW	0.6294	0.5	SUMO interaction	Pred.
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	77-81	LINVDENVAELVGILKEPH	0.6291	0.5	SUMO interaction	Pred.
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	433-437	VQTGRTCILDVNPQALKVL	0.6176	0.5	SUMO interaction	Pred.
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	201-205	LKNISGSVTLKILPSYRDT	0.6082	0.5	SUMO interaction	Pred.
AAH23638.1 MPP6 protein [Homo sapiens]	168-172	GMIDRQGLLHVGDIIKEVN	0.5459	0.5	SUMO interaction	Pred.

Εικόνα 38: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη MPP6. Απεικονίζονται το όνομα της πρωτεΐνης, ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score, το cut-off, ο τύπος και η πηγή.

Position site	Sequence	Type	a/S stretch	PS
AA 506-509	RAYNHYFDLIIINDNLDKAF	SIM Type 3	[N][SIM][N]	1.950

Εικόνα 39: Διεξαγωγή βιοπληροφορικής έρευνας για την εύρεση πιθανών SIM (SUMO interacting motifs) στη πρωτεΐνη MPP6. Απεικονίζονται ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής, η αλληλουχία της περιοχής, το score και ο τύπος SIM.

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τις πρωτεΐνες EXOSC2 και C1D. Οι πιθανές περιοχές που έδιναν τα προγράμματα για την EXOSC2 ήταν με χαμηλό σκορ (δεν παρουσιάζονται), ενώ για την C1D δεν βρέθηκε καμία πιθανή περιοχή SIM. Τα αποτελέσματα από όλες τις πρωτεΐνες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 1. Προκύπτει πως οι πρωτεΐνες MTR4 και DIS3 είναι πιο πιθανό να περιέχουν SIM (όπως επιβεβαιώνεται από τα 2 προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης). Επίσης η πρωτεΐνη EXOSC3 φαίνεται να έχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης SIM (όπως επιβεβαιώνεται από το GFP-SUMO). Οι πρωτεΐνες αυτές πιθανά να αλληλεπιδρούν με την

EXOSC10 μέσω της SUMO1 όταν η EXOSC10 βρίσκεται στη σουμυλιωμένη της μορφή.

Πίνακας 9: Συνολικά αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Αναγράφονται ο αριθμός των πιθανών περιοχών SIM για κάθε πρόγραμμα και για υψηλό και μεσαίο σκορ και οι περιοχές, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από τα 2 προγράμματα βιοπληροφορικής.

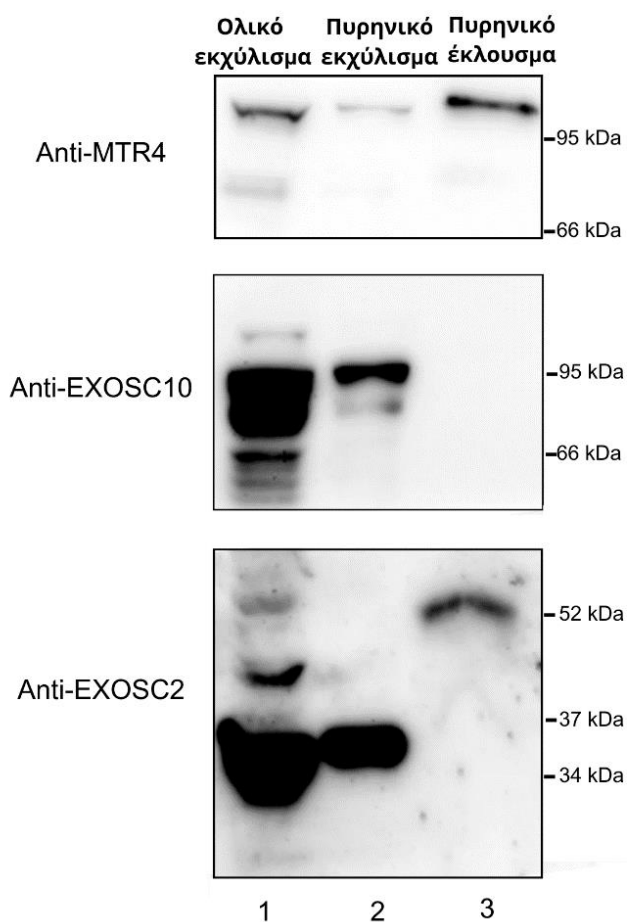
Πρωτεΐνες	Αριθμός SIM περιοχών				Περιοχές SIM (επιβεβαίωση και από τα 2 προγράμματα)	
	SUMO-GPS (υψηλό σκορ)	SUMO-GPS (μεσαίο σκορ)	JASSA (υψηλό σκορ)	JASSA (μεσαίο σκορ)	Περιοχή	Αμινοξέα
EXOSC2	--	--	--	--	--	--
EXOSC3	2	3	--	--	--	--
DIS3	--	8	3	--	860-864	IVVLI
MTR4	1	6	3	--	534-538	IVILM
MPP6	--	6	--	1	--	--
C1D	--	--	--	--	--	--

5.2.2 Ανοσοκατακρήμιση ενδογενούς MTR4 για έλεγχο αλληλεπίδρασης με την EXOSC10

Με βάση τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (βλ. 5.2.1) η MTR4 είναι πιο πιθανό να αλληλεπιδρά μέσω SIM περιοχών με την EXOSC10 και άρα να επηρεάζεται η αλληλεπίδρασή της με την EXOSC10 λόγω αποσομυλιώσής της από την υποξία. Για να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση πραγματοποιήθηκε αρχικά ένα πυλωτικό πείραμα ανοσοκατακρήμισης ενδογενούς MTR4 απο πυρηνικά εκχυλίσματα για τον έλεγχο αλληλεπίδρασή της με την EXOSC10 (βλ. Μέθοδοι 4.2.6). Έγινε κυτταρική λύση και απομόνωση (fractionation) του πυρηνικού εκχυλίσματος (βλ. Μέθοδοι 4.2.6.1). Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση σφαιριδίων που φέρουν συζευγμένο ειδικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς MTR4 και έγινε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Το έκλουσμα και τα δείγματα ολικού και πυρηνικού εκχυλίσματος, τα οποία φυλάχθηκαν πριν τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμισης, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.3) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 4.2.4). Έγινε χρήση των αντισωμάτων έναντι των MTR4, EXOSC10 και μιας δομικής πρωτεΐνης του

εξωσώματος της EXOSC2 που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την MTR4 (105). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 40.

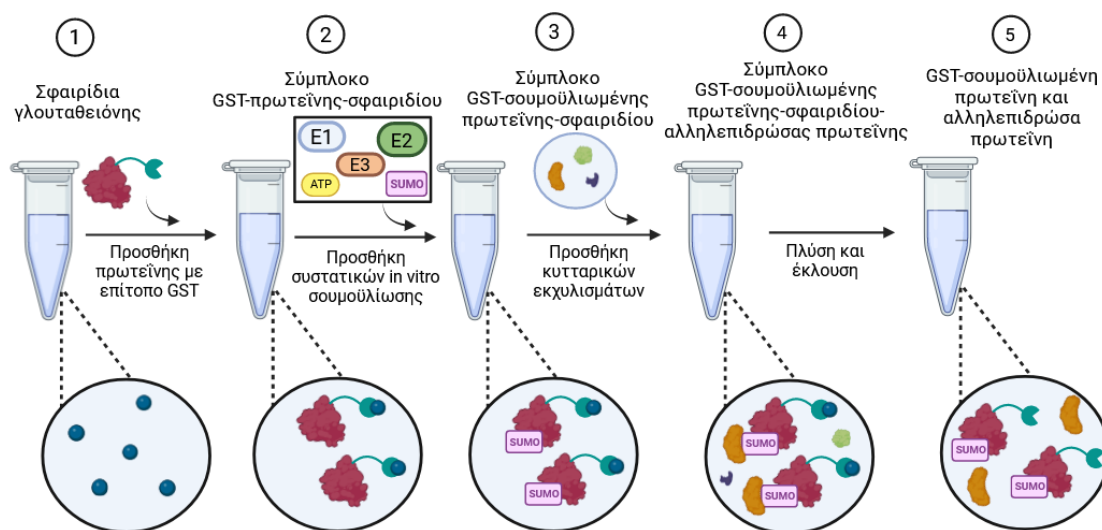
Ανάλυση των ολικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων έδειξε αρχικά την έκφραση των ενδογενών πρωτεϊνών MTR4, EXOSC10 και EXOSC2 (διαδρομές 1 και 2) στα αναμενόμενα μοριακά βάρη (MTR4, 118 kDa) (EXOSC10, 100 kDa) (EXOSC2, 33 kDa). Η ανάλυση των εκλουσμάτων έδειξε ότι παρόλο που κατακρημνίστηκε σημαντική ποσότητα της MTR4 στο αναμενόμενο MB δεν συγκατακρημνίστηκε ούτε η EXOSC2 όπως αναμενόταν αλλά ούτε και η EXOSC10 που μαρτυρά πιθανό τεχνικό πρόβλημα είτε στην λύση είτε στην ανοσοκατακρήμνιση που μπορεί να οδήγησε στην διάσπαση των συμπλόκων.



Εικόνα 40: Αποτελέσματα ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά Western πυρηνικού εκχυλίσματος μετά από ανοσοκατακρήμνιση με anti-MTR4. Απεικονίζονται οι αναλύσεις από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και πυρηνικά εκχυλίσματα (διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα) Επίσης απεικονίζονται οι αναλύσεις από το πυρηνικό έκλουσμα (διαδρομή 3). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών MTR4 (118 kDa), EXOSC10 (100 kDa) και EXOSC2 (33 kDa).

5.2.3 Συγκατακρήμιση χιμαιρικών σουμοϋλιωμένων και μη σουμοϋλιωμένων GST-EXOSC10 πρωτεϊνών με πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος

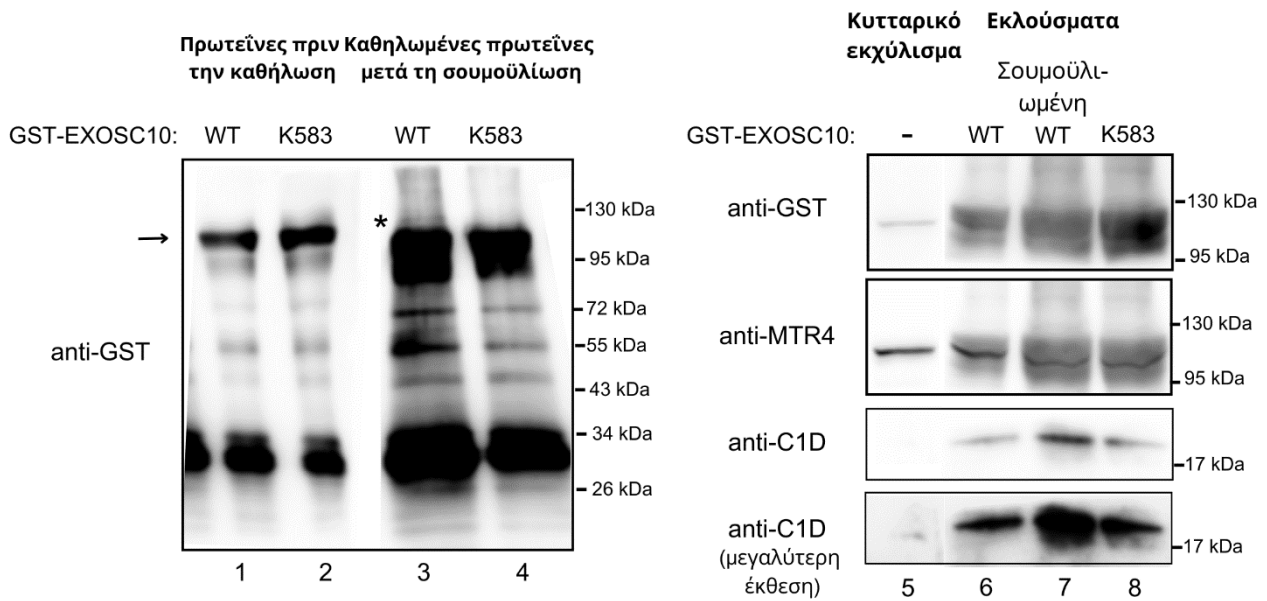
Για τον έλεγχο του ρόλου της σουμοϋλίωσης στην αλληλεπίδραση της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη προσέγγιση *in vitro* συγκατακρήμισης (βλ. Μέθοδοι 4.2.7). Καθαρισμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-EXOSC10 WT και K583 (μη σουμοϋλιωμένο μετάλλαγμα) καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης (εικόνα 41, βήμα 1). Στις καθηλωμένες μορφές της GST-EXOSC10 πραγματοποιήθηκε *in vitro* σουμοϋλίωση σύμφωνα με γνωστό δημοσιευμένο πρωτόκολλο (εικόνα 41, βήμα 2) (123). Στη συνέχεια εκχυλίσματα, τα οποία περιέχουν τις ενδογενείς πρωτεΐνες του εξωσώματος, από κύτταρα HeLa επωάστηκαν με τα σφαιρίδια, στα οποία είναι συνδεδεμένες οι μορφές της GST-EXOSC10 μετά τη σουμοϋλίωση (εικόνα 41, βήμα 3). Τέλος τα δείγματα (*inputs*) που λήφθηκαν και τα εκλούσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (βλ. Μέθοδοι 4.2.2.3), και ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Μέθοδοι 4.2.4). Έγινε χρήση των ειδικών αντισωμάτων έναντι του επίτοπου GST, για την ανίχνευση των EXOSC10 μορφών, της πρωτεΐνης MTR4 και της πρωτεΐνης C1D.



Εικόνα 41: Απεικόνιση συνοπτικής διαδικασίας της μεθόδου της συγκατακρήμισης (Δημιουργήθηκε με το *bioRender.com*)

Στην εικόνα 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Αρχικά φαίνονται οι πρωτεΐνες πριν την καθήλωση, δηλαδή οι καθαρισμένες GST-EXOSC10 WT

και K583, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως control (διαδρομή 1 και 2, ζώνες στα 100 kDa με βελάκι). Η επίτευξη της σουμοϋλίωσης των GST-EXOSC10 επιβεβαιώνεται από την ανάλυση δειγμάτων των πρωτεϊνών μετά το βήμα της *in vitro* σουμοϋλίωσης (διαδρομές 3 και 4). Συγκεκριμένα παρατηρείται μία αχνή ζώνη (διαδρομή 3, ζώνες στα 120 kDa με αστερίσκο) λίγο πιο πάνω από τη ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της EXOSC10 (100 kDa), που δείχνει την μη στοιχειομετρική σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης. Επίσης δείγμα από κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε ως control της έκφρασης των ενδογενών MTR4 και C1D (διαδρομή 5). Παρατηρούνται ζώνες που αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος των ενδογενών πρωτεϊνών MTR4 (118 kDa) και C1D (16 kDa) (εμφανής στη μεμβράνη μετά από μεγαλύτερη έκθεση). Όσον αφορά την ανάλυση των εκλουσμάτων (διαδρομές 6-8) παρατηρείται κατακρήμνιση των GST-EXOSC10 στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της EXOSC10, όμως δεν παρατηρείται η σουμοϋλιωμένη μορφή 20 kDa παραπάνω στη διαδρομή 7, μάλλον λόγω μικρής ποσότητας. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως συγκατακρημνίστηκε MTR4 και C1D και στις 3 συνθήκες (όπως δείχθηκε με αντισώματα έναντι των MTR4 και C1D) Το σήμα για την MTR4 φαίνεται να μην αλλάζει ανάμεσα στα εκλούσματα (διαδρομές 6, 7 και 8). Το σήμα για την C1D φαίνεται να είναι πιο ισχυρό στο έκλουσμα της σουμοϋλιωμένης GST-EXOSC10 WT (διαδρομή 7) σε σχέση με τα εκλούσματα της μη σουμοϋλιωμένης GST-EXOSC10 WT (διαδρομή 6) και της GST-EXOSC10 K583 (διαδρομή 8).



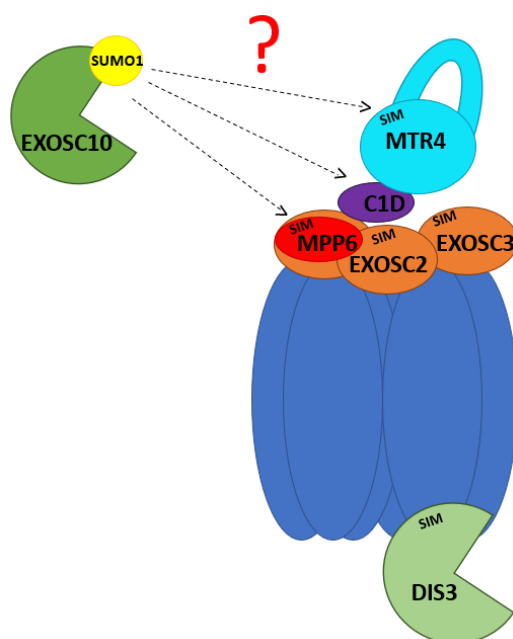
Εικόνα 42: Αποτελέσματα ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά Western μετά από δοκιμή συγκατακρήμνισης και σουμοϋλίωσης των GST-EXOSC10 μορφών. Αριστερά απεικονίζονται οι αναλύσεις των καθαρισμένων πρωτεϊνών GST-EXOSC10 πριν την καθήλωση σε σφαιρίδια (διαδρομές 1 και 2) και των καθηλωμένων πρωτεϊνών μετά τη σουμοϋλίωση (διαδρομές 3 και 4). Δεξιά απεικονίζονται οι αναλύσεις του κυτταρικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (διαδρομή 5) και σε εκλούσματα μετά την επώαση με τις 3 μορφές της EXOSC10 (μη σουμοϋλιωμένη WT, σουμοϋλιωμένη WT και K583) (διαδρομές 6, 7 και 8). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα έναντι του επίτοπου GST για την ανίχνευση των EXOSC10 (100 kDa) μορφών και έναντι των MTR4 (118 kDa) και C1D (16 kDa).

6.Συζήτηση

Ως υποξία χαρακτηρίζεται η μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου σε κύτταρα και ιστούς. Απαντάται τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις στους οργανισμούς όσο και σε παθολογικές όπως είναι στον καρκίνο και συγκεκριμένα στο κέντρο των συμπαγών όγκων (1). Κύριοι ρυθμιστές της υποξίας είναι οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors) (13). Το μονοπάτι της υποξίας έχει δείχθει πως ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η σουμοϋλίωση. Παράλληλα τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί η αλλαγή των επιπέδων σουμοϋλίωσης διαφόρων πρωτεϊνών από την υποξία με πιθανούς ρόλους στην επιβίωση και προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η σουμοϋλίωση της EXOSC10 μιας πρωτεΐνης του RNA εξωσώματος μειώνεται στην υποξία, ενώ τα πρωτεϊνικά της επίπεδα δεν μεταβάλλονται (100). Παρόλο που είναι γνωστές μη μεταγραφικές αποκρίσεις στην υποξία που εμπλέκουν την αποικοδόμηση του mRNA (39), (40) δεν υπήρχε προηγουμένως καμία σύνδεση μεταξύ της υποξίας και αλλαγών στα ένζυμα αποικοδόμησης του RNA όπως ο EXOSC10.

Τελευταία δεδομένα του εργαστηρίου μας (Filippopoulou et al, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546038>, CMLS 2023 under review), δείχνουν πως η εξαρτώμενη από την υποξία απώλεια της σουμοϋλίωσης είναι απόρροια της μετακίνησης της EXOSC10 από τους πυρηνίσκους στο πυηνόπλασμα των κυττάρων κατά την υποξία και αποσύνδεσή της από την SUMO ειδική E3 λιγάση της. Επιπρόσθετα στην ίδια μελέτη φάνηκε πως η μείωση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 ρυθμίζει (αυξορυθμίζει ή μειορυθμίζει) διάφορα mRNA, τα οποία αποτελούν στόχους της υποξίας, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο η απώλεια σουμοϋλίωσης του EXOSC10 επηρεάζει ή σταθεροποιεί τα mRNA. Η πρωτεΐνη EXOSC10 είναι γνωστό πως αποτελεί μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του RNA εξωσώματος, το οποίο είναι ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Κύριες λειτουργίες του RNA εξωσώματος είναι η επεξεργασία και η αποικοδόμηση διαφόρων RNA του κυττάρου (107). Προκειμένου να εξηγηθεί η προτίμηση της μη σουμοϋλιωμένης EXOSC10 σε διαφορετικά mRNA υποστρώματα υποθέτουμε πως η σουμοϋλίωση/αποσουμοϋλίωση της EXOSC10 πιθανά επηρεάζει τις

πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της με τις δομικές ή λειτουργικές πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος ή με RNA υποστρώματα. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν οι πρωτεΐνες ή παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το εξώσωμα περιέχουν SIM (SUMO interacting motifs) περιοχές, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν ασθενικά και μη ομοιοπολικά με τη SUMO πρωτεΐνη που φέρει η EXOSC10 (εικόνα 43). Με αυτό τον τρόπο πιθανώς αυτή η αλληλεπίδραση να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην προσάρτηση συμπαραγόντων στο εξώσωμα όσο και στην αναγνώριση αλλά και στην αλληλεπίδραση συγκεκριμένων RNA. Πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση πιθανών περιοχών SIM στις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος και πράγματι δείχθηκε πως πρωτεΐνες κυρίως του καπακιού εμφανίζουν SIM περιοχές (MTR4 με μεγαλύτερη πιθανότητα, EXOSC3 και MPP6 με λιγότερη πιθανότητα) (εικόνα 43).



Εικόνα 43: Πιθανό πρότυπο μοντέλο αλληλεπίδρασης EXOSC10 με τις πρωτεΐνες του RNA εξωσώματος μέσω της SUMO-SIM αλληλεπιδράσεων. Όλες οι πρωτεΐνες φάνηκε να διαθέτουν SIM περιοχές εκτός της C1D. Κυρίως παρουσιάστηκαν στις πρωτεΐνες του καπακιού του RNA εξωσώματος με μεγαλύτερη πιθανότητα στη MTR4 και με μικρότερη στις MPP6 και EXOSC3.

Επιπλέον πειράματα μελέτης της έκφρασης και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών του RNA εξωσώματος έδειξαν πως ενώ δεν αλλάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα δομικών (EXOSC2 και EXOSC3) καταλυτικών (DIS3)

υπομονάδων του PNA εξωσώματος και παραγόντων που αλληλεπιδρούν με το εξώσωμα (MTR4, MPP6 και C1D), φάνηκε πως η υποξία επηρέασε και άλλαξε τον εντοπισμό των συμπαράγοντων MTR4 και MPP6. Συγκεκριμένα η αλλαγή που παρουσιάστηκε για τον συμπαράγοντα MTR4 ήταν η ενίσχυση του σήματος σε κυτταροπλασματικά κοκκία κατά την υποξία, χωρίς βέβαια αυτή η αλλαγή να είναι στατιστικώς σημαντική. Η σημαντικότερη αλλαγή ήταν η στατιστικώς σημαντική μετακίνηση της MPP6 από του πυρηνίσκους στο πυρηνόπλασμα κατά την υποξία,. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως η MPP6 φαίνεται να ακολουθεί τη συμπεριφορά της EXOSC10 κατά την υποξία (μετακίνηση από τους πυρηνίσκους στο κυτταρόπλασμα, Filipporoulou et al, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546038>, CMLS 2023 under review). Στις υπόλοιπες πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στον εντοπισμό. Στον ανοσοφθορισμό παρατηρήθηκαν και κάποια τεχνικά θέματα που χρήζουν επανεξέταση. Παράδειγμα αποτελούν οι δομικές πρωτεΐνες EXOSC2 και EXOSC3 για της οποίες παρόλο που δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στο σήμα που έδιναν, φαινόταν να μην είναι ειδικό. Πιθανώς αυτό το γεγονός να οφείλεται στη μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων έναντι των EXOSC2 και EXOSC3, που χρησιμοποιήθηκαν. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα θα ήταν η επανάληψη των πειραμάτων με τη χρήση siRNA έναντι των EXOSC2 και EXOSC3, ώστε να πιστοποιηθεί εάν το σήμα είναι ειδικό ή μη. Επίσης και για τον συμπαράγοντα C1D, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε αλλαγή, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός που παρουσιάζονται στα αποτελέσματά μας δεν συνάδουν με τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα στα αποτελέσματά μας το σήμα της C1D είναι κυρίως πυρηνοπλασματικό, ενώ στη βιβλιογραφία ο εντοπισμός της είναι εστιασμένος στους πυρηνίσκους. Συνεπώς για την πιστοποίηση του σήματος είναι απαραίτητη η χρήση περισσότερων και διαφορετικών αντισωμάτων έναντι της C1D.

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης και της αλλαγής του προτύπου εντοπισμού των πρωτεϊνών σε υποξία δείχνουν πως οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε σύμπλοκο στο καπάκι του εξωσώματος επηρεάζονται πιθανά από την εξαρτώμενη από υποξία αλλαγή του πρότυπου σουμοϋλίωσης της EXOSC10 και ίσως αυτό να οδηγεί σε μείωση της αλληλεπίδρασης τους και αλλαγή τοπολογίας. Για να διερευνηθεί ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις αλληλεπιδράσεις της EXOSC10 με τα σύμπλοκα του καπακιού

πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της ενδογενούς MTR4, τα οποία δεν έδειξαν αλληλεπίδραση της MTR4 με την EXOSC10. Αυτό το αποτέλεσμα βέβαια πιθανώς να οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα (π.χ. κατά τη λύση ή την ανοσοκατακρήμνιση προκλήθηκε διάσπαση των συμπλόκων). Επομένως θα χρειαστούν επαναλήψεις του πειράματος και ίσως κάποιες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου καθώς και του διαλύματος κατακρήμνισης για να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Τέλος προς την ίδια κατεύθυνση πραγματοποιήθηκε ένα δοκιμαστικό πείραμα συγκατακρήμνισης τριών μορφών της EXOSC10, σουμοϋλιωμένης, μη σουμοϋλιωμένης (EXOSC10 WT) και μη-σουμουλιωμένης λόγω μετάλλαξης (EXOSC10 K583) με ενδογενείς συμπαράγοντες του καπακίου του εξωσώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών μορφών της EXOSC10 με τις πρωτεΐνες MTR4 και C1D όπως ήταν αναμενόμενο από την βιβλιογραφία (105). Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ενώ η αλληλεπίδραση της MTR4 και των μορφών της EXOSC10 δεν επηρεάστηκε, η αλληλεπίδραση μεταξύ της C1D και της σουμοϋλιωμένης μορφής EXOSC10 φάνηκε να είναι πιο ισχυρή, από ότι με τις μη σουμοϋλιωμένες μορφές. Αυτό είναι περίεργο εκ πρώτης όψεως καθώς η C1D δεν διαθέτει πιθανές περιοχές SIM. Παρόλα αυτά διαθέτουν SIM περιοχές οι MTR4 και MPP6, οι οποίες βρίσκονται σε κοινό σύμπλοκο με την EXOSC10 και τη C1D. Είναι πιθανό λοιπόν έμμεσα να επηρεάζεται η σύνδεση της C1D με την EXOSC10 στην υποξία είτε λόγω αλλαγή της στερεοδιάταξης των EXOSC10 και MTR4 είτε λόγω αλλαγής εντοπισμού της MTR4 και της MPP6. Επανάληψη του πειράματος και ανοσοκατακρήμνιση και άλλων συμπαράγοντων του RNA εξωσώματος σε νορμοξία και υποξία θα δώσει περισσότερες απαντήσεις.

Συμπερασματικά στη συγκεκριμένη εργασία εντοπίστηκαν αλλαγές στην τοπολογία και αλληλεπίδραση των συμπαράγοντων του RNA εξωσώματος σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, το οποίο πιθανά να είναι αποτέλεσμα της εξαρτώμενης από την υποξία αποσουμουλίωσης της EXOSC10.

Μελλοντικά είναι σημαντικό να γίνουν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των ενδογενών παραγόντων EXOSC10, MTR4, MPP6 και C1D σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Η περαιτέρω έρευνα για την αλληλεπίδραση μεταξύ της EXOSC10 και των πρωτεϊνών του εξωσώματος καθώς και για το ρόλο που διαθέτει η σουμοϋλίωση σε αυτή κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική καθώς μπορεί να

εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο η μείωση της σουμοϋλίωσης της EXOSC10 επηρεάζει την αποικοδόμηση για παράδειγμα των διαφόρων mRNA-στόχων της υποξίας. Έτσι θα διαλευκανθεί ο πλήρης ρόλος της EXOSC10 στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία. Η διαλεύκανση του συγκεκριμένου μονοπατιού κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη νέων μελλοντικών φαρμακολογικών προσεγγίσεων και στοχευμένης θεραπείας σε ασθένειες που εμπλέκεται η υποξία όπως ο καρκίνος.

Βιβλιογραφία

1. Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(5), 268-283.
2. Bhutta, B. S., Alghoula, F., & Berim, I. (2022). Hypoxia. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
3. Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5703.
4. Wu, D., Cao, W., Xiang, D., Hu, Y. P., Luo, B., & Chen, P. (2020). Exercise induces tissue hypoxia and HIF-1 α redistribution in the small intestine. *Journal of sport and health science*, 9(1), 82-89.
5. Haron, A., Ruzal, M., Shinder, D., & Druyan, S. (2021). Hypoxia during incubation and its effects on broiler's embryonic development. *Poultry Science*, 100(3), 100951.
6. Lee, H. J., Jung, Y. H., Choi, G. E., Kim, J. S., Chae, C. W., & Han, H. J. (2019). Role of HIF1 α regulatory factors in stem cells. *Int. J. Stem Cells*, 12, 8-20.
7. Liu, Y. Y., Chiang, C. H., Hung, S. C., Chian, C. F., Tsai, C. L., Chen, W. C., & Zhang, H. (2017). Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced lung injury. *Plos one*, 12(11), e0187637.
8. Bader, A. M., Klose, K., Bieback, K., Korinth, D., Schneider, M., Seifert, M., ... & Stamm, C. (2015). Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *PLoS One*, 10(9), e0138477.
9. Viallard, C., & Larrivée, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426.
10. Paredes, F., Williams, H. C., & San Martin, A. (2021). Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Cancer letters*, 502, 133-142.
11. Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6140.
12. Luo, Z., Tian, M., Yang, G., Tan, Q., Chen, Y., Li, G., ... & Wu, J. (2022). Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 218.
13. Saint-Martin, A., Castañeda-Patlán, M. C., & Robles-Flores, M. (2017). The role of hypoxia inducible factors in cancer resistance. *J Cell Signal*, 2(154), 2576-1471.
14. Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-5454.
15. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, et al. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414: 550-554.
16. Maynard, M. A., & Ohh, M. (2007). The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 64, 2170-2180.
17. Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & cancer*, 2(12), 1117-1133.
18. Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology*.
19. Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., ... & Ratcliffe, P. J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
20. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... & Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.
21. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*, 16(12), 1466-1471.
22. Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*, 30(4), 393-402.

23. Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., & Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11205-11214.
24. Wenger, R. H., Stiehl, D. P., & Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE*, 2005(306), re12-re12.
25. Albanese, A., Daly, L. A., Mennerich, D., Kietzmann, T., & Sée, V. (2020). The role of hypoxia-inducible factor post-translational modifications in regulating its localisation, stability, and activity. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 268.
26. Papadakis A.I., Paraskeva E., Peidis P., Muaddi H., Li S., Raptis L., Pantopoulos K., Simos G., Koromilas A.E. eIF2 α Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 α *Cancer Res.* 2010;70:7820–7829.
27. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000;60:1541–5.
28. Geng, H., Liu, Q., Xue, C., David, L. L., Beer, T. M., Thomas, G. V., ... & Qian, D. Z. (2012). HIF1 α protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35496-35505.
29. Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J., & Kim, K. W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 394-400.
30. Li, J., Xu, Y., Long, X. D., Wang, W., Jiao, H. K., Mei, Z., ... & Chen, G. Q. (2014). Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity. *Cancer cell*, 25(1), 118-131.
31. Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouysségur, J., & Brahimi-Horn, M. C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(3), 646-652.
32. Kang, X., Li, J., Zou, Y., Yi, J., Zhang, H., Cao, M., ... & Cheng, J. (2010). PIASy stimulates HIF1 α SUMOylation and negatively regulates HIF1 α activity in response to hypoxia. *Oncogene*, 29(41), 5568-5578.
33. Filippopoulou, C., Simos, G., & Chachami, G. (2020). The role of sumoylation in the response to hypoxia: an overview. *Cells*, 9(11), 2359.
34. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., ... & Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular cell*, 11(4), 1043-1054.
35. Kuo, H. Y., Chang, C. C., Jeng, J. C., Hu, H. M., Lin, D. Y., Maul, G. G., ... & Shih, H. M. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 16973-16978.
36. Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E. T., ... & Yi, J. (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 deSUMOylation. *The EMBO journal*, 28(18), 2748-2762.
37. Núñez-O'Mara, A., Gerpe-Pita, A., Pozo, S., Carlevaris, O., Urzelai, B., Lopitz-Otsoa, F., ... & Berra, E. (2015). PHD3–SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity. *Journal of Cell Science*, 128(1), 40-49.
38. Sallais, J., Alahari, S., Tagliaferro, A., Bhattacharjee, J., Post, M., & Caniggia, I. (2017). Factor inhibiting HIF1–A novel target of SUMOylation in the human placenta. *Oncotarget*, 8(69), 114002.
39. Goetz, A. E., & Wilkinson, M. (2017). Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 3509-3531.
40. Bauer, R., Meyer, S. P., Kloss, K. A., Guerrero Ruiz, V. M., Reuscher, S., Zhou, Y., ... & Brüne, B. (2022). Functional RNA Dynamics Are Progressively Governed by RNA Destabilization during the Adaptation to Chronic Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5824.
41. Wang, Y., & Dasso, M. (2009). SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *Journal of cell science*, 122(23), 4249-4252.

42. Han, Z. J., Feng, Y. H., Gu, B. H., Li, Y. M., & Chen, H. (2018). The post-translational modification, SUMOylation, and cancer. *International journal of oncology*, 52(4), 1081-1094.
43. Matunis, M. J., Coutavas, E., & Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*, 135(6), 1457-1470.
44. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., & Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88(1), 97-107.
45. van der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annual review of biochemistry*, 81, 323-357.
46. Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., & Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology*, 280(2), 275-286.
47. Chang, H. M., & Yeh, E. T. (2020). SUMO: from bench to bedside. *Physiological Reviews*, 100(4), 1599-1619.
48. Yeh, E. T., Gong, L., & Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*, 248(1-2), 1-14.
49. Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., & Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35368-35374.
50. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Fukuda-Kamitani, T., & Yeh, E. T. (1998). Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11349-11353.
51. Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T., Gabbay, K. H., & Bohren, K. M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(2), 517-520.
52. Liang, Y. C., Lee, C. C., Yao, Y. L., Lai, C. C., Schmitz, M. L., & Yang, W. M. (2016). SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies. *Scientific reports*, 6(1), 26509.
53. Vertegaal, A. C., Andersen, J. S., Ogg, S. C., Hay, R. T., Mann, M., & Lamond, A. I. (2006). Distinct and overlapping sets of sumo-1 and sumo-2 target proteins revealed by quantitative proteomics*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12), 2298-2310.
54. Saitoh, H., & Hinchev, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6252-6258.
55. Ayaydin, F., & Dasso, M. (2004). Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Molecular biology of the cell*, 15(12), 5208-5218.
56. Nayak, A., & Müller, S. (2014). SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome biology*, 15(7), 1-7.
57. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D., & Hay, R. T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10618-10624.
58. Wang, J., Taherbhoy, A. M., Hunt, H. W., Seyedin, S. N., Miller, D. W., Miller, D. J., ... & Schulman, B. A. (2010). Crystal structure of UBA2-ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9: insights into E1-E2 interactions in sumo pathways. *PloS one*, 5(12), e15805
59. Tatham, M. H., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., & Hay, R. T. (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nature structural & molecular biology*, 12(1), 67-74.
60. Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., & Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 108(3), 345-356.
61. Cappadocia, L., Pichler, A., & Lima, C. D. (2015). Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nature structural & molecular biology*, 22(12), 968-975.
62. Shi, X., Du, Y., Li, S., & Wu, H. (2022). The Role of SUMO E3 Ligases in Signaling Pathway of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3639

63. Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*, 107(1), 5-8
64. Chu, Y., & Yang, X. (2011). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene*, 30(9), 1108-1116.
65. Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I. A., van Santen, M. A., van de Rijke, F., van Dam, H., ... & Vertegaal, A. C. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Molecular cell*, 39(4), 641-652.
66. Yang, S. H., Galanis, A., Witty, J., & Sharrocks, A. D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal*, 25(21), 5083-5093.
67. Mohideen, F., Capili, A. D., Bilimoria, P. M., Yamada, T., Bonni, A., & Lima, C. D. (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nature structural & molecular biology*, 16(9), 945-952.
68. Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., & Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation—a mechanistic view. *Biomolecular concepts*, 8(1), 13-36.
69. Flotho, A., & Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*, 82, 357-385.
70. Cappadocia, L., & Lima, C. D. (2018). Ubiquitin-like protein conjugation: structures, chemistry, and mechanism. *Chemical reviews*, 118(3), 889-918.
71. Lascorz, J., Codina-Fabra, J., Reverter, D., & Torres-Rosell, J. (2022, December). SUMO-SIM interactions: From structure to biological functions. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 132, pp. 193-202). Academic Press.
72. Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., ... & Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic acids research*, 42(W1), W325-W330.
73. Beauclair, G., Bridier-Nahmias, A., Zagury, J. F., Saïb, A., & Zamborlini, A. (2015). JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics*, 31(21), 3483-3491.
74. Pilla, E., Möller, U., Sauer, G., Mattioli, F., Melchior, F., & Geiss-Friedlander, R. (2012). A novel SUMO1-specific interacting motif in dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) that is important for enzymatic regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44320-44329.
75. González-Prieto, R., Eifler-Olivi, K., Claessens, L. A., Willemstein, E., Xiao, Z., Ormeno, C. M. T., ... & Vertegaal, A. C. (2021). Global non-covalent SUMO interaction networks reveal SUMO-dependent stabilization of the non-homologous end joining complex. *Cell reports*, 34(4).
76. Reverter, D., & Lima, C. D. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO–RanGAP1–Ubc9–Nup358 complex. *Nature*, 435(7042), 687-692.
77. Lussier-Price, M., Mascle, X. H., Cappadocia, L., Kamada, R., Sakaguchi, K., Wahba, H. M., & Omichinski, J. G. (2020). Characterization of a C-terminal SUMO-interacting motif present in select PIAS-family proteins. *Structure*, 28(5), 573-585.
78. Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular cell*, 24(3), 331-339.
79. Hickey, C. M., Wilson, N. R., & Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(12), 755-766.
80. Sahin, U., de Thé, H., & Lallemand-Breitenbach, V. (2022). Sumoylation in physiology, pathology and therapy. *Cells*, 11(5), 814.
81. Shiio, Y., & Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13225-13230.
82. Celen, A. B., & Sahin, U. (2020). Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *The FEBS journal*, 287(15), 3110-3140.
83. Wasik, U., & Filipek, A. (2014). Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(12), 2878-2885.
84. Yang, Y., He, Y., Wang, X., Liang, Z., He, G., Zhang, P., ... & Liang, S. (2017). Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open biology*, 7(10), 170167.
85. Seeler, J. S., & Dejean, A. (2017). SUMO and the robustness of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(3), 184-197.

86. Lee, J. S., & Thorgeirsson, S. S. (2004). Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets. *Gastroenterology*, 127(5), S51-S55.
87. Jiang, Q. F., Tian, Y. W., Shen, Q., Xue, H. Z., & Li, K. (2014). SENP2 regulated the stability of β -catenin through WWOX in hepatocellular carcinoma cell. *Tumor Biology*, 35, 9677-9682.
88. Kho, C., Lee, A., Jeong, D., Oh, J. G., Chaanine, A. H., Kizana, E., ... & Hajjar, R. J. (2011). SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure. *Nature*, 477(7366), 601-605
89. Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., ... & Marsh, J. L. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, 304(5667), 100-104.
90. Shinbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., Maita, C., ... & Ariga, H. (2006). Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death & Differentiation*, 13(1), 96-108.
91. Dorval, V., & Fraser, P. E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9919-9924.
92. Bossis, G., & Melchior, F. (2006). Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Molecular cell*, 21(3), 349-357.
93. Xu, Z., Lam, L. S. M., Lam, L. H., Chau, S. F., Ng, T. B., & Au, S. W. N. (2008). Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *The FASEB Journal*, 22(1), 127-137.
94. Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., ... & Hay, R. T. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science signaling*, 2(72), ra24-ra24.
95. Enserink, J. M. (2015). Sumo and the cellular stress response. *Cell division*, 10(1), 1-13.
96. Bernstock, J. D., Yang, W., Ye, D. G., Shen, Y., Pluchino, S., Lee, Y. J., ... & Paschen, W. (2018). SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(1), 5-16.
97. Loftus, L. T., Gala, R., Yang, T., Jessick, V. J., Ashley, M. D., Ordonez, A. N., ... & Meller, R. (2009). Sumo-2/3-ylation following in vitro modeled ischemia is reduced in delayed ischemic tolerance. *Brain research*, 1272, 71-80.
98. Núñez-O'Mara, A., & Berra, E. (2013). Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biological chemistry*, 394(4), 459-469.
99. Datwyler, A. L., Lättig-Tünnemann, G., Yang, W., Paschen, W., Lee, S. L. L., Dirnagl, U., ... & Harms, C. (2011). SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(11), 2152-2159.
100. Chachami, G., Stankovic-Valentin, N., Karagiota, A., Basagianni, A., Plessmann, U., Urlaub, H., ... & Simos, G. (2019). Hypoxia-induced Changes in SUMO Conjugation Affect Transcriptional Regulation Under Low Oxygen*[S]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(6), 1197-1209.
101. Stuparević, I., Novačić, A., Rahmouni, A. R., Fernandez, A., Lamb, N., & Primig, M. (2021). Regulation of the conserved 3'-5' exoribonuclease EXOSC10/Rrp6 during cell division, development and cancer. *Biological Reviews*, 96(4), 1092-1113.
102. Brouwer, R., Vree Egberts, W. T., Hengstman, G. J., Raijmakers, R., van Engelen, B. G., Peter Seelig, H., ... & van Venrooij, W. J. (2001). Autoantibodies directed to novel components of the PM/ScI complex, the human exosome. *Arthritis Research & Therapy*, 4, 1-5.
103. Steitz, T. A., & Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6498-6502.
104. Midtgaard, S. F., Assenholt, J., Jonstrup, A. T., Van, L. B., Jensen, T. H., & Brodersen, D. E. (2006). Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 11898-11903.
105. Weick, E. M., Puno, M. R., Januszyk, K., Zinder, J. C., DiMattia, M. A., & Lima, C. D. (2018). Helicase-dependent RNA decay illuminated by a cryo-EM structure of a human nuclear RNA exosome-MTR4 complex. *Cell*, 173(7), 1663-1677.

106. Januszyk, K., Weick, E. M., & Lima, C. D. (2020). Reconstitution of the human nuclear RNA exosome. *The Eukaryotic RNA Exosome: Methods and Protocols*, 467-489.
107. Morton, D. J., Kuiper, E. G., Jones, S. K., Leung, S. W., Corbett, A. H., & Fasken, M. B. (2018). The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *Rna*, 24(2), 127-142.
108. Ogami, K., & Suzuki, H. I. (2021). Nuclear RNA Exosome and Pervasive Transcription: Dual Sculptors of Genome Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13401.
109. Schneider, C., & Tollervey, D. (2013). Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends in biochemical sciences*, 38(10), 485-493.
110. Olsen, K. J., & Johnson, S. J. (2021). Mtr4 RNA helicase structures and interactions. *Biological chemistry*, 402(5), 605-616.
111. Hamill, S., Wolin, S. L., & Reinisch, K. M. (2010). Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15045-15050
112. Meola, N., Domanski, M., Karadoulama, E., Chen, Y., Gentil, C., Pultz, D., ... & Jensen, T. H. (2016). Identification of a nuclear exosome decay pathway for processed transcripts. *Molecular Cell*, 64(3), 520-533.
113. Puno, M. R., & Lima, C. D. (2018). Structural basis for MTR4–ZCCHC8 interactions that stimulate the MTR4 helicase in the nuclear exosome-targeting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(24), E5506-E5515.
114. Schilders, G., Rajmakers, R., Raats, J. M., & Pruijn, G. J. (2005). MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8 S rRNA maturation. *Nucleic acids research*, 33(21), 6795-6804.
115. Erdemir, T., Bilican, B., Cagatay, T., Goding, C. R., & Yavuzer, U. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* C1D is implicated in both non-homologous DNA end joining and homologous recombination. *Molecular microbiology*, 46(4), 947-957.
116. Stead, J. A., Costello, J. L., Livingstone, M. J., & Mitchell, P. (2007). The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic acids research*, 35(16), 5556-5567.
117. Schilders, G., van Dijk, E., & Pruijn, G. J. (2007). C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Sc1-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic acids research*, 35(8), 2564-2572.
118. Wasmuth, E. V., Januszyk, K., & Lima, C. D. (2014). Structure of an Rrp6–RNA exosome complex bound to poly (A) RNA. *Nature*, 511(7510), 435-439.
119. van Hoof, A., Lennertz, P., & Parker, R. (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 441-452.
120. Callahan, K. P., & Butler, J. S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic acids research*, 36(21), 6645-6655.
121. Wang, C., Liu, Y., DeMario, S. M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., & Chanfreau, G. F. (2020). Rrp6 moonlights in an RNA exosome-independent manner to promote cell survival and gene expression during stress. *Cell reports*, 31(10).
122. Sloan, E., Tatham, M. H., Gros Lambert, M., Glass, M., Orr, A., Hay, R. T., & Everett, R. D. (2015). Analysis of the SUMO2 Proteome during HSV-1 Infection. *PLoS pathogens*, 11(7), e1005059.
123. Werner, A., Moutty, M. C., Möller, U., & Melchior, F. (2009). Performing in vitro sumoylation reactions using recombinant enzymes. *SUMO Protocols*, 187-199.

