



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

-

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ RNA

**Μελέτη του βιολογικού ρόλου πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης
hnRNA και mRNA καθώς και των μηχανισμών της απορύθμισης
τους στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΠΟΥΚΑΚΗΣ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ-ΖΩΟΤΕΧΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

<<Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)>>

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπουκάκη Γεωργίου : 28-11-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 567^α/29-11-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γκιαλή Αποστολία Ερευνήτρια Α' Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-12-2005

«Μελέτη του Βιολογικού ρόλου πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης hnRNA και mRNA καθώς και των μηχανισμών της απορύθμισής τους στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 664^α/23-6-2009

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκιάλη Αποστολία	Ερευνήτρια Α' IBEB- Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Κωλέττας Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-10-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΧΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας-Ωρίμανσης RNA του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Ε.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), κατά το χρονικό διάστημα 2006-2009. Η χρηματοδότηση έγινε από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ 2003-κωδικός έργου: 03ΕΔ264) του Υπουργείου Ανάπτυξης. Το έργο συγχρηματοδοτείται κατά: 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση-Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο-Υπουργείο Ανάπτυξης-Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα-Γ' Κοινωνικό Πλαίσιο Στήριξης

Στον Αλέξανδρο

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας-Ωρίμανσης RNA του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (I.B.E.B.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Α΄ Δρ. Αποστολία Γκιάλη. Χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ 2003) του Υπουργείου Ανάπτυξης. Οι άνθρωποι οι οποίοι συνεισέφεραν έμπρακτα στην ολοκλήρωση της Διατριβής αυτής και βοήθησαν στην όλη διαδικασία εκμάθησης είναι αρκετοί. Προεξέχουσα θέση ανάμεσα σε αυτούς κατέχει η Δρ. Αποστολία Γκιάλη. Την ευχαριστώ θερμά που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και κυρίως για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με το να με επιλέξει για την εκπλήρωση του ερευνητικού προγράμματος αν και προερχόμενος από ένα διαφορετικό κλάδο Επιστήμης. Η επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε είναι πολύτιμη και παρόλη τη διαφορά του χαρακτήρα μας η υπομονή, η επιμονή και η άμεση υποστήριξη που επέδειξε σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, με ενθάρρυνε και με διαμόρφωσε σε αυτά τα πρώτα ερευνητικά βήματα. Αποτέλεσε για μένα πρότυπο ακέραιου χαρακτήρα και ανθρώπου ο οποίος επέδρασε στη βελτίωση του χαρακτήρα μου. Επίσης η συμβολή της Δρ. Μερόπη Πατρινού-Γεωργούλα, Ερευνήτρια Β΄ στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας-Ωρίμανσης RNA, ξεπέρασε κατά πολύ την απλή συμβουλευτική διαδικασία και υπήρξε άμεση βοήθεια για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς για ότι μου προσέφερε αυτά τα χρόνια σε όλα τα επίπεδα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση και Επίκουρο Καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη για τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές τους για την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ, επίσης τον Δρ. Χρήστο Βαλαβάνη, Ιατρό Παθολογοανατόμο, για την άποψη συνεργασία του στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του IBEB. Η πολύχρονη εμπειρία της Τεχνικού κ. Ρούλα Τσουνή και η μητρική παρουσία της στο εργαστήριο, ήταν πολύτιμη καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου. Ευχαριστώ

επίσης την Βασιλική Γάνου, Ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα για τη βοήθειά της, όπως και όλα τα μέλη του IBEB, συναδέλφους Υποψήφιους Διδάκτορες, Ερευνητές όλων των βαθμίδων και Τεχνικό προσωπικό. Ευχαριστώ επίσης πολύ τον Dr. Michael Leichter και τη Dr. Marija Marko για τη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους στα πρώτα χρόνια στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Αγγελική Κορύλλου και τη Χριστίνα Παπαδοπούλου για τις αγωνίες που μοιραστήκαμε στον ερευνητικό πάγκο, τις ξεχωριστές στιγμές που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια, εντός και εκτός εργαστηρίου και τη φιλία που αναπτύξαμε.

Η συνέχιση της αναζήτησης της γνώσης δε θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση των γονέων μου τους οποίους ευγνωμονώ, όπως και την αδελφή μου, Ευρυδίκη, που με την αγάπη της και την ηθική και όχι μόνο υποστήριξη στάθηκε δίπλα μου και με παρότρυνε όλα αυτά τα χρόνια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους φίλους, δικούς μου ανθρώπους, που βίωσαν μαζί με μένα αυτή τη διαδικασία, από την αρχή μέχρι το τέλος. Χωρίς αυτούς δε θα είχα προχωρήσει στη ζωή. Ιδιαίτερα στον φίλο και συνάδελφο Αριστείδη Τσοπελάκο του οποίου η συμβολή δε μπορεί να καταγραφεί σε λίγες γραμμές. Τέλος, ευχαριστώ και όλους όσους αυτά τα χρόνια με τον ένα ή τον άλλο τρόπο επηρέασαν τη ζωή μου διαμορφώνοντας το χαρακτήρα μου και βοηθώντας με στο να μάθω να παλεύω και να ανταπεξέρχομαι τις όποιες δυσκολίες.

Πίνακας περιεχομένων

A. Εισαγωγή	2
A1. Καρκίνος του πνεύμονα.....	2
A1.1 Επιδημιολογία και αίτια του καρκίνου του πνεύμονα.....	2
A1.2 Ιστολογική κατάταξη καρκίνου του πνεύμονα.....	3
A1.3 Ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση και χημειοπρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα.....	5
A1.4 Βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα	9
A2. Πρωτεΐνες hnRNP.....	12
A2.1 Γενικά	12
A2.2 Δομή των πρωτεϊνών hnRNP.....	15
A2.3 Πρωτεΐνες hnRNP της υποομάδας A/B	19
A2.4 Βιολογικοί ρόλοι των πρωτεϊνών hnRNP	24
A2.5 Οι πρωτεΐνες hnRNP σε παθολογικές καταστάσεις	37
A2.5.1 Αυτοανοσία.....	37
A2.5.2 Καρκίνος.....	39
A2.5.3 Η hnRNP A2/B1 ως ένας κλινικά χρήσιμος βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα.....	41
A3. Αυτοαντισώματα σαν βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα.....	45
A4. Σκοπός.....	47
B. Υλικά και μέθοδοι	49
B1. Κυτταροκαλλιέργεια	49
B2. Κυτταρικά Εκχυλίσματα.....	49
B2.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος	49
B2.2 Παρασκευή πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος.....	50
B2.3 Κατακρήμιση πρωτεϊνών	50
B2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	51
B3. Ανοσοαποτύπωση με μεταφορά κατά Western (Western blot).....	51
B3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μία διάσταση (SDS/PAGE).....	51
B3.2 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western.....	52
B3.2.1 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	52
B3.2.2 Ανοσοαποτύπωση	53
B3.2.3 Αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL).....	54
B3.2.4 Μέθοδος οπτικής πυκνομετρίας για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.....	54
B4. Βιοψίες πνεύμονα ασθενών με ΜΜΚΠ.....	55

B4.1 Παραγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	55
B4.2 Απομόνωση RNA από κυτταρικές σειρές.....	55
B4.3 Κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων	56
B4.4 Απομόνωση RNA από βιοψίες πνεύμονα	56
B4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA.....	57
B4.5.1 Πειραματική διαδικασία συμβατικού RT-PCR.....	58
B4.5.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	60
B4.5.3 Αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qReal-time PCR).....	61
B5. Κλωνοποίηση –πλασμιδιακές κατασκευές.....	63
B5.1 Βακτηριακά στελέχη –πλασμιδιακοί φορείς	63
B5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	64
B5.2.1 Παρασκευή μικρής κλίμακας (Mini preparation).....	64
B5.2.2 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας (midi preparation).....	64
B5.3 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία πλασμιδιακών φορέων και ενθεμάτων.....	65
B5.4 Εκχύλιση DNA από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης	66
B5.5 Ενζυμικές πέψεις- έλεγχος των κατασκευών	67
B5.6 Αντίδραση προσθήκης ενθεμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς (αντίδραση λιγάσης)	67
B5.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων	67
B5.7.1 Παρασκευή επιδεκτικών E. Coli.....	67
B5.7.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών E.coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές	68
B6. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP σε σύντηξη με GST.....	68
B6.1 Καλλιέργεια βακτηρίων και επαγωγή της έκφρασης.....	68
B6.2 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το βακτηριακό ίζημα.....	69
B6.3 Δέσμευση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης.....	70
B6.4 Έκλουση.....	70
B7. Πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης (Pull-down)	71
B8. Παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης hnRNP A3.....	72
B8.1 Καθαρισμός αντισώματος μέσω ανοσοσυγγένειας	73
B8.2 Χρωματογραφία συγγένειας με χρήση κυτταρίνης-ssDNA.....	74
Γ. Αποτελέσματα	77
Γ1. Μοριακός χαρακτηρισμός της απορύθμισης στην έκφραση πρωτεϊνών hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα.....	77
Γ1.1 Μελέτη των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα μη μικροκυτταρικού τύπου (MMKII).....	77

Γ1.1.1 Κυτταρικά συστήματα.....	77
Γ1.1.2 Ζεύγη βιοψιών καρκινικού/φυσιολογικού ιστού από ασθενείς με ΜΜΚΠ	79
Γ1.2 Μελέτη των προτύπων έκφρασης του mRNA των hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα.....	90
Γ1.2.1 Απομόνωση mRNA.....	91
Γ1.2.2 Ημιοσοτικός προσδιορισμός του mRNA (αντίδραση RT-PCR).....	92
Γ1.2.2.1 Αντίδραση RT-PCR σε ολικό RNA από κυτταρικά συστήματα.....	92
Γ1.2.2.2 Αντίδραση RT-PCR σε ολικό RNA από βιοπτικό υλικό του πνεύμονα	95
Γ1.2.3 Αντίδραση ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-time RT- PCR).....	97
Γ1.3 Διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP A/B, ASF/SF2 και του εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων με εμπλοκή στην καρκινική εξαλλαγή.....	108
Γ1.3.1 Συσχέτιση πρωτεϊνικών επιπέδων των hnRNP A1, ASF/SF2 και της έκφρασης ισομορφών του ογκογονιδίου CD44.....	109
Γ1.3.2 Πιθανή σχέση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP A/B και εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων με συμμετοχή στην απόπτωση.....	116
Γ2 Νέα εργαλεία μελέτης των πρωτεϊνών hnRNP και εφαρμογές στον καρκίνο του πνεύμονα.....	118
Γ2.1 Υποκλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A3 και A2.....	119
Γ2.2. Πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης (Pull down) μέσω ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κυτταρικά εκχυλίσματα.....	120
Γ2.3 Παραγωγή νέου αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3.....	127
Γ3 Πρωτεΐνες hnRNP ως πιθανοί βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα - Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σε ορούς αίματος ασθενών.....	130
Δ. Συζήτηση.....	145
Δ1 Έκφραση πρωτεϊνών hnRNP A/B σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα	145
Δ2. Παραγωγή νέων εργαλείων των hnRNP A/B και εφαρμογή 1: στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών hnRNP 2: στη διερεύνηση της καθιέρωσης πρωτεϊνών A/B ως βιοδεικτών στην πρόωμη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα.	152
Περίληψη.....	157
Abstract.....	158
Βιβλιογραφία.....	160

A. Εισαγωγή

A. Εισαγωγή

A1. Καρκίνος του πνεύμονα

A1.1 Επιδημιολογία και αίτια του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί παγκοσμίως μια από τις κύριες αιτίες θανάτου. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) για την Ελλάδα κατά το έτος 2002, περίπου το 1/4 των συνολικών θανάτων από καρκίνο και περίπου το 1/17 (5,5%) των συνολικών θανάτων (συμπεριλαμβανομένων ατυχημάτων) οφείλονταν σε καρκίνο του πνεύμονα (βρόγχων και τραχείας) [1]. Για την Ευρωπαϊκή Ένωση το 2004, ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν η δεύτερη πιο κοινή μορφή εμφάνισης καρκίνου στους άντρες (17,6% των νέων περιστατικών) και η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο (27,3% των θανάτων από καρκίνο), ενώ στις γυναίκες η τέταρτη πιο συχνή μορφή νέων καρκίνων (6,5% των νέων περιστατικών καρκίνου) και η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο (11%) [2]. Στην Ευρώπη, όπου τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια συνεχής αύξηση στα ποσοστά θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στο γυναικείο πληθυσμό, τα τελευταία χρόνια σημειώθηκε μια σταδιακή υποχώρηση του ρυθμού αύξησης [3]. Στην Ελλάδα παρατηρείται μείωση των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στον αντρικό πληθυσμό τα τελευταία χρόνια και αμελητέα μείωση στο γυναικείο πληθυσμό (στις ηλικίες μεταξύ 20-44) [4].

Πολλά αίτια σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, όπως η ποιότητα του ατμοσφαιρικού αέρα, η έκθεση σε αμιάντο, η έκθεση σε ραδιενέργεια [5], το ραδιενεργό αέριο ραδόνιο, ορμονικοί παράγοντες, γενετικοί παράγοντες [6], άλλα νοσήματα του πνεύμονα, ευάλωτο ανοσοποιητικό σύστημα και η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού εμφάνισης καρκίνου στον πνεύμονα. Η πιο καλά τεκμηριωμένη αιτία όμως είναι το κάπνισμα. Υπολογίζεται ότι περίπου το 90% των θανάτων στους άντρες από καρκίνο του πνεύμονα και το 75%–80% στις γυναίκες κάθε χρόνο, στις ΗΠΑ, οφείλεται στο κάπνισμα [7], ενώ έναν αιώνα πριν, ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν εξαιρετικά σπάνιος και αντιπροσώπευε μόνο το 1% των θανάτων από καρκίνο [8]. Ο Muller το 1940 στη Γερμανία, ήταν ο πρώτος που διατύπωσε ξεκάθαρα την υπόθεση ότι το κάπνισμα προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα. Ωστόσο, παρά τις αναφορές που υπέδειχναν συσχέτισμο μεταξύ του καπνίσματος και του καρκίνου του πνεύμονα [9, 10] χρειάστηκε μια δεκαετία μέχρι να εκδοθεί η πρώτη

αναφορά το 1964, που να προειδοποιεί για τις αρνητικές επιπτώσεις του καπνού στην υγεία [8]. Επίσης το παθητικό κάπνισμα έχει αναδειχθεί σαν ένα πιθανό αίτιο εμφάνισης του καρκίνου, καθώς η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε παθητικούς καπνιστές είναι ως και 30% υψηλότερη απ' ότι είναι σε μη παθητικούς καπνιστές, ενώ τα περιστατικά εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα από παθητικό κάπνισμα εκτιμώνται σε 3.000 το χρόνο στις ΗΠΑ [5]. Την ισχυροποίηση της σύνδεσης μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου εμφανίζουν και μετα-αναλύσεις [11] αν και υπάρχει σκεπτικισμός στο κατά πόσο ο καρκίνος του πνεύμονα σε μη-καπνιστές μπορεί να αποδοθεί στο παθητικό κάπνισμα [6].

A1.2 Ιστολογική κατάταξη καρκίνου του πνεύμονα

Οι κακοήθεις όγκοι στους πνεύμονες, σύμφωνα με συμβατική μικροσκοπική παρατήρηση, κατατάσσονται ιστολογικά σε 2 κύριους τύπους: τον μικροκυτταρικό (small cell lung cancer, SCLC) και τον μη-μικροκυτταρικό (non-small cell lung cancer, NSCLC). Ο μικροκυτταρικός ευθύνεται για το 20% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου και ο μη-μικροκυτταρικός για τις υπόλοιπες. Η ακριβής διάγνωση είναι κρίσιμη, γιατί οι δύο αυτοί τύποι αντιδρούν εντελώς διαφορετικά στην χειρουργική επέμβαση ή στην αγωγή με χημειοθεραπεία/ακτινοβολία. Ο μικροκυτταρικός τύπος είναι επιθετικός, τα κύτταρα διαιρούνται ταχέως και είναι ήδη ευρύτατα διεσπαρμένα όταν γίνεται η διάγνωση. Χωρίς χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, ο μέσος δείκτης επιβίωσης των ασθενών είναι 2-4 μήνες. Η σταδιοποίηση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα διαμορφώνεται σε 2 κατηγορίες, περιορισμένη και εκτεταμένη νόσος [12]. 60 με 65% των ασθενών με ΜΚΠ έχουν εκτεταμένη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης και η πρόγνωση είναι σημαντικά δυσμενής. Στις περισσότερες περιπτώσεις η χειρουργική επέμβαση δεν προσφέρει βελτίωση στην μακροπρόθεσμη επιβίωση επειδή οι όγκοι ΜΚΠ είναι πολύ εξαπλωμένοι, ώστε να αφαιρεθούν ολοκληρωτικά [13]. Ωστόσο σε περιορισμένη νόσο, πιθανόν λόγω του υψηλού μιτωτικού τους δείκτη, ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία με αποτέλεσμα την αύξηση της μέσης επιβίωσης σε 16-24 μήνες. Παρ' όλες τις εξελίξεις των τελευταίων 10-15 ετών στη διάγνωση και θεραπεία του ΜΚΠ, ο δείκτης πενταετούς επιβίωσης είναι ακόμη χαμηλός, περίπου στο 5-10%.

Η συνολική επιβίωση των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό τύπο είναι σχετικά καλύτερη και φτάνει το 15%. Κατά τη διάγνωση, οι ασθενείς με ΜΜΚΠ διακρίνονται σε 3 κατηγορίες, με βάση το στάδιο της ασθένειας. Οι ασθενείς της πρώτης κατηγορίας παρουσιάζουν εντοπισμένο όγκο και συχνά θεραπεύονται με χειρουργική αφαίρεση του. Οι ασθενείς της δεύτερης κατηγορίας έχουν τοπικά εξελιγμένους όγκους, μερικοί από τους οποίους μπορεί να εκμηθούν, αλλά οι περισσότεροι ασθενείς λαμβάνουν χημειοθεραπεία και ακτινοβολία. Στην τρίτη κατηγορία, ο όγκος έχει ήδη υποστεί μετάσταση τη στιγμή που εντοπίζεται. Η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται για καταπραυντική δράση και δεν προσφέρουν ίαση. Περίπου το 70% των ασθενών παρουσιάζουν τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο τη στιγμή της διάγνωσης [14]. Η συνολική επιβίωση στους ασθενείς και των δύο περιπτώσεων είναι τόσο χαμηλή ώστε να συνιστάται η συμμετοχή τους σε κλινικές δοκιμές [15].

Η ιστολογική κατάταξη εξαρτάται κυρίως από μικροσκοπική παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο, αν και τόσο το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όσο και οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις μπορούν να προσφέρουν πρόσθετες πληροφορίες. Ο μικροκυτταρικός τύπος χαρακτηρίζεται από μικρά, σφαιρικά κύτταρα με λίγο κυτταρόπλασμα, κοκκώδη χρωματίνη και υψηλό μιτωτικό δείκτη. Οι όγκοι από ΜΚΠ παρουσιάζουν εκτεταμένη νέκρωση και αναπτύσσονται σε λεπτές στοιβάδες. Αυτοί οι όγκοι εντοπίζονται κυρίως στην περιβρογχική περιοχή. Ο μη-μικροκυτταρικός τύπος καρκίνου διακρίνεται σε 3 κύριους ιστολογικούς τύπους: το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma), το καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου (squamous carcinoma) και το αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma). Πολλές περιπτώσεις ΜΜΚΠ παρουσιάζουν περισσότερα από ένα ιστολογικά μορφώματα με αποτέλεσμα να κατατάσσονται με βάση τη λιγότερο διαφοροποιημένη περιοχή [16].

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα αντιπροσωπεύει το 9% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Ο όγκος είναι ελαφρώς διαφοροποιημένος και διακρίνεται από την απουσία των χαρακτηριστικών του αδενοκαρκινώματος ή του καρκινώματος από πλακώδες επιθήλιο.

Το καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου αποτελεί το δεύτερο συνηθέστερο τύπο καρκίνου του πνεύμονα, αντιπροσωπεύει το 30% των περιπτώσεων και διακρίνεται περαιτέρω σε 4 υπο-τύπους: θηλαίος (papillary), διαυγών κυττάρων (clear cell), μικρών κυττάρων (small cell) και basiloid [17].

Το αδενοκαρκίνωμα, που είναι η πιο κοινή νεοπλασία σε γυναίκες, μη καπνιστές και νεαρούς ασθενείς [18-21], τις τελευταίες δεκαετίες είναι ο ιστολογικά πιο κυρίαρχος τύπος καρκίνου του πνεύμονα [22]. Διακρίνεται σε 5 υπο-τύπους: λοβιώδης (acinar), θηλαίος (papillary), συμπαγής βλενώδης (solid mucinus), βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (bronchioloalveolar carcinoma) και μεικτού τύπου (mixed subtypes) [17]. Όλοι οι υπο-τύποι εντοπίζονται συνήθως στην περιφέρεια του πνεύμονα, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευση του αδενοκαρκινώματος στα αρχικά στάδια [23].

A1.3 Ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση και χημειοπρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα

Επί του παρόντος, η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα πραγματοποιείται όταν η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, έχει ήδη εμφανισθεί μετάσταση και ο όγκος έχει εισβάλει στον παρακείμενο ιστό, οπότε η θεραπεία είναι σχεδόν αδύνατη και ο δείκτης πενταετούς επιβίωσης είναι χαμηλός. Ειδικότερα ο δείκτης πενταετούς επιβίωσης για ασθενείς οι οποίοι έχουν διαγνωσθεί με νόσο σε προχωρημένο στάδιο, δηλαδή με εξάπλωση του όγκου πέρα του πρωτογενούς σημείου εμφάνισης (το 41% των διαγνώσεων), είναι μόλις 3%. Αντίθετα οι εντοπισμένοι όγκοι, που αποτελούν μόνο το 16% των διαγνώσεων, έχουν δείκτη πενταετούς επιβίωσης 49% [24]. Γενικά η επιβίωση είναι υψηλότερη σε ασθενείς με διάγνωση σε αρχικά στάδια, ανεξάρτητα από την ιστολογική κατηγοριοποίηση.

Η αναζήτηση ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου για την πρόωπη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, με στόχο ένα αξιόπιστο και κλινικά διαχειρίσιμο αποτέλεσμα που θα βελτιώσει το προσδόκιμο ζωής των ασθενών που νοσούν ή πρόκειται να νοσήσουν και θα μειώσει την ιδιαίτερα αυξημένη θνησιμότητα που παρατηρείται από το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ικανοποιητικά ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος. Η ιδανική μέθοδος ανίχνευσης θα πρέπει να έχει μεγάλη ευαισθησία ώστε να εντοπίζει τη νόσο σε πρωταρχικά στάδια, αλλά και να είναι ειδική ώστε να αποφεύγονται περιπτώσεις ψευδών-θετικών αποτελεσμάτων που θα μπορούσαν να θέσουν πιθανώς ανθρώπους που δεν πρόκειται να νοσήσουν σε πολυέξοδες, επιβλαβείς και μη αποτελεσματικές επεμβάσεις. Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ο πνεύμονας αποτελεί ένα δύσκολο όργανο για σάρωση λόγω της μεγάλης

του επιφάνειας, και η λήψη βιολογικού δείγματος που να αντιπροσωπεύει τη συνολική κατάσταση του είναι προβληματική [25].

Οι στρατηγικές που ακολουθούνται καλύπτουν ένα διευρυμένο φάσμα μεθόδων, από απεικονιστικές μέχρι γενετικές και μεθόδους πρωτεομικής [25]. Επίσης η έρευνα γύρω από τα στάδια εξέλιξης της καρκινογένεσης και η χρησιμοποίηση νέων τεχνικών, οδηγούν στην εντόπιση όλο και περισσότερων προ-καρκινικών μορφολογικών αλλοιώσεων οι οποίες εμφανίζονται αρκετά νωρίτερα από τους κλινικά διαγνωσμένους όγκους. Στόχο αποτελεί επομένως η διερεύνηση της πιθανότητας εντόπισης αυτών των αλλοιώσεων οι οποίες θα οδηγήσουν σε εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, με σκοπό την πρόωπη διάγνωση, και την εξέλιξη στρατηγικών για την καταπολέμηση των εν δυνάμει όγκων σε αυτά τα πρώιμα στάδια ακόμα [26].

Στις απεικονιστικές μεθόδους, οι δοκιμές χρήσης της ακτινογραφίας με ακτίνες X στο θώρακα έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή, παρόλο που αποτελεί την κυριότερη μέθοδο για κλινική διάγνωση του καρκίνου, δεν είναι ικανοποιητική ώστε να μειώσει τη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα εντοπίζοντας όγκους σε πρώιμο στάδιο [26]. Η έλευση όμως της τεχνικής απεικόνισης μέσω σπειροειδούς αξονικής υπολογιστικής τομογραφίας (spiral computed tomography, SCT), και της σπειροειδούς αξονικής υπολογιστικής τομογραφίας χαμηλής δόσης (low dose spiral computed tomography, LDSCT), έδωσε νέα ώθηση στις απεικονιστικές μεθόδους σαν πιθανό εργαλείο για σάρωση ατόμων υψηλού κινδύνου [26, 27]. Προκαταρτικές έρευνες έδειξαν ότι η τεχνική αυτή εντοπίζει αρκετά μικρούς όγκους –πρώιμο στάδιο εμφάνισης του καρκίνου- και μπορεί να αυξήσει τη διάγνωση καρκίνου σε στάδιο I από 15% για την ακτινογραφία με ακτίνες X σε 80% [28]. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στην έναρξη κλινικών δοκιμών ευρείας κλίμακας, για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα αυτής της τεχνικής [29]. Η χρήση μιας ακόμα τεχνικής απεικόνισης, της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (Positron emission tomography, PET) που παρέχει κυρίως πληροφορίες για τη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων, μελετάται ενδελεχώς και κυρίως σε συνδυασμό με την CT [30-32]. Ωστόσο, η CT αποκαλύπτει περιφερειακές αλλοιώσεις, ενώ δεν μπορεί να ανιχνεύσει αλλοιώσεις στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Σε αυτό το σημείο εντοπίζεται η χρησιμότητα της βρογχοσκοπίας και μιας εξελιγμένης μορφής της, της αυτοφθορίζουσας βρογχοσκοπίας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση της μειωμένης ικανότητας αυτοφθορισμού των νεοπλασιών σε σύγκριση με τον υγιή ιστό, μετά από διέγερση με

κυανό ή ερυθρό φως [33, 34]. Η συγκεκριμένη βρογχοσκοπία παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με τη βρογχοσκοπία λευκού φωτός, αλλά η εξειδίκευσή της εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένη [26]. Γενικά, πιστεύεται ότι ο συνδυασμός των απεικονιστικών μεθόδων μαζί με την ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών και πρωτοκόλλων, μπορεί να αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο στη συνολική διαχείριση της ασθένειας.

Εκτός από τις απεικονιστικές μεθόδους, η λήψη και η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων όπως είναι ο σίελος, το αίμα ή ορός του αίματος, τα ούρα και η βιοψία (για παράδειγμα μέσω λεπτής βελόνης) με στόχο την εύρεση συγκεκριμένων διαφοροποιήσεων και τη συσχέτιση αυτών με τον καρκίνο, μπορεί να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση της παρουσίας καρκίνου του πνεύμονα. Στο παρελθόν έγιναν απόπειρες να επαναληφθεί η επιτυχία που είχε το τεστ Παπανικολάου στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με ένα αντίστοιχο τεστ για την πρόωμη ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα μέσω της χρήσης κυττάρων του σιέλου, αλλά η ανάλυση της μορφολογίας των κυττάρων που περιέχονται στο σίελο έδωσε απογοητευτικά αποτελέσματα κατά τις κλινικές δοκιμές καθώς ήταν μεν ακριβής, αλλά η ευαισθησία ήταν χαμηλή και δεν σημειώθηκε καμία επίδραση στην επιβίωση των ασθενών [26].

Ο επιτυχής εντοπισμός νεοπλασιών στους πνεύμονες σε αρχικό στάδιο δεν παραμένει από μόνη της μια ικανή συνθήκη για την μακροπρόθεσμη επιτυχή διαχείριση της ασθένειας και εμφανίζει πολλές επιπλοκές και ερωτηματικά. Το ερώτημα που μένει να απαντηθεί είναι ποιες από τις αλλοιώσεις που ανιχνεύονται με τα πιο σύγχρονα μέσα πρέπει να θεωρούνται όγκοι προς αφαίρεση. Οι τεχνικές κλινικής διαχείρισης των νεοπλασματικών αλλοιώσεων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν οι αλλοιώσεις εμφανίζονται σε πολύ πρώιμο στάδιο, ενώ παράλληλα η εμφάνιση του φαινομένου της καρκινογένεσης πεδίου (field cancerization) [35], κατά το οποίο τα πιθανά μέρη εμφάνισης πρώιμων καρκινικών «τραυματικών» αλλοιώσεων μπορεί να εντοπιστούν σε ένα διευρυμένο μέρος του αεραγωγού, δυσχεραίνει ακόμα πιο πολύ το έργο της διαχείρισης αυτών [36]. Τέλος, παρατηρείται το φαινόμενο της υποτροπής πολλών από τις αρχικές αλλοιώσεις οι οποίες έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά [37, 38]. Δεδομένου ότι η χειρουργική επέμβαση στον πνεύμονα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εμπεριέχει κίνδυνο, και δεν υπάρχει –ακόμα– ασφαλής τρόπος διάκρισης μεταξύ των αλλοιώσεων που πρέπει να αφαιρεθούν χειρουργικά και αυτών που είναι ενδεχομένως ακίνδυνες και μπορούν να παραμείνουν στον πνεύμονα χωρίς να οδηγήσουν σε παθογένεια, εξετάζεται το

ενδεχόμενο η χειρουργική αφαίρεση πρώιμων αλλοιώσεων να προκαλεί τελικά σημαντική νοσηρότητα [28].

Μία πιθανή λύση στο πρόβλημα της διαχείρισης αυτών των αλλοιώσεων μπορεί να αποτελεί η χημειοπροληπτική αγωγή (chemoprevention). Προς το παρόν διερευνάται σε μοντέλα και σε κλινικές δοκιμές η δυνατότητα χρήσης χημικών ουσιών και φυσικών προϊόντων για την πρόκληση οπισθοχώρησης των όγκων χωρίς όμως να υπάρχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα μέχρι σήμερα [39]. Πλήθος ουσιών δοκιμάζονται κλινικά, για παράδειγμα οι βιταμίνες Α και Ε, το σελήνιο, εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού και μπρόκολου καθώς και ουσίες όπως η α-τοκοφερόλη και τα β-καροτένια [40]. Παράλληλα αυξάνεται και το ενδιαφέρον για τη χρήση μοριακών δεικτών ως χημειοπροληπτικών φαρμάκων [41, 42]. Για παράδειγμα η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε δυσπλασία των βρόγχων [43] οδήγησε σε μελέτες για τη χρήση αναστολέων του όπως το Gefitinib, το οποίο είναι εύκολο στο χειρισμό και βιοδιαθέσιμο μέσω στοματικής χορήγησης, γεγονός που καθιστά εφικτή και την μακροπρόθεσμη χορήγηση. Επίσης διερευνάται και η αποτελεσματικότητα των αναστολέων του EGFR στην θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα [44].

Η χορήγηση εισπνεόμενων φαρμάκων μπορεί να βελτιώσει το θεραπευτικό δείκτη των χημειοπροληπτικών ουσιών, δεδομένου ότι μπορούν να επιτύχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου στον ιστό-στόχο με αμελητέα συστημική διασπορά [28]. Επίσης, η καταπολέμηση όγκων στον ανώτερο αεραγωγό, και των συμπτωμάτων τους, μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές λιγότερο επεμβατικές από την εγχείρηση, όπως ο ηλεκτροκαυτηριασμός, η κρυοθεραπεία ή η φωτοδυναμική θεραπεία με τη βοήθεια βρογχοσκοπίας [45]. Από τα παραπάνω δεδομένα και τη συνεχιζόμενη έρευνα στο πεδίο συνεπάγεται ότι η μείωση της θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να επιτευχθεί με το συνδυασμό της έγκαιρης ανίχνευσης σε αρχικό στάδιο αλλοιώσεων που θα οδηγήσουν σε όγκο, την έγκαιρη χειρουργική επέμβαση ή τις βρογχοσκοπικές τεχνικές αφαίρεσης των αλλοιώσεων και τη χημειοπροληπτική θεραπεία.

A1.4 Βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα

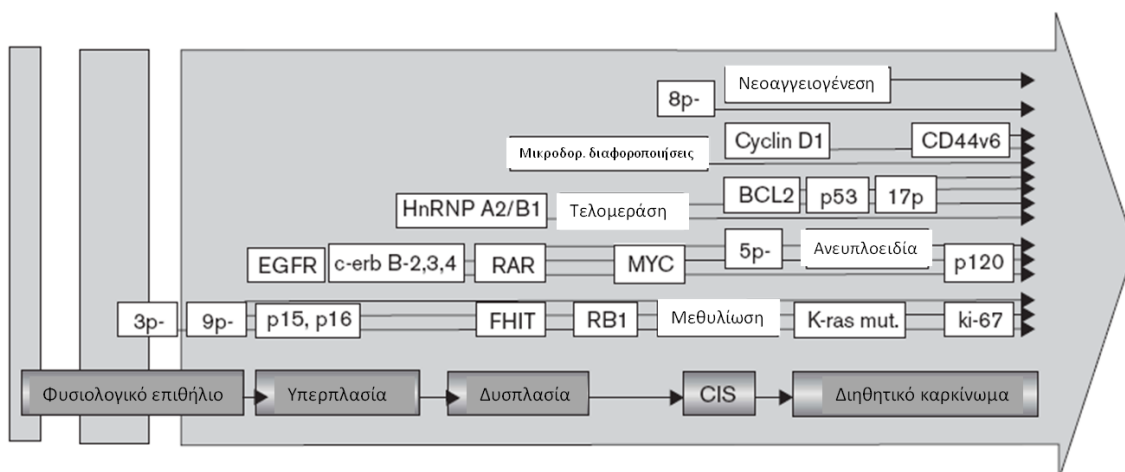
Η συνεχώς αυξανόμενη κατανόηση των σύνθετων βιολογικών φαινομένων που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο [46], και ειδικότερα τον καρκίνο του πνεύμονα [47], καθώς και η εντόπιση των μοριακών αλλαγών που χαρακτηρίζουν τις προ-κακοήθειες (pre-malignant) εξαλλαγές [48], έχει οδηγήσει στην αναζήτηση και ανάδειξη μορίων-συστατικών των κυττάρων ικανών να αποτελέσουν εργαλεία πρόσφορα στην επιτυχή ανίχνευση και αντιμετώπιση του καρκίνου, δηλαδή μορίων-βιοδεικτών. Ο ρόλος των βιοδεικτών στην αντιμετώπιση του καρκίνου είναι πολυσύνθετος και εκτείνεται από την πρώιμη ανίχνευση και έγκαιρη διάγνωση, την παρακολούθηση της πορείας της ασθένειας, την ανίχνευση της μεταστατικής δυνατότητας ενός καρκίνου, την παρακολούθηση της επιτυχίας της θεραπευτικής αγωγής έως ακόμα και τη σύνθεση νέων φαρμάκων ή θεραπευτικών συστημάτων χημειοπρόληψης.

Ένας ιδανικός βιοδείκτης για πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου θα πρέπει να εκφράζεται στα αρχικά στάδια και να εξειδικεύεται στα καρκινικά κύτταρα. Πολλές πρωτεΐνες όμως που υπερεκφράζονται στα κύτταρα των όγκων, έχουν αυξημένη έκφραση στα αναδιπλασιαζόμενα κύτταρα και επομένως εκφράζονται και σε μη καρκινικά κύτταρα που διαιρούνται, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα που υπόκεινται σε διαδικασίες αναγέννησης, μετά από τραυματισμό, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση στις προσπάθειες για πρώιμη διάγνωση. Ένας βιοδείκτης θα πρέπει να πληρεί συγκεκριμένες προϋποθέσεις για να είναι λειτουργικός [49] και τα τελευταία χρόνια πολλές επισκοπήσεις αναφέρονται στο ζήτημα των βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα και την πιθανή κλινική τους χρήση [41, 42, 50-52].

Γενετικοί δείκτες μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα βιολογικά υλικά που μπορούν να ληφθούν με μη παρεμβατικές μεθόδους όπως τα πτύελα (sputum), το βρογχοκυψελιδικό διάλυμα έκπλυσης (BAL), το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και το περιφερειακό αίμα (ορός/πλάσμα) [53].

Οι μοριακές γενετικές διαφοροποιήσεις που μελετώνται στον καρκίνο του πνεύμονα, ακόμα σε προ-καρκινικό στάδιο (preneoplastic cells), αφορούν μια πλειάδα παραγόντων. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται χρωμοσωμικές διαφοροποιήσεις όπως απαλοιφές στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 3p, απαλοιφή του 9p και του 8p21-23 και μεταλλάξεις στο 17p, αυξημένη έκφραση αυξητικών παραγόντων, όπως ο EGFR και ο EGFR 2 (HER-2/neu), μεταλλάξεις του ογκογονιδίου Ras και άλλοι δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ρυθμιστές της

απόπτωση όπως το p53 και η ενεργοποίηση της τελομεράσης (Εικόνα 1). Επίσης μελετώνται στοιχεία από τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα στο αίμα, όπως το συνολικό DNA, μεταλλάξεις γονιδίων, μικροδορυφορικές τροποποιήσεις και εντόπιση μεθυλιωμένων περιοχών των υποκινητών γονιδίων, καθώς και η εντόπιση συγκεκριμένων RNA στο πλάσμα του αίματος (πχ. hnRNP B1, Her2/neu) [52].



Εικόνα 1 Διαδοχικές μοριακές αλλαγές κατά τη διάρκεια της καρκινικής εξαλλαγής. Οι προ-κακοήθειες μεταβολές εντοπίζονται ήδη στο ιστολογικό στάδιο της υπερπλασίας και της δυσπλασίας και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πιθανοί δείκτες (προσαρμογή από Hilbe et al. 2004)

Η γονιδιωματική ανάλυση (genomics) του καρκίνου του πνεύμονα, στο επίπεδο της διαφοροποίησης και της εξέλιξης στους διάφορους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, προσπαθεί να εντοπίσει “υπογραφές” (signatures) και πρότυπα έκφρασης γονιδίων που να σχετίζονται με την καρκινική εξαλλαγή [54]. Οι τεχνικές υψηλής απόδοσης (high-throughput) οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της έκφρασης του mRNA, όπως η μελέτη μεγάλης κλίμακας βάσεων δεδομένων, πχ. σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (SAGE), σε συνδυασμό με μελέτη των δεδομένων από EST (expressed sequence tag) [55, 56], και τα chip γονιδίων (Affymetrix) [57, 58], εντοπίζουν αρκετά γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση στον καρκίνο, μέρος των οποίων επικυρώνονται με τεχνικές όπως qRT-PCR. Παρόλο όμως που τα αποτελέσματά τους είναι χρήσιμα στις έρευνες για βιοδείκτες, η γενικότερη κλινική τους χρησιμότητα περιορίζεται από τη συχνή έλλειψη συσχέτισης μεταξύ έκφρασης mRNA ενός γονιδίου και της πρωτεϊνικής έκφρασης. Οι Chen και συνεργάτες ανακάλυψαν ότι μόνο 21 από τα 98 γονίδια που εξετάστηκαν αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικά, όταν η έκφραση του mRNA και των πρωτεϊνών συγκρίθηκαν

σε 9 φυσιολογικά δείγματα ιστού από πνεύμονα και 76 δείγματα με αδενοκαρκίνωμα [59]. Σημαντική επίσης συνιστώσα στη χρησιμότητα την οποία μπορεί να έχει η μελέτη έκφρασης ενός γονιδίου, αποτελεί η ύπαρξη επιγενετικών διαδικασιών, ιδίως εκείνων οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την σίγαση ρυθμιστικών γονιδίων-“κλειδιών” [60].

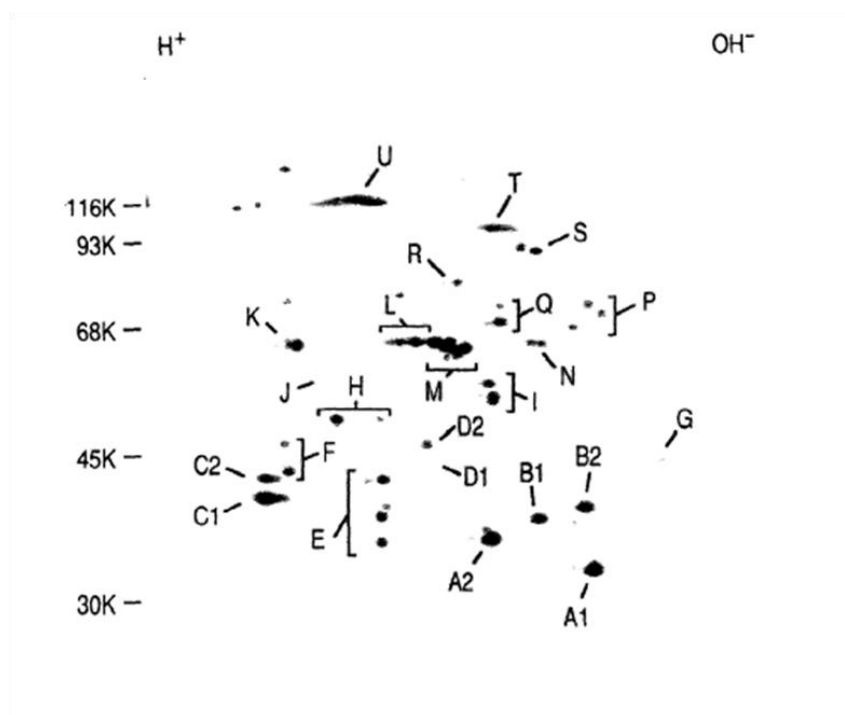
Οι πρωτεΐνες είναι τα μόρια που αποτελούν τους τελικούς εκτελεστές όλων των βιοχημικών αντιδράσεων στο κύτταρο, επομένως η μελέτη της έκφρασης τους αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό βήμα στη βιοπληροφορική ανάλυση. Οι τεχνικές πρωτεομικής, με έμφαση στη σύγκριση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από μια ευρεία κλίμακα βιολογικών υλικών, είναι τα νέα εργαλεία στην ανεύρεση διαφοροποιήσεων μεταξύ της πρόιμης καρκινικής και φυσιολογικής κατάστασης [61, 62]. Η τεχνολογία έχει επιτρέψει νέες τεχνικές πρωτεομικής ανάλυσης υψηλής απόδοσης όπως η χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) και η χρήση αντισωμάτων, που παράγουν ένα μεγάλο όγκο δεδομένων. Επίσης η βελτίωση των μεθόδων φασματοσκοπίας μάζας, όπως η Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with Time of Flight Mass Analysis (MALDI-TOF) και η Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization with Time of Flight Mass (SELDI-TOF), ή η χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας εν σειρά (LC-MS MS) βοήθησε στην αύξηση των δεδομένων για τα προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών στον καρκίνο και τη διαγνωστική ακρίβεια που παρουσιάζουν πχ. [63]. Η μη επεμβατική χρήση ορού αίματος διερευνάται ως προς τη δυνατότητα να παρέχει αξιόπιστα προφίλ έκφρασης πρωτεϊνών που θα ταυτοποιούν την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα [64, 65].

Μια πρωτεΐνη που φάνηκε ότι μπορεί να αποτελέσει ένα πιθανό βιοδείκτη για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα σε πρώιμο στάδιο είναι η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (hnRNP) A2/B1, που ανιχνεύθηκε με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας σε αποπίπτοντα κύτταρα σιέλου ως και 2 χρόνια πριν την κλινική παρουσία του καρκίνου σε ακτινογραφία με ακτίνες X [66]. Δεδομένου του πολυσύνθετου χαρακτήρα του καρκίνου, είναι βέβαιο ότι ο συνδυασμός περισσότερων του ενός βιοδεικτών θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, απ' ότι ένας μόνο βιοδείκτης. Είναι επομένως αναγκαία η συνέχιση και εντατικοποίηση των ερευνών που μπορούν να προσφέρουν νέους και πιο αποτελεσματικούς βιοδείκτες που να στοχεύουν στον καρκίνο του πνεύμονα.

A2. Πρωτεΐνες hnRNP

A2.1 Γενικά

Οι πρωτεΐνες hnRNP χαρακτηρίστηκαν αρχικά από την ικανότητά τους να προσδέονται στο ετερογενές πυρηνικό RNA. Ο όρος “ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες” χρησιμοποιείται για τις πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται ειδικά με το hnRNA, χωρίς να αποτελούν σταθερά συστατικά άλλων πυρηνικών RNP (όπως τα snRNP) και οι οποίες συνοδεύουν το hnRNA σε όλη την πορεία της βιογένεσής του έως την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα [67]. Καθώς το pre-mRNA συντίθεται από την RNA πολυμεράση II, το αναπτυσσόμενο μετάγραφο πακετάρεται σε σωματίδια ανάλογα των νουκλεοσωμάτων. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα δύο διαστάσεων των πρωτεϊνικών συστατικών αυτών των σωματιδίων, όπως απομονώθηκαν από κύτταρα HeLa με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά συγκεκριμένων πρωτεϊνών hnRNP, έδειξε ότι οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια με περισσότερα από 24 μέλη [68]. Οι πρωτεΐνες hnRNP είναι, μετά τις ιστόνες, οι πιο άφθονες πρωτεΐνες στον πυρήνα με 10^8 αντίγραφα ανά κύτταρο [69, 70]. Οι πρωτεΐνες hnRNP των κυττάρων HeLa παρουσιάζουν μοριακά βάρη από 34 kD έως 120 kD, το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) κυμαίνεται από 5,9 έως 9,1, και χαρακτηρίζονται με τα γράμματα A έως U κατά αυξανόμενο μοριακό βάρος, βάσει του εντοπισμού τους στο πήκτωμα διαχωρισμού (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Πρωτεϊνική σύσταση των συμπλόκων hnRNP, όπως αυτά απομονώνονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα 4F4 κατά των πρωτεϊνών C1, C2. Τα σύμπλοκα hnRNP απομονώθηκαν από ραδιοσημασμένα με ^{35}S -μεθειονίνη κύτταρα HeLa. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE) και ανιχνεύθηκαν με σπινθηρογραφία. (προσαρμογή από Dreyfuss et al., 1993).

Κύριο στοιχείο τους είναι η ικανότητα πρόσδεσης στο RNA και χωρίζονται σε υποομάδες ανάλογα με κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Οι πρωτεΐνες hnRNP που εντοπίζονται σε μεγαλύτερη αφθονία, και είναι οι πρώτες που μελετήθηκαν, είναι οι A1, A2, B1, B2, C1 και C2, οι ονομαζόμενες και κεντρικές (core) πρωτεΐνες [71, 72]. Οι πρωτεΐνες A1, A2, B1 και B2 αποτελούν την υποομάδα των hnRNP A/B, με την προσθήκη των νεότερων μελών A0 και A3, λόγω της υψηλής αλληλεπικάλυψης της δομής και της λειτουργίας τους [67]. Ενώ αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι πρωτεΐνες hnRNP είχαν δομικό και προστατευτικό ρόλο στα σύμπλοκα hnRNP και δεν υπήρχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη ρύθμισή τους, οι νεότερες μελέτες απέδειξαν ότι ο ρόλος τους είναι και λειτουργικός και η έρευνα εξελίσσεται προς την κατεύθυνση της κατανόησης τόσο του βιολογικού ρόλου όσο και της ρύθμισης αυτών των πρωτεϊνών.

Η υποομάδα τύπου A/B αποτελείται από πρωτεΐνες με μοριακά βάρη από 34 (32 A0) έως 39 kD και είναι βασικές με pI από 8,4 έως 9,1 (10,1 για την A0). Εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, έχουν όμως την ικανότητα να παλινδρομούν

μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Οι πρωτεΐνες C1 και C2, που αποτελούν μια δική τους υποομάδα, έχουν μοριακό βάρος 41 και 43 kD αντίστοιχα και pI όξινο, 5,9. Αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός μετάγραφου, με τη μεταξύ τους διαφορά να είναι 13 αμινοξέα, και έχουν σχεδόν αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση σε μεσοφασικά κύτταρα [67]. Οι κεντρικές πρωτεΐνες (τύπου A/B και C) εμφανίζονται φωσφορυλιωμένες *in vivo* σε διαφορετικό όμως βαθμό η κάθε μία [73-75].

Άλλες πρωτεΐνες hnRNP που έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί είναι οι I(PTB), K, J, L, U, D, H/H' και M. Η hnRNP I έχει μοριακό βάρος 59 kD και pI 8,5. Ταυτίζεται με την πρωτεΐνη που συνδέεται με την πολυπυριμιδική περιοχή στο 3' άκρο των εσωνίων του pre-mRNA (Polypyrimidine Tract-Binding Protein) και εντοπίζεται στον πυρήνα των μεσοφασικών κυττάρων. Από απομόνωση κλώνων της προέκυψε η εμφάνισή της με διάφορες ισομορφές, πιθανά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Οι hnRNP K και J έχουν μοριακό βάρος 68 και 62 kD αντίστοιχα, με pI 6,1 και 6,4. Πρόκειται για ανοσολογικά συγγενείς πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στον πυρήνα και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με αλληλουχίες κυτοσίνης (poly(C)). Η πρωτεΐνη hnRNP L, με μοριακό βάρος 68 kD και pI 7,4-7,7 εντοπίζεται στον πυρήνα σε διακριτές δομές, εκτός του πυρηνίσκου [76], και εμφανίζεται με αρκετές ισομορφές, πιθανώς προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Η πρωτεΐνη U είναι φωσφοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 120 kD και pI 6,6-7,2 και εντοπίζεται στον πυρήνα σε αφθονία. Η hnRNP D εμφανίζεται με 4 ισομορφές, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου pre-mRNA, με μοριακά βάρη 44-48 kD και pI 7,7-7,8. Η πρωτεΐνη αυτή παλινδρομεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος [67, 77]. Οι πρωτεΐνες hnRNP H/H' αποτελούν μια υποομάδα της οικογένειας των hnRNP. Είναι πρωτεΐνες ανοσολογικά συγγενείς και έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με την πρωτεΐνη hnRNP F. Οι πρωτεΐνες H και F έχουν μοριακά βάρη 56 και 53 kD αντίστοιχα και pI 6,1-7,1. Αντίθετα με την F, οι H/H' υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η διάσπαση. Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών H/H' είναι αυστηρά πυρηνικός, ενώ η πρωτεΐνη F μπορεί να εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα ή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου [78, 79]. Τέλος, οι πρωτεΐνες hnRNP M εμφανίζονται με τέσσερις ισομορφές με μοριακά βάρη από 64 έως 68 kD και pI 7,8-8,2. Είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε μεθειονίνη και προσδένουν σε αλληλουχίες γουανίνης (poly(G)) και ουρακίλης (poly(U)) με ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, μέχρι και 1 M NaCl.

Ομόλογες των ανθρώπινων hnRNP πρωτεϊνών απατώνται τόσο σε άλλα σπονδυλωτά, όσο και σε ασπόνδυλα. Η σύσταση των συμπλόκων hnRNP τα οποία απομονώθηκαν από κύτταρα σπονδυλωτών, τρωκτικών, πτηνών και αμφίβιων, είναι παρόμοια με αυτή των ανθρώπινων κυττάρων. Οι περισσότερες από τις κύριες πρωτεΐνες hnRNP παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα σπονδυλωτά, τόσο ανοσολογικά όσο και δομικά [76, 80-86]. Ειδικότερα για τις πρωτεΐνες της υποομάδας των A/B είναι γνωστό ότι κάθε μέλος της παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με το ομόλογο του στα διάφορα είδη σε σύγκριση με τη συγγένεια που παρουσιάζει με τα υπόλοιπα μέλη της υποομάδας του ίδιου είδους [87]. Έτσι, για παράδειγμα, η ανθρώπινη hnRNP A1 έχει 100% ομολογία με την A1 του αρουραίου και 92% ομολογία με την A1 του βατράχου [67, 84], ενώ παρουσιάζει μόνο 67% ομολογία με την ανθρώπινη hnRNP A2 [88], η οποία με τη σειρά της διαφέρει με την A2 του αρουραίου μόνο σε ένα αμινοξύ [89]. Στα ασπόνδυλα έχουν γίνει μελέτες κυρίως στη Δροσόφylla (*Drosophila melanogaster*), οι οποίες έδειξαν ότι τα σύμπλοκα hnRNP περιέχουν περισσότερες από 10 άφθονες πρωτεΐνες με μοριακά βάρη μεταξύ 36 και 75 kD. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση αυτών των πρωτεϊνών έδειξε ότι εμφανίζονται σε ομάδες ανοσολογικά συγγενών ισομορφών, όπως συμβαίνει και στις ανθρώπινες hnRNP. Επίσης πολλές από αυτές είναι προϊόντα εναλλακτικής ωρίμανσης του ίδιου μετάγραφου, ενώ οι κύριες πρωτεΐνες hnRNP που έχουν κλωνοποιηθεί από τη Δροσόφylla παρουσιάζουν δομή ανάλογη με τη δομή των πρωτεϊνών της υποομάδας A/B των σπονδυλωτών [90-93].

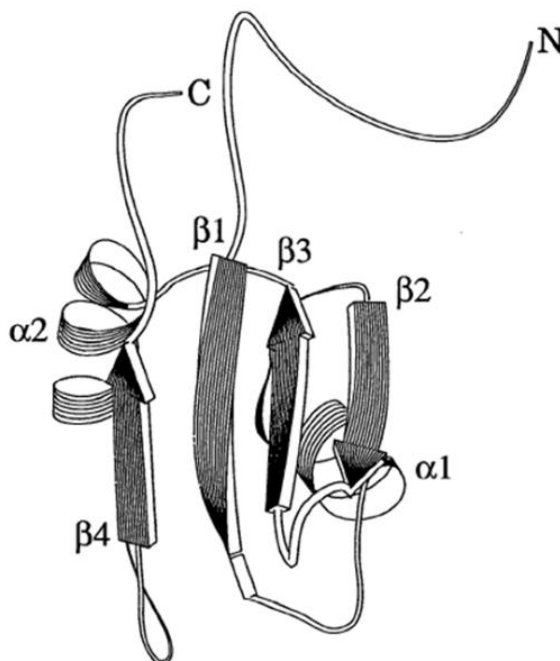
A2.2 Δομή των πρωτεϊνών hnRNP

Τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών hnRNP, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το λειτουργικό τους ρόλο. Με ανάλυση της αλληλουχίας του cDNA κλωνοποιημένων hnRNP, βρέθηκε ότι αποτελούνται από μία τουλάχιστον περιοχή που προσδίδει στις πρωτεΐνες την ικανότητα να προσδέουν στο RNA, καθώς και μία βοηθητική (*auxiliary*) περιοχή, η οποία είναι πιθανόν υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με άλλες πρωτεΐνες.

Οι περιοχές που δίνουν την ικανότητα στις hnRNP να προσδέουν στο RNA παρουσιάζονται με τρεις κυρίως μορφές, την συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο RNA που ονομάζεται RBD (RNA-Binding Domain) ή RRM (RNA Recognition

Motif) ή μοτίβο RNP (RNP motif), το πλαίσιο RGG (RGG box) και το μοτίβο KH (KH motif). Οι χαρακτηριστικές αυτές περιοχές εμφανίζονται και σε άλλες πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης στο RNA, που δεν ανήκουν στην οικογένεια των hnRNP, όπως σε κάποιες πρωτεΐνες snRNP και παράγοντες του ματίσματος και της μετάφρασης [94].

Η καλύτερα μελετημένη περιοχή είναι η ονομαζόμενη RBD η οποία εμφανίζεται στις περισσότερες από τις hnRNP, καθώς και σε άλλες πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA [95-99]. Η περιοχή αυτή αποτελείται από μια συντηρημένη αλληλουχία περίπου 90 αμινοξέων η οποία περιέχει δύο πολύ συντηρημένες αλληλουχίες, τις RNP1 και RNP2 οι οποίες απέχουν περίπου 30 αμινοξέα μεταξύ τους. Η RNP1 είναι ένα οκταπεπτιδίο με αλληλουχία : Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr-Gly/Ala-Phe-val-X-Phe/Tyr. Η RNP2 είναι εξαπεπτιδίο λιγότερο συντηρημένο, πλούσιο σε αρωματικά και αλειφατικά αμινοξέα. Έχει παρατηρηθεί ότι δύο περιοχές RBD που ανήκουν σε ομόλογες πρωτεΐνες διαφορετικών ειδών, ενδέχεται να έχουν μεγαλύτερη ομολογία μεταξύ τους, σε σχέση με την ομολογία που εμφανίζεται μεταξύ των περιοχών RBD εντός της ίδιας πρωτεΐνης. Επίσης στις πρωτεΐνες όπου συνυπάρχουν περισσότερες της μιας RBD, η κάθε περιοχή ενδέχεται να έχει διαφορετική λειτουργία και διαφορετική εξειδίκευση ως προς την πρόσδεση στο RNA [100]. Τα παραπάνω υποδεικνύουν μια ανεξάρτητη εξελικτική πορεία για κάθε RBD περιοχή, με ένα κοινό όμως αρχέγονο πρόγονο. Εκτός από την πρωτοταγή δομή της RBD περιοχής, έχουν γίνει μελέτες και για τη δευτεροταγή και τριτοταγή μορφή, με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [101] και μεθόδους Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) [102, 103], οι οποίες έδειξαν ότι η περιοχή αυτή έχει μια δευτεροταγή δομή τύπου $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$, με το «α» να υποδεικνύει διαμόρφωση α-έλικας και το «β» διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας (Εικόνα 3). Οι συντηρημένες αλληλουχίες RNP1 και RNP2 εντοπίζονται πάνω στις γειτονικές αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες που διαμορφώνουν οι $\beta 1-\beta 4$ στο χώρο. Η περιοχή RBD μπορεί να προσδέσει στο RNA με συγκεκριμένη αλληλουχία, αλλά επίσης και μη-ειδικά.



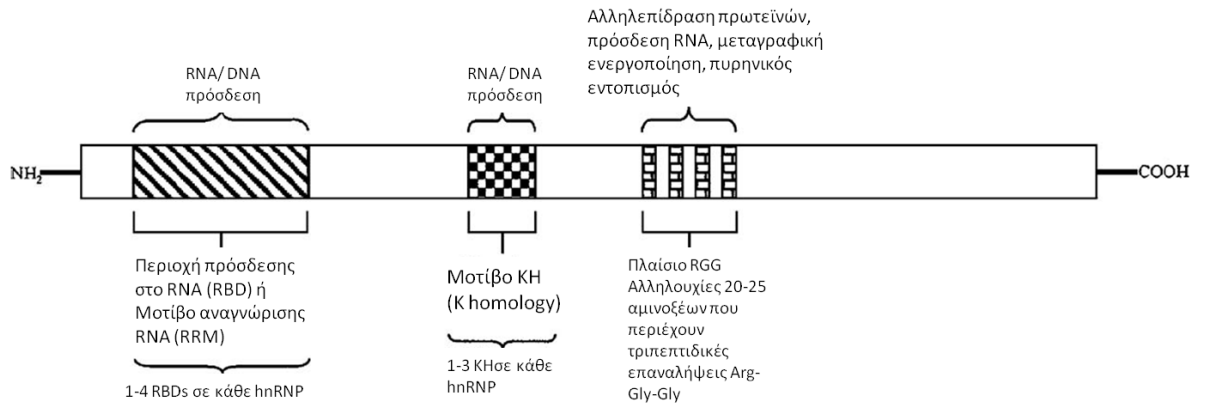
Εικόνα 3 Σχηματική παράσταση του RBD της πρωτεΐνης hnRNP C (αμινοξέα 9-24). Τα βέλη αντιπροσωπεύουν τις 4 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και οι σχηματισμοί κορδέλας τις 2 διαμορφώσεις α-έλικας. Οι αλληλουχίες RNP1 και RNP2 βρίσκονται εμβόλιμα στα γειτονικά κεντρικά αντιπαράλληλα σκέλη (β3-β1). Με N και C σημειώνεται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα (Dreyfuss et al.,1993).

Μια ακόμη περιοχή με ικανότητα πρόσδεσης RNA αποτελεί το πλαίσιο RGG (RGG box) το οποίο αποτελείται από επαναλήψεις τριπεπτιδίων αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης με ενδιάμεσα διάσπαρτα αρωματικά αμινοξέα. Η αρχική εντόπιση της συγκεκριμένης περιοχής πρόσδεσης RNA, έγινε στην hnRNP U, η οποία δεν έχει περιοχή RBD [104]. Ενώ θεωρήθηκε αρχικά ως η αναγκαία περιοχή για πρόσδεση RNA, η εύρεση της και στην hnRNP A1 η οποία περιέχει RBD, της προσδίδει επιπρόσθετο ρόλο, συνεργιστικό ως προς την πρόσδεση RNA ή την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Επίσης το πλαίσιο RGG έχει εντοπισθεί σε πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA, οι οποίες συμμετέχουν στη βιογένεση του pre-rRNA [104-106].

Τέλος μια περιοχή η οποία αναγνωρίστηκε και προσδιορίστηκε αρχικά στην hnRNP K [107], το μοτίβο KH (K Homology), επιτρέπει επίσης την πρόσδεση των πρωτεϊνών με RNA. Η περιοχή αυτή αποτελείται από μια αλληλουχία περίπου 45 αμινοξέων, με μια μερικώς συντηρημένη αλληλουχία κοντά στο κέντρο της περιοχής

(I-G-k-g/k-G) και υδρόφοβα αμινοξέα (Leu, Ile, Val) καταναμημένα σε τακτά διαστήματα. Το μοτίβο αυτό έχει εντοπιστεί σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών από οργανισμούς που απέχουν εξελικτικά μεταξύ τους, όπως οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες S3 (αρχαιοβακτήρια) και ο παράγοντας εναλλακτικού ματίσματος Mer1p του ζυμομύκητα [108, 109]. Στην πρωτεΐνη hnRNP K, η οποία δεν έχει περιοχή RBD, βρίσκονται 3 μοτίβα KH, τα οποία συνεισφέρουν εξίσου στην πρόσδεση του RNA.

Η βοηθητική περιοχή αποτελεί την περιοχή εκείνη που δε σχετίζεται άμεσα με την πρόσδεση RNA και η καλύτερα μελετημένη είναι αυτή των πρωτεϊνών της υποομάδας A/B, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία σε υψηλό ποσοστό γλυκίνης (Gly-rich). Για την βοηθητική περιοχή της hnRNP A1, στην οποία περιέχεται πλαίσιο RGG, οι ιδιότητες που προβάλλονται είναι η συμβολή στην πρόσδεση RNA, η ικανότητα ανασύνδεσης των αλυσίδων του RNA (strand annealing activity) [110], η ύπαρξη της περιοχής M9 ή αλλιώς σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS) και κυρίως η συμβολή της στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες (protein-protein interactions) [111-115]. Η βοηθητική περιοχή των hnRNP C είναι πλούσια σε όξινα αμινοξέα και όπως και της πρωτεΐνης hnRNP A1 τοποθετείται προς το καρβοξυτελικό άκρο τους. Στην περιοχή αυτή περιέχεται ένα σήμα εντοπισμού στον πυρήνα και μια πιθανή περιοχή πρόσδεσης τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (NTP) [85, 116]. Οι ίδιες περιοχές (NLS, NTP) πιθανόν βρίσκονται και στη βοηθητική περιοχή της πρωτεΐνης hnRNP U [104]. Χαρακτηριστικό των βοηθητικών περιοχών πολλών πρωτεϊνών hnRNP είναι ότι θυμίζουν ευκαρυωτικούς παράγοντες μεταγραφής, καθώς σε αυτές περιέχονται ομάδες πλούσιες σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Για παράδειγμα η hnRNP U περιέχει μια αλληλουχία 50 αμινοξέων με το 28% αυτών να είναι γλουταμίνη, όπως και μια περιοχή πλούσια σε όξινα αμινοξέα. Επίσης οι πρωτεΐνες hnRNP K και hnRNP L περιέχουν ομάδες προλίνης, θυμίζοντας τους παράγοντες μεταγραφής CCAAT (CTF) [76, 82, 117].



Εικόνα 4 Κοινές δομικές περιοχές που παρατηρούνται στα μέλη της οικογενείας των hnRNP. Παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα στο οποίο φαίνεται η πρωτεϊνική διαμόρφωση και σημειώνονται το αμινο (NH₂) και καρβοξύ (COOH) τελικά άκρα. Όλα τα μέλη περιέχουν τουλάχιστον μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεϊκών οξέων που μπορεί να προσδεθεί με DNA και/ή RNA με εξαρτώμενο από την αλληλουχία τρόπο. Οι πρωτεΐνες hnRNP περιέχουν επίσης βοηθητικές περιοχές οι οποίες εμπλέκονται στην πρόσδεση RNA, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και/ή στην κυτταρική εντόπιση (προσαρμογή από Carpenter et al., 2006).

A2.3 Πρωτεΐνες hnRNP της υποομάδας A/B

Μια κύρια, και πιο καλά μελετημένη, υποομάδα των πρωτεϊνών hnRNP, είναι αυτή των πρωτεϊνών τύπου A/B. Αυτή η υποομάδα αποτελείται από τα ακόλουθα μέλη :

- Την πρωτεΐνη hnRNP A1 και την ισομορφή της A1b, η οποία αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου. Μια ακόμη μορφή της hnRNP A1 που προκύπτει όμως από μετα-μεταφραστική τροποποίηση (προτεολυτική αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου της) είναι η πρωτεΐνη UP1.

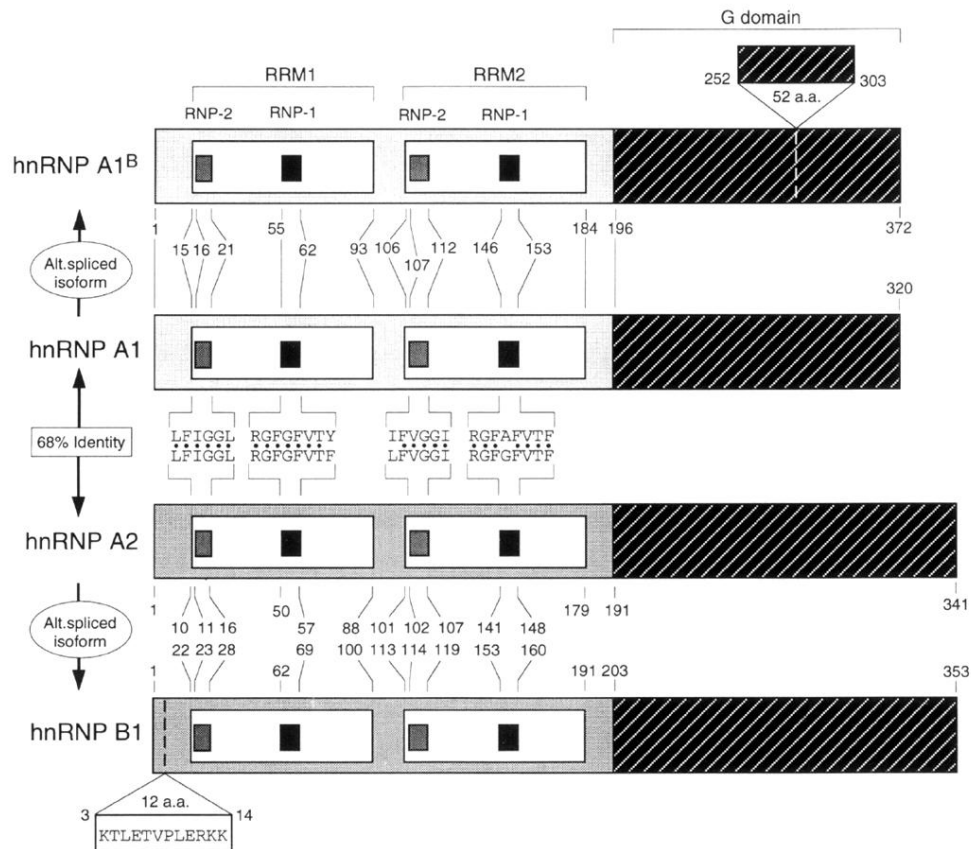
- Τις πρωτεΐνες hnRNP A2 και hnRNP B1, οι οποίες αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός γονιδίου. Νεότερες αναγνωρισμένες ισομορφές του ίδιου γονιδίου είναι και οι hnRNP B0a και hnRNP B0b.

- Την πρωτεΐνη hnRNP B2, η πρωτοταγής δομή της οποίας δεν έχει ταυτοποιηθεί.

- Την πρωτεΐνη hnRNP A3 που προστέθηκε σαν το νεότερο μελετημένο μέλος της υποομάδας.

- Την πρωτεΐνη hnRNP A0, μια λιγότερο άφθονη πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος κανενός από τα γονίδια των υπόλοιπων hnRNP A/B [118].

Όλες οι πρωτεΐνες της υποομάδας είναι άφθονες, εκτός της hnRNP A0, είναι βασικές και εμφανίζουν ένα μεγάλο αριθμό ισομορφών. Υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, κυρίως σε φωσφορυλίωση και μεθυλίωση της αργινίνης, ενώ οι πιο πολλές από αυτές παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Οι hnRNP πρωτεΐνες της υποομάδας των A/B μοιράζονται ένα ειδικό δομικό μοτίβο. Συγκεκριμένα αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης RNA, RBD (RBD I και RBD II) εν σειρά, και από μια βοηθητική περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (Gly-rich auxiliary domain) (Εικόνα 5). Η περιοχή των RBD παρουσιάζει την υψηλότερη ομολογία ακολουθίας αμινοξέων ανάμεσα στις hnRNP A2/B1 και A1, φτάνοντας το 80%, ενώ η ομολογία της βοηθητικής περιοχής μεταξύ των δύο πρωτεϊνών φτάνει το 30% σε αμινοξέα, ενώ υπάρχει σημαντική ομολογία στα συνολικά αμινοξέα [119].



Εικόνα 5 Δομή των αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών τύπου A/B, A1, A1B, A2, B1. Σημειώνονται οι περιοχές RBD, οι εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες RNP-2 και RNP-1, καθώς και η πλούσια σε γλυκίνη βοηθητική περιοχή. Επίσης, σημειώνονται τα επιπλέον εξόνια τα οποία περιέχουν οι ισομορφές A1B και B1 και τα οποία προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (από Mayeda et al., 1994).

Η πρωτεΐνη hnRNP A3 παρουσιάζει συνολικά μεγαλύτερη ομολογία αμινοξέων με την hnRNP A1 απ' ότι με την hnRNP A2/B1. Ειδικά στην περιοχή των RBD, η hnRNP A3 ομοιάζει περισσότερο με τη A1 απ' ότι με την A2, ενώ στη βοηθητική περιοχή αυτό αντιστρέφεται, με την A3 να έχει μεγαλύτερη ομολογία με την A2, παρατήρηση που οδήγησε στην υπόθεση ότι το γονίδιο της hnRNP A3 ενδεχομένως να προέρχεται από ανασυνδυασμό του 5' άκρου ενός προγενέστερου γονιδίου της hnRNP A1 με το 3' άκρο ενός γονιδίου της hnRNP A2 [120]. Η hnRNP A0 εμφανίζει ομολογία κατά 58% με την hnRNP A1 και 64% με την hnRNP A2. Στην καρβοξυτελική περιοχή των πρωτεϊνών A/B εντοπίζεται επίσης μια περιοχή 38 αμινοξέων η οποία ονομάζεται M9 και η οποία αποτελεί το σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS), ενώ ταυτόχρονα είναι υπεύθυνο για την παλινδρόμηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (nuclear import/export signal) [111, 121]. Διερεύνηση

της καρβοξυτελικής περιοχής της hnRNP A2/B1 που φέρει RGG, έδειξε ότι η κατάσταση μεθυλίωσης αυτής της περιοχής καθορίζει τον υπο-κυτταρικό εντοπισμό της A2/B1 [122]. Το εναλλακτικό μάτισμα των γονιδίων των πρωτεϊνών A/B, γενικά αφήνει ανέπαφα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, παρότι -για παράδειγμα- η ακολουθία 12 αμινοξέων που περιέχονται στη B1 εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης του RNA και η εξαίρεση του εξονίου 9 απομακρύνει μερικά αμινοξέα από την RGG περιοχή [123]. Ενώ οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της υποομάδας A/B είναι σχετικά περιορισμένες, εντούτοις σε πολλές περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν τόσο στη δραστηριότητά τους [124] όσο και στον υπο-κυτταρικό εντοπισμό τους [89], πιθανώς ως συνέπεια των μικρών διαφορών στην πρωτοταγή τους δομή.

Το γονίδιο της hnRNP A2/B1, το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 7p15, κλωνοποιήθηκε από τους Burd et al. και αποτελείται από ένα μόνο αντίγραφο (single copy) το οποίο περιέχει 12 εξόνια [119]. Αυτό το γονίδιο υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα και παρουσιάζει 4 ισομορφές. Η συνύπαρξη και των 12 εξονίων του γονιδίου παράγει την πρωτεΐνη hnRNP B1, ενώ η αφαίρεση του εξονίου 2, που περιέχει 36 νουκλεοτίδια, παράγει την πρωτεΐνη hnRNP A2 [125]. Μεταγενέστερα αναφέρθηκε ότι το εναλλακτικό μάτισμα με στόχο το εξόνιο 9, παράγει τις πρωτεΐνες B0b και B0a, οι οποίες στερούνται του εξονίου 9 ή και των δύο εξονίων, 2 και 9 αντίστοιχα [89]. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι μορφές B0a/b έχουν ιστοειδική έκφραση, με περιορισμό στους όρχεις των ποντικών, αλλά πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έκφρασή τους δεν περιορίζεται στο συγκεκριμένο ιστό. Λίγα στοιχεία που αφορούν στη μοριακή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της hnRNP A2/B1 είναι γνωστά. Η ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου αποκάλυψε ένα μοναδικό σημείο εκκίνησης της μεταγραφής, 162 νουκλεοτίδια ανοδικά (upstream) της αλληλουχίας ATG. Η περιοχή του υποκινητή δεν περιέχει πλαίσιο TATA, ωστόσο εντοπίζονται συναινετικές (consensus) αλληλουχίες CCAAT, ενώ περιέχει δομικά χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν με ένα γονίδιο βασικών λειτουργιών (housekeeping gene) [125, 126]. Τέλος ο υποκινητής του γονιδίου της A2/B1 φαίνεται να έχει παρόμοια ισχύ με τον ομόλογο υποκινητή του γονιδίου της hnRNP A1, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτά τα γονίδια μπορεί να ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο, καθώς μάλιστα η οργάνωση εσωνίων/εξονίων της A2/B1 και της A1 υποδηλώνει ότι και τα δύο γονίδια προήλθαν από διπλασιασμό γονιδίων [125]. Σε μία από τις ελάχιστες εργασίες για την έκφραση της hnRNP A2/B1 φάνηκε ότι ο νέος παράγοντας μεταγραφής, η πυρηνική πρωτεΐνη η σχετική με DEAF1 (nuclear-DEAF1-related protein) καταστέλλει τη μεταγραφή της

hnRNP A2/B1 [127], ωστόσο εκκρεμεί η αποσαφήνιση των λεπτομερών μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για τη μεταγραφή της hnRNP A2/B1. Μία μόνο εργασία διερευνά τη σταθερότητα του μηνύματος της hnRNP A2/B1. Η σταθερότητα του mRNA αυτής της πρωτεΐνης μειώνεται από 16 ώρες, υπό νορμοξικές συνθήκες (φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου), σε 4 ώρες σε υποξικά κύτταρα MCF7 [128].

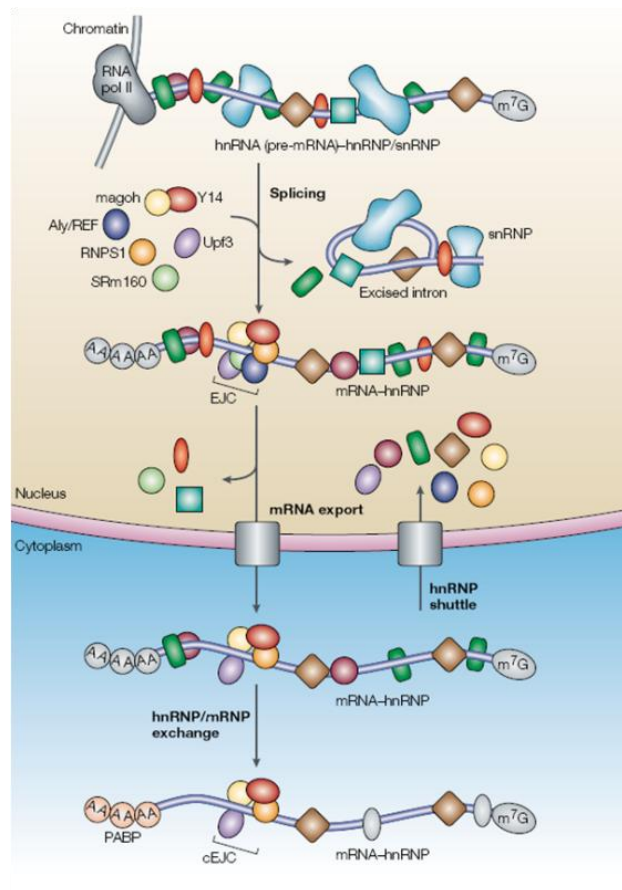
Το γονίδιο της hnRNP A1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q13.1 [129] και αποτελεί μέρος μιας μεγάλης ομάδας περίπου 30 -ειδικών για A1- αλληλουχιών που εντοπίζονται στο γονιδίωμα, κυρίως επεξεργασμένων ψευδογονιδίων. Αποτελείται από 10 εξόνια, εκ των οποίων το όγδοο υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα, με την προσθήκη του να δίνει την ισομορφή A1b [130]. Όσον αφορά στη ρύθμιση του γονιδίου της A1, οι Biamonti και συνεργάτες βρήκαν τουλάχιστον 12 στοιχεία ελέγχου του υποκινητή του γονιδίου, τα οποία διαιρούνται σε 2 κύριες περιοχές πρόσδεσης πρωτεϊνών. Με τη χρήση δοκιμών προστασίας από DNάση επιβεβαίωσαν την ύπαρξη δύο SP1 περιοχών πρόσδεσης και δύο πλαισίων CCAAT, από τα οποία όμως μόνο το ένα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CTF/NFI. Επίσης εντοπίστηκε ένα στοιχείο απόκρισης στο cAMP, μολονότι η ακολουθία αυτή παρουσιάστηκε ανεπαρκής για μεταγραφή που ενεργοποιείται από cAMP. Στον υποκινητή περιέχονται και πολλές αλληλουχίες CACGTG που αναγνωρίζονται από τον παράγοντα μεταγραφής και ογκοπρωτεΐνη c-myc, όπως επίσης και δύο παρακείμενα πλαίσια GC, τα οποία παρουσιάζουν ομοιότητες με πολλούς κυτταρικούς και ιογενείς ενισχυτές. Ο υποκινητής του γονιδίου της hnRNP A1 εμφανίζεται κατά 5-10 φορές ισχυρότερος από τους ιογενείς υποκινητές των SV40 και RSV. Γενικά, η μεταγραφή της hnRNP A1 είναι πιθανό να επιτυγχάνεται με τη συνεργατική επίδραση πολλαπλών στοιχείων της μεταγραφής [131]. Τέλος σε μια αναφορά περιγράφεται ότι το ογκογονίδιο v-src καταστέλλει τη μεταγραφή της hnRNP A1 [132].

Το γονίδιο της hnRNP A3 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2q31.2. και περιέχει 11 εξόνια. Έχουν βρεθεί αρκετά ψευδογονίδια για την hnRNP A3, που δεν έχουν εσώνια, τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι. Το γονίδιο υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα, παράγοντας τις 4 ισομορφές της πρωτεΐνης οι οποίες εντοπίστηκαν με ανοσοσύπωση. Όπως αναφέρθηκε και για τις άλλες πρωτεΐνες hnRNP A/B ο υποκινητής του γονιδίου δεν έχει πλαίσιο TATA, ενώ περιέχει αλληλουχίες πλούσιες σε GC και μοτίβο έναρξης της αντιγραφής όμοιο του CAAT σε κοντινή απόσταση από το σημείο έναρξης [133].

Όσον αφορά στη μεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών, δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές. Σε αντιδιαστολή με την hnRNP A2/B1 της οποίας το mRNA εμφανίζεται να μεταφράζεται στον ίδιο βαθμό σε κύτταρα HeLa που πολλαπλασιάζονται και σε κύτταρα σε φάση ηρεμίας, το mRNA της hnRNP A1 μεταφράζεται αποτελεσματικότερα σε κύτταρα που αναπτύσσονται παρά σε κύτταρα στατικής φάσης [134]. Τέλος η πρωτεΐνη Von Hippel-Lindau (pVHL), προϊόν ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου (tumor suppressor gene), δρα ως λιγάση E3 (ubiquitin ligase E3), η οποία στοχεύει την hnRNP A2/B1 για αποδόμηση μέσω του προτεασώματος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [135].

A2.4 Βιολογικοί ρόλοι των πρωτεϊνών hnRNP

Ο βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών hnRNP δεν περιορίζεται στην προστασία του RNA, όπως είχε αρχικά διατυπωθεί, δηλαδή δεν έχουν χαρακτήρα καθαρά δομικό. Αντίθετα πληθώρα μελετών προσδίδουν σε αυτές ένα πολλαπλό και δυναμικό ρόλο που εκτείνεται σε πλήθος κυτταρικών δραστηριοτήτων. Η συμμετοχή τους σε όλα τα στάδια βιογένεσης του mRNA (Εικόνα 6) επιτρέπει το χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών σαν ένα υποσύνολο παραγόντων που δρουν *in trans*, απαραίτητων για την ωρίμανση του pre-mRNA [70].



Εικόνα 6 Σχηματική παράσταση ενός γενικευμένου μοντέλου της βιογένεσης του mRNA, με τη συμμετοχή πρωτεϊνών hnRNP, καθώς και άλλων παραγόντων του ματίσματος, της πολυαδενυλίωσης και της μεταφοράς του ώριμου mRNA στο κυτταρόπλασμα. Σημειώνεται ο ρόλος ενός συμπλόκου EJC (exon-junction-complex) στην έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, καθώς και η παλινδρόμηση πρωτεϊνών hnRNP (από Dreyfuss et al., 2002).

Ο ρόλος τους όμως επεκτείνεται λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα πολλών εξ αυτών για διασύνδεση και με το DNA (ss-DNA, ds-DNA) [136, 137].

Μελέτες έχουν συνδέσει τις πρωτεΐνες hnRNP με την αντιγραφή του DNA, την επιδιόρθωση του και τη διατήρηση των χρωμοσωμάτων μέσω της ρύθμισης των τελομερών. Η πρωτεΐνη hnRNP A1 έχει την ικανότητα να αποσταθεροποιεί την έλικα του DNA και έτσι να είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανασύνδεση μιας μονής αλυσίδας [110] ή δύο συμπληρωματικών αλυσίδων [110, 138]. Οι στόχοι της hnRNP A1, και της ισομορφής της UP1, για την αποσταθεροποίηση περιλαμβάνουν σχηματισμούς G-quartets οι οποίοι πιστεύεται ότι παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη διατήρηση των τελομερών [139-141]. Επίσης και οι πρωτεΐνες hnRNP A2/B1 και A3 σχετίζονται με αυτές τις δομές [142], ενώ η hnRNP

A2 μπορεί να αποσταθεροποιήσει τη δομή G'2 d(CGG)_n, παρόμοια της G-quartet [143]. Οι πρωτεΐνες hnRNP A/B παίζουν πολλούς ρόλους στην αντιγραφή του DNA. Η UP1 διεγείρει τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης α η οποία προάγει το σχηματισμό των θραυσμάτων Okazaki [144, 145] και η hnRNP A1 διεγείρει στη συνέχεια τη δραστηριότητα της ανθρώπινης flap ενδονουκλεάσης 1 (FEN-1) κατά την ωρίμανση των θραυσμάτων [146]. Η hnRNP A2 δεσμεύει την ογκοπρωτεΐνη SET, ένα κεντρικό ρυθμιστή της αντιγραφής, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και της μεταγραφής, και δρα ως αναστολέας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A), ενός ενζύμου το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση [147]. Τέλος η hnRNP A1 αλληλεπιδρά με την DNA τοποϊσομεράση I (TopI) [148] η οποία ρυθμίζει την τοπολογία του DNA κατά την αντιγραφή και τη μεταγραφή.

Όσον αφορά την επιδιόρθωση του DNA, η hnRNP B1 αλληλεπιδρά με την εξαρτώμενη από DNA πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK), ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο σχετίζεται με την επιδιόρθωση, και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αναστολή του DNA-PK, προσδίδοντας στην B1 το ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της επιδιόρθωσης. Επιπλέον έχει δείχθει ότι η επιδιόρθωση θραύσεων της DNA αλυσίδας ενισχύεται με τη μείωση της έκφρασης της hnRNP B1 με siRNA [149]. Επίσης η πρωτεΐνη hnRNP C1/C2 σχετίζεται με την επιδιόρθωση θραύσεων διπλής αλυσίδας του χρωμοσωμικού DNA πιθανόν μέσω φωσφορυλίωσής της από το DNA-PK [150, 151].

Το μήκος των τελομερών θέτει ένα όριο στον αριθμό των αντιγραφών, τον οποίο μπορεί να υποστεί ένα χρωμόσωμα και η μείωση των τελομερών τελικά αποτελεί το σήμα για τη γήρανση των κυττάρων [152]. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί και ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια που πρέπει να υπερβεί ένα καρκινικό κύτταρο, ώστε να διαιρείται επ' άπειρον και πολλές φορές αυτό επιτυγχάνεται με την υπερ-έκφραση της τελομεράσης, ενός ενζύμου υπεύθυνου για την επιμήκυνση των τελομερών [153]. Πειράματα *in vitro* έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες hnRNP D, hnRNP A2/B1 και hnRNP A1 προσδένουν με υψηλή συγγένεια στις ανθρώπινες DNA αλληλουχίες των τελομερών, που είναι πλούσιες σε G, όπως και οι πρωτεΐνες C1/C2, και E [154-158]. Επιπλέον οι hnRNP D και UP1 αλληλεπιδρούν απευθείας με την τελομεράση, όπως και η hnRNP A1, [155, 159], μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ της RRM περιοχής και του RNA συστατικού της τελομεράσης [159]. Τα χρωμοσώματα της ερυθρολευχαιμικής κυτταρικής σειράς CB3 των ποντικών, η οποία δεν περιέχει πρωτεΐνη hnRNP A1, έχουν μη φυσιολογικά κοντά τελομερή σε σχέση με τη

κυτταρική σειρά CB7 η οποία εκφράζει την πρωτεΐνη. Η αποκατάσταση της έκφρασης της hnRNP A1, και της ισομορφής UP1, στην ελλειμματική σειρά αποκαθιστά το μέγεθος των τελομερών [157], υποδηλώνοντας ένα ρόλο για τις hnRNP πρωτεΐνες στη διατήρηση των τελομερών μέσω της επιστράτευσης της τελομεράσης στις πλούσιες σε G περιοχές των τελομερικών άκρων [160]. Η hnRNP A2 των ποντικών συνδέεται με την μονοκλωνική τελομερική επανάληψη (TTAGGG)_n όπως και με την αντίστοιχη RNA αλληλουχία UUAGGG [161] και επίσης προστατεύει την τελομερική αλληλουχία αλλά όχι την συμπληρωματική της [162]. Ένας παρόμοιος προστατευτικός ρόλος έχει προταθεί πρόσφατα και για τη σύνδεση της hnRNP A3 σε τελομερικές αλληλουχίες [163], ενώ έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η σύνδεση αυτή αναστέλλει τη λειτουργία της τελομεράσης [164].

Σε μοριακό επίπεδο οι πρωτεΐνες hnRNP, κυρίως οι A/B, μπορεί να λειτουργούν ως γέφυρες μεταξύ των τελομερών και του RNA συστατικού της τελομεράσης. Τα RRM της hnRNP A1 μπορούν να συνδέονται ταυτόχρονα στις τελομερικές DNA επαναλήψεις και στο RNA στοιχείο της τελομεράσης, το οποίο δείχνει ότι η hnRNP A1 μπορεί να φέρει την τελομεράση στα άκρα των χρωμοσωμάτων [159]. Και η hnRNP A2 διασυνδέεται με το RNA της τελομεράσης (hTERT) [162] αλλά δεν είναι γνωστό αν ταυτόχρονα μπορεί να συνδεθεί και με τα τελομερή. Ο πιθανός ρόλος της hnRNP A2/B1 στη βελτίωση της σταθερότητας της δράσης της τελομεράσης είναι μία οδός μέσω της οποίας τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στα μεταμορφωμένα κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν στο νεοπλαστικό φαινότυπο [165].

Πολλές από τις πρωτεΐνες hnRNP συμμετέχουν στη μεταγραφή (ή δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες). Πιο καλά μελετημένη είναι η hnRNP K, η οποία προσδένει στο DNA σε συγκεκριμένη αλληλουχία (TC tracts) που εντοπίζεται στους υποκινητές των ανθρώπινων πρωτο-ογκογονιδίων c-Src και c-myc, ενώ αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη που προσδένει στο πλαίσιο TATA (TBP) [166, 167]. Επίσης η μεταγραφή του egr-1 γονιδίου στηρίζεται στην παροδική επιστράτευση της hnRNP K [168], ενώ αυτή η δράση της ως μεταγραφικού παράγοντα είναι ανεξάρτητη από τη δράση της στο κυτταρικό mRNA [169]. Η hnRNP K όμως εμφανίζεται και σαν αναστολέας της μεταγραφής, στην περίπτωση που διασυνδέεται με τον παράγοντα μεταγραφής C/EBP-β οδηγώντας τον σε απενεργοποίηση (χωρίς η hnRNP K να συνδεθεί με το DNA) [170]. Παρόμοιο αποτέλεσμα αναστολής της μεταγραφής παρουσιάζεται και με την δράση της hnRNP U στην επιμήκυνση του RNA μέσω της

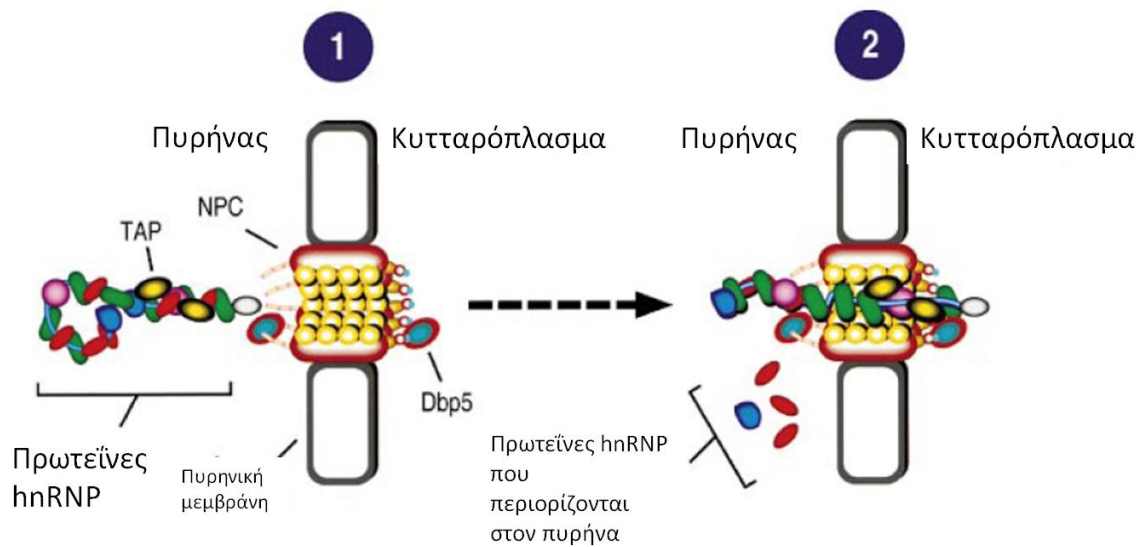
RNA πολυμεράσης II, μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα TFII H [171], ενώ μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι αλληλεπιδρά και απευθείας με την RNA πολυμεράση II, ενεργοποιώντας όμως αυτή τη φορά τη μεταγραφή [172]. Επίσης οι πρωτεΐνες της υποομάδας A/B συμμετέχουν στη μεταγραφή, κυρίως οι hnRNP A1, A2 και A3, δεδομένου ότι έχουν την ικανότητα να συνδέονται σε στοιχεία των υποκινητών αρκετών γονιδίων και μπορούν να δράσουν σαν ενεργοποιητές ή καταστολείς της μεταγραφής, όπως περιγράφεται εκτενώς στην ανασκόπηση των He και Smith [137].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πρωτεΐνες hnRNP εμπλέκονται σε όλα τα στάδια βιογένεσης του mRNA. Έτσι η hnRNP H έχει ταυτοποιηθεί ως παράγοντας που ενεργοποιεί τις αντιδράσεις διάσπασης και πολυαδενυλίωσης του 3' άκρου του pre-mRNA [173], ενώ αντίθετα η hnRNP F δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής εκτελώντας την αντίστροφη διαδικασία [174]. Επίσης η πρωτεΐνη hnRNP I μπορεί να δράσει και σαν θετικός και σαν αρνητικός ρυθμιστής της πολυαδενυλίωσης, αλληλεπιδρώντας με έναν ή περισσότερους παράγοντες ωρίμανσης του 3' άκρου, με αποτέλεσμα την έμμεση ρύθμιση της πολυαδενυλίωσης [175, 176]. Εμπλοκή την πρωτεϊνών hnRNP παρατηρείται και στη σταθεροποίηση του mRNA. Η hnRNP D δεσμεύει mRNAs που περιέχουν το στοιχείο ARE (A+U-rich element) στην μη μεταφραζόμενη περιοχή του 3' άκρου τους (3' UTR), και τροποποιεί το χρόνο ημιζωής αυτών των mRNAs οδηγώντας τα σε γρήγορη αποσύνθεση [177-179]. Αντιστρόφως, η hnRNP D μπορεί να δράσει και σαν παράγοντας σταθεροποίησης του μηνύματος, όπως στην περίπτωση της δημιουργίας του συμπλόκου α σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες hnRNP E1 και E2, το οποίο σταθεροποιεί το mRNA της ανθρώπινης α-γλοβίνης [180-182]. Έχει ακόμη παρατηρηθεί ότι η hnRNP A2/B1 που προσδένεται σε ένα στοιχείο ARE, αποσταθεροποιεί το mRNA του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT1 [183, 184], ενώ αντίθετα η σύνδεσή της με το mRNA της α υπομονάδας της προλυλ 4-υδροξυλάσης του κολλαγόνου (Collagen prolyl 4-hydroxylase α -subunit) το σταθεροποιεί [185].

Πρωτεΐνες hnRNP συμπεριλαμβάνονται και στους παράγοντες που δρουν *in trans* στη ρύθμιση της ανακύκλωσης (turnover) του mRNA, όπως είναι οι πρωτεΐνες hnRNP C, D, L και E [180, 186, 187].

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών hnRNP αναφέρεται στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, ο οποίος ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση τους. Όπως προαναφέρθηκε, πολλές πρωτεΐνες hnRNP έχουν την ιδιότητα να εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα,

καθώς έχουν την ικανότητα να παλινδρομούν ανάμεσα στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα. Η παλινδρόμηση αυτή των πρωτεϊνών υποδηλώνει πιθανόν και τη συμμετοχή τους στη μεταφορά του mRNA [115, 188]. Τα ώριμα μετάγραφα εξάγονται από τον πυρήνα συνοδεία συμπλόκων hnRNP. Οι πρωτεΐνες με κύριο εντοπισμό στον πυρήνα, όπως οι hnRNP C και U, διαχωρίζονται από το σύμπλοκο και παραμένουν εντός του πυρήνα, ενώ οι πρωτεΐνες με ικανότητα παλινδρόμησης, όπως οι A1, E και K μεταναστεύουν στο κυτταρόπλασμα μαζί με το mRNA και κατόπιν επιστρέφουν στον πυρήνα [189, 190]. Η hnRNP A1 προσδένει σε poly(A)⁺ RNA τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδεικνύει ότι εξάγεται μαζί με το mRNA [191], ενώ η ορθόλογη της A1 πρωτεΐνη hrp36 του *Chironomus tentans* έχει παρατηρηθεί σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο να συνοδεύει το mRNA διαμέσου των πυρηνικών πόρων στα πολυσώματα [192]. Έχει επίσης δειχθεί ότι η hnRNP A2/B1 είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του mRNA της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρόσδεσης σε μια ακολουθία 11 νουκλεοτιδίων, η οποία ονομάζεται στοιχείο απόκρισης της A2 (A2 response element (A2RE)) [193, 194]. Στην παραπάνω έρευνα βρέθηκε ότι και η hnRNP A1 προσδένει στο A2RE, με χαμηλότερη ωστόσο συγγένεια, γεγονός που υποδηλώνει πιθανώς διαφορετικούς στόχους για αυτές τις δύο πρωτεΐνες. Επίσης η πρωτεΐνη hnRNP L θεωρείται απαραίτητη για την έξοδο μετάγραφων mRNA τα οποία προέρχονται από γονίδια χωρίς εσώνια [114]. Ο μηχανισμός εισόδου της hnRNP A1 στον πυρήνα έδειξε ότι το μοτίβο M9, που όπως αναφέρθηκε εντοπίζεται στο καρβόξυτελικό άκρο της, είναι υπεύθυνο για την παλινδρόμηση, ενώ δύο υποδοχείς μεταφοράς, οι transportin 1 και transportin 2, θεωρούνται υπεύθυνοι για την επάνοδο της hnRNP A1 στον πυρήνα [195-200]. Ο μηχανισμός εξόδου των hnRNP από τον πυρήνα δεν είναι πλήρως κατανοητός, αν και το μοτίβο M9 θεωρείται υπεύθυνο και για την έξοδο αλλά και την είσοδο στον πυρήνα. Ένας πιθανός μηχανισμός εξόδου των hnRNP που φέρουν mRNA σε διασύνδεση, σύμφωνα με την Pinol-Roma, είναι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε διασύνδεση με αυτά τα mRNA και φέρουν σήμα αποκλειστικής εντόπισης στον πυρήνα, όπως οι hnRNP C1/C2 (Εικόνα 7) [201].



Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση της εξόδου του mRNA στο κυτταρόπλασμα μέσω του πυρηνικού πόρου (NPC: σύμπλοκο πυρηνικού πόρου) (προσαρμογή από Nakielny et al, 1999).

Η σύνθεση νέου mRNA φαίνεται να δρα σαν σήμα για την εισαγωγή των hnRNP A/B στον πυρήνα. Αναστολή της δράσης της πολυμεράσης II μέσω ακτινομυκίνης D σε κύτταρα HeLa, όπως και παύση της μεταγραφής σε έμβρυα ποντικών οδήγησε στη διάχυση της πρωτεΐνης hnRNP A1 στο κυτταρόπλασμα και στην κατακράτηση της, ενώ η έναρξη της μεταγραφής είχε σαν αποτέλεσμα την επαναφορά της στον πυρήνα [191, 202]. Η αναστολή της μεταγραφής διαταράσσει και την υποκυτταρική εντόπιση της hnRNP A2/B1 [203]. Είναι πιθανό η σύνδεση με διάφορους παράγοντες να είναι υπεύθυνη για την έξοδο των A/B πρωτεϊνών από τον πυρήνα [189, 204, 205].

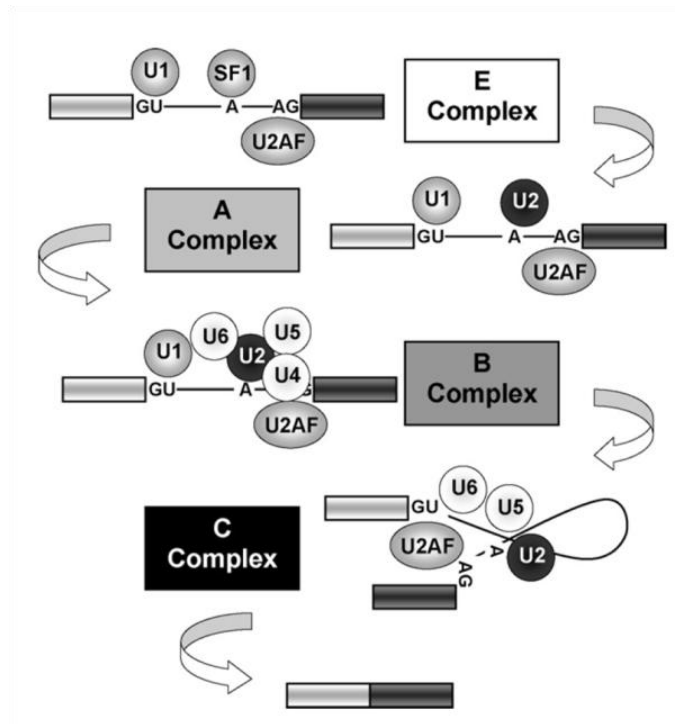
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών hnRNP επηρεάζουν τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό, και κατά συνέπεια διαφοροποιούν και το λειτουργικό τους ρόλο [206]. Για παράδειγμα η πυρηνική εντόπιση της hnRNP I συνδέεται με τη συμμετοχή της στο εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA, ενώ η κυτταροπλασματική εντόπιση της ίδιας πρωτεΐνης, λόγω φωσφορυλίωσής της από την πρωτεϊνική κινάση A [207, 208], συνδέεται με τη συμμετοχή της στη μετάφραση. Η hnRNP A2/B1 μετακινείται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ανάλογα με το στάδιο μεθυλίωσης των κατάλοιπων αργινίνης στην RGG περιοχή της. Η ασύμμετρη διμεθυλίωση των αζώτων της αργινίνης, η οποία καταλύεται από την πρωτεΐνη μεθυλτρασνφεράση 1 της αργινίνης, έχει ως αποτέλεσμα τον πυρηνικό εντοπισμό της A2/B1 ενώ η μη μεθυλιωμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα [122]. Οι

πρωτεΐνες hnRNP C εμφανίζουν νέες φωσφορυλιωμένες μορφές κατά τη διάρκεια της μίτωσης, οπότε και διαχέονται σε όλο το κύτταρο [75]. Είναι πιθανό και η φωσφορυλίωση της hnRNP A1 να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον υποκυτταρικό της εντοπισμό [209, 210] και στην αλληλεπίδραση της με το μεταφερόμενο mRNA [211], ενώ η φωσφορυλίωση της hnRNP K, σαν απόκριση σε οξειδωτικό στρες, οδηγεί σε διαφοροποίηση των αλληλεπιδράσεών της τόσο με το mRNA, όσο και με άλλες πρωτεΐνες [212].

Εμπλοκή στη μετάφραση έχει αναφερθεί για τις πρωτεΐνες hnRNP C, K, E1, E2, A1 και A2. Οι hnRNP C, K, E1 και E2 ενισχύουν τη μετάφραση του mRNA του *c-myc* προσδένοντας στο σημείο του μηχανισμού εσωτερικής πρόσδεσης του ριβοσώματος (internal ribosomal entry site, IRES) [213, 214], ενώ οι hnRNP K και E1 βρέθηκε ότι ρυθμίζουν επίσης τη μετάφραση του mRNA της 15-λιποξυγενάσης (LOX) [215], οδηγώντας σε σίγηση όταν προσδένουν στο στοιχείο ελέγχου διαφοροποίησης (differentiation control element, DICE) το οποίο εντοπίζεται στη 3' μη μεταφράσιμη περιοχή (UTR) του mRNA. Η σύνδεση της hnRNP E1 στο mRNA του υποδοχέα του φολλικού οξέος, της ρεννίνης και του κολλαγόνου I έχει το αντίθετο αποτέλεσμα, οδηγώντας σε σταθεροποίηση και/ή ενίσχυση της μετάφρασης του προσδεμένου mRNA [216-218]. Η hnRNP A1 ελέγχει τη μετάφραση τεσσάρων από τις πέντε ισομορφές του αυξητικού παράγοντα -2 ινοβλαστών (FGF-2), οι οποίες προκύπτουν από πέντε διαφορετικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, μέσω διασύνδεσής της με το IRES. Έτσι η επίδραση της A1 οδηγεί σε αύξηση της μετάφρασης αυτών των ισομορφών, ενώ αντίθετα η έλλειψη της πρωτεΐνης οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης [219]. Τέλος, η hnRNP A2/B1 αυξάνει την εξαρτώμενη από καλύπτρα (cap-dependent) μετάφραση του mRNA της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης, προσδενόμενη στο *cis* σήμα διακίνησης A2RE [220]. Η πρόσδεση όμως της hnRNP E1 στην hnRNP A2 οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης των mRNAs που φέρουν A2RE [221].

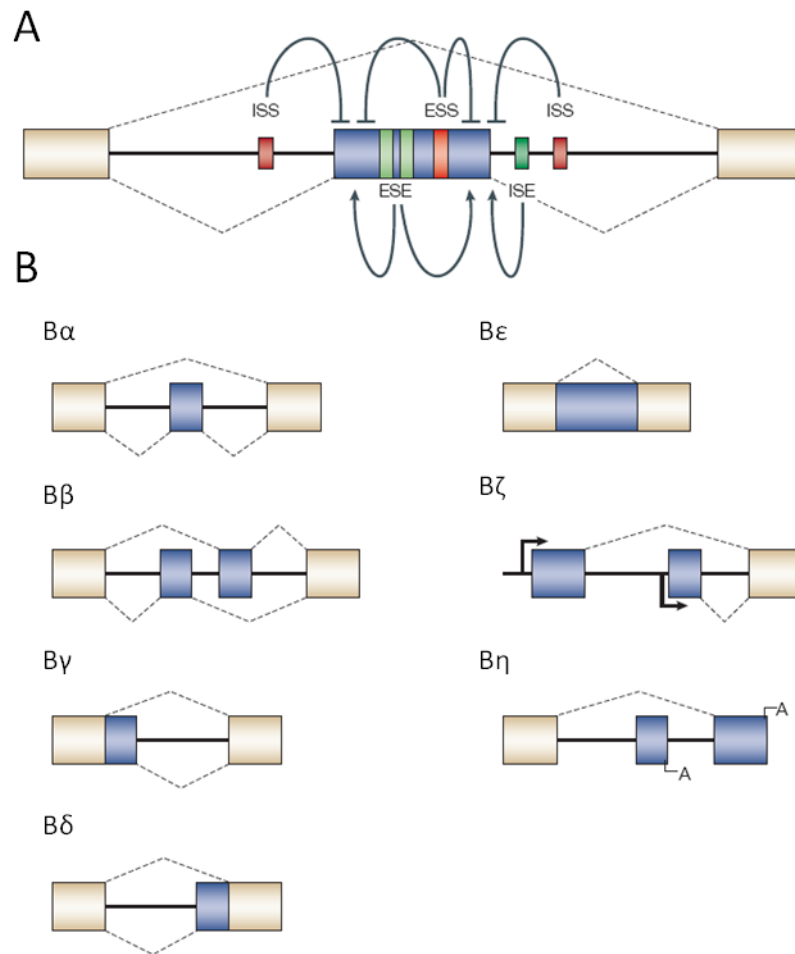
Η διαδικασία του ματίσματος (splicing) αποτελεί κύρια μετα-μεταγραφική επεξεργασία η οποία συντελείται στα ανώτερα ευκαρυωτικά. Περιλαμβάνει μια σειρά ενδονουκλεολυτικών τομών (cleavages) και επανασυνδέσεων (ligations) με τελικό στόχο την απομάκρυνση των εσωνίων και την παραγωγή του ώριμου mRNA. Η αντίδραση του ματίσματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια *cis*-στοιχείων της πρωτοταγούς δομής του pre-mRNA που ονομάζονται 5' σημείο κοπής (5' splice site), 3' σημείο κοπής (3' splice site) και το σημείο διακλάδωσης (branch site). Το μάτισμα

του RNA λαμβάνει χώρα σε 2 διαδοχικές αντιδράσεις τρανσεστεροποίησης. Η πρώτη μεταφέρει ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό από το 5' σημείο κοπής στο σημείο διακλάδωσης και η δεύτερη διαχωρίζει την ένωση εσώνιων/εξονίων στο 3' και επανασυνδέει τα σημεία 3' και 5' μαζί [69]. Η αντίδραση αυτή ρυθμίζεται από ένα μεγάλο ενεργό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται ματισματοσώμα (spliceosome), μια από τις πιο πολύπλοκες μακρομοριακές μηχανές στο κύτταρο [222]. Όταν σχηματιστεί πλήρως, αυτό το σωματίδιο έχει περίπου διάμετρο 20 nm και συντελεστή καθίζησης 50-60 S, και περιλαμβάνει εκτός του pre-mRNA πλήθος trans-παραγόντων όπως είναι τα σύμπλοκα snRNP και άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες και μόρια snRNA, τα οποία αναγνωρίζουν τα σημεία ματίσματος και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το pre-mRNA. Η συγκρότηση του ματισματοσώματος πραγματοποιείται διαδοχικά με τη δυναμική αλληλεπίδραση των παραγόντων, οι φάσεις της οποίας αναφέρονται σαν σύμπλοκο E, προ-ματισματοσώμα A, σύμπλοκο ματίσματος B, σύμπλοκο ματίσματος C και σύμπλοκο μετά το μάτισμα (post-splicing) [223] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Τα κύρια στάδια της αντίδρασης ματίσματος του πυρηνικού mRNA, με τη διαδοχική συγκρότηση του ματισματοσώματος στις διάφορες φάσεις. Τα εξόνια παρουσιάζονται ως παραλληλόγραμμα και τα εσόνια ως γραμμές.

Η έλλειψη μιας ισχυρής ειδικότητας στην αλληλουχία, η οποία απαιτείται για το σχηματισμό του ματισματοσώματος στα μετάζωα, επιτρέπει την ύπαρξη περισσότερων από ένα πιθανών 5' ή 3' σημείων τομής στη γεινιάζουσα περιοχή κάθε σύνδεσης μεταξύ εσωνίων/εξονίων. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ένα εναλλακτικό μάτισμα, με τον επιλεκτικό συνυπολογισμό ή την απόρριψη εξονίων κατά την αντίδραση ματίσματος, η οποία πλέον μπορεί να παράγει πολλαπλά διαφορετικά αντίγραφα mRNA από ένα μόνο γονίδιο (Εικόνα 9). Η διαδικασία αυτή έχει τύχει ιδιαίτερης προσοχής μετά την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, ως τρόπος αύξησης της πρωτεομικής ποικιλότητας [224]. Το εναλλακτικό μάτισμα είναι ένας κυρίαρχος τρόπος για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων κατά τη διάρκεια πολυάριθμων βιολογικών διαδικασιών, όπως η εξέλιξη, η απόπτωση αλλά και η ασθένεια. Μεταβολές στην ποσότητα ή δραστηριότητα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την επιλογή του σημείου εναλλακτικού ματίσματος είναι ένας από τους τρόπους επιγενετικής μεταβολής της πρωτεϊνικής έκφρασης κατά τη διάρκεια της κυτταρικής μεταμόρφωσης [225]. Ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός [226]. Γενικά, η επιλογή του σημείου ματίσματος καθορίζεται από την πρόσδεση παραγόντων ματίσματος στο pre-mRNA ανάλογα με την αλληλουχία, με αποτέλεσμα την προαγωγή ή την αποτροπή του σχηματισμού του ματισματοσώματος σε ένα πιθανό σημείο. Αυτοί οι παράγοντες προσδένονται σε αλληλουχίες μέσα στο RNA οι οποίες ονομάζονται ενισχυτές ματίσματος εξονίου (ESE), αποσιωπητές ματίσματος εξονίου (ESS), ενισχυτές ματίσματος εσωνίου (ISE) και αποσιωπητές ματίσματος εσωνίου (ISS), ανάλογα με την τοποθέτησή τους και την επίδραση στο πλησιέστερο σημείο ματίσματος [227]. Το τελικό σημείο ματίσματος εξαρτάται από την ισχύ της αλληλουχίας στο συγκεκριμένο σημείο, την παρουσία παρακείμενων αλληλουχιών ενίσχυσης ή αναστολής μέσα στο pre-mRNA και τη δραστηριότητα των συγγενών τους παραγόντων ματίσματος, καθώς και από το λόγο των ανασταλτικών έναντι των ενισχυτικών παραγόντων ματίσματος που υπάρχουν στον πυρήνα [228].



Εικόνα 9 Βασικοί τύποι εναλλακτικού ματίσματος και ρυθμιστικά στοιχεία A: Ένας αριθμός βοηθητικών στοιχείων μπορεί να επηρεάσει το εναλλακτικό μάτισμα. Αυτά κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη θέση και τη δραστηριότητά τους ως ενισχυτές ματίσματος εξονίου (ESE) και αποσιωπητές ματίσματος εξονίου (ESS) όπως και ενισχυτές ματίσματος εσωνίου (ISE) και αποσιωπητές ματίσματος εσωνίου. B: Βασικοί τύποι εναλλακτικού ματίσματος Bα: Παράλειψη εξονίου Bβ: Αμοιβαία αποκλειόμενα εξόνια Bγ,δ: Επιλογή 5' και 3' σημείου κοπής Bε: Διατηρούμενο εσώνιο Bζ: Εναλλακτικοί υποκινητές Bη: Εναλλακτικά σημεία πολυαδενυλίωσης (από Matlin et al., 2005)

Ορισμένες από τις πρωτεΐνες hnRNP συμμετέχουν και στο ιδιοσυστατικό και στο εναλλακτικό μάτισμα. Η αρχική ένδειξη που υποδείκνυε ένα ρόλο των πρωτεϊνών hnRNP στην αντίδραση του ματίσματος ήταν η ανακάλυψη ότι αυτές οι πρωτεΐνες συχνά προσδένονται στην ένωση εσωνίων/εξονίων [229] και ότι η αφαίρεση της hnRNP C από πυρηνικά εκχυλίσματα δρούσε ανασταλτικά σε *in vitro* αντιδράσεις ματίσματος [230]. Η ταυτοποίηση της hnRNP A1, ως της υπεύθυνης πρωτεΐνης για μια σαφή δραστηριότητα ματίσματος, με την ονομασία SF5, έδωσε την πρώτη καθοριστική απόδειξη ότι οι πρωτεΐνες hnRNP ρυθμίζουν το εναλλακτικό μάτισμα

[231]. Ο ρόλος των πρωτεϊνών hnRNP τόσο στο ιδιοσυστατικό όσο και στο εναλλακτικό μάτισμα έχει μελετηθεί εκτενώς [232], με τις πρωτεΐνες της υποομάδας των A/B, και κυρίως την A1, να κυριαρχούν στις μελέτες αυτές [137]. Η hnRNP A1 ρυθμίζει το μάτισμα του pre-mRNA συνδεδεμένη με αποσιωπητές (ESS και ISS), αναστέλλοντας τη χρήση του 3' σημείου τομής ή προάγοντας τη χρήση του πιο απομακρυσμένου 5' σημείου τομής, στην περίπτωση παρουσίας δύο 5' σημείων ματίσματος ίδιας ισχύος. Όταν σε ένα pre-mRNA περιέχεται ένα 5' σημείο ματίσματος η hnRNP A1 βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ματίσματος, ενώ παρουσία δύο 5' σημείων ματίσματος ίδιας ισχύος προάγει την παράλειψη εξονίου, μέσω της προώθησης της χρήσης του πιο απομακρυσμένου 5' σημείου.

Αυτή η δραστηριότητα είναι αντίθετη με τη δραστηριότητα του παράγοντα ASF/SF2, ο οποίος προωθεί τη χρήση του εγγύτερου 5' σημείου. Ο παράγοντας ASF/SF2 (Alternative Splicing Factor/ Splicing Factor 2) αποτελεί ένα σημαντικό μέλος της ομάδας των φωσφοπρωτεϊνών SR, οι οποίες φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια περιοχή πλούσια σε αργινίνη (R) και σερίνη (S). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές στο μέγεθος που οφείλονται στο διαφορετικό μήκος της περιοχής SR [233], αλλά παρουσιάζουν κοινή δομική οργάνωση. Ο ASF/SF2 ταυτοποιήθηκε σαν παράγοντας τόσο του ιδιοσυστατικού ματίσματος όσο και του εναλλακτικού, επηρεάζοντας την επιλογή μεταξύ διαφορετικών 5' σημείων τομής του ίδιου pre-mRNA [234-236], με την αναγνώριση αλληλουχιών ESE [237]. Επομένως, η επιλογή του σημείου ματίσματος εξαρτάται από το λόγο hnRNP A1 προς ASF/SF2, όπου η A1 προάγει την παράλειψη και ο ASF την ενσωμάτωση των εξονίων [231, 237-240]. Οι δύο περιοχές RRM, και ιδίως το κατάλοιπο Phe στην αλληλουχία RNP1, είναι απαραίτητες για την ειδική πρόσδεση της hnRNP A1 στο pre-mRNA [124], αν και σε μερικά μετάγραφα η βοηθητική περιοχή από μόνη της, είναι υπεύθυνη για την καταστολή του εναλλακτικού ματίσματος που οφείλεται στις πρωτεΐνες τύπου A/B [241]. Και η hnRNP A2/B1 συμπεριφέρεται με ανάλογο τρόπο στην επιλογή του σημείου ματίσματος [124, 242], ενώ είναι δύο φορές δραστηκότερη από την hnRNP A1 στην επιλογή του 5' σημείου ματίσματος [124]. Για παράδειγμα, πυρηνικά εκχυλίσματα από ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά του ποντικού, από τα οποία λείπει η πρωτεΐνη hnRNP A1, συνεχίζουν να παρουσιάζουν δραστηριότητα αναφορικά με την επιλογή του πιο απομακρυσμένου 5' σημείου ματίσματος εκτός και

αν εκλείψει και η πρωτεΐνη hnRNP A2/B1. Η προσθήκη ανασυνδυασμένων hnRNP A1 ή A2 στο εκχύλισμα αποκαθιστά την ικανότητα επιλογής [242].

Η διασύνδεση των πρωτεϊνών hnRNP A/B στα στοιχεία ESS εμποδίζει την αναγνώριση των εγγύτερων εξονίων [243], ενώ αρκετά στοιχεία ESS που αναγνωρίζονται από hnRNP έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα μετάγραφα, τόσο για την A1 [241, 244-246] όσο και την A2/B1 [244, 245, 247]. Μερικά εξόνια τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα έχουν στοιχεία ESS τα οποία αλληλοκαλύπτονται με στοιχεία ESE στα οποία προσδέσνουν ειδικά πρωτεΐνες SR [248, 249], γεγονός στο οποίο οφείλεται ο ανταγωνισμός μεταξύ hnRNP A/B και SR. Όταν ένα στοιχείο ESS υπερκαλύπτει ένα στοιχείο ESE, η διασύνδεση ενός και μόνο μορίου hnRNP A1 μπορεί να είναι αρκετή για να εκμηδενίσει τη διασύνδεση του ESE με τις πρωτεΐνες SR. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, οι πρωτεΐνες hnRNP A/B μπορούν να προσδέσουν συνεργατικά στο εξόνιο, ευνοώντας την καταστολή του ματίσματός του [231, 232]. Η επίδραση της hnRNP A1 στο 5' σημείο τομής μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη διασύνδεση του U1 snRNP, που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του ματισματοσώματος, ενώ αντίθετα η ASF/SF2 προάγει τη διασύνδεση του U1 snRNP σε όλα τα 5' σημεία τομής [250]. Ειδικά σημεία διασύνδεσης για τις hnRNP A/B παρατηρούνται και στα εσόνια. Η διασύνδεση της A1 σε ένα στοιχείο ISS κοντά στο σημείο διακλάδωσης του τρίτου εξονίου του μετάγραφου του γονιδίου tat του HIV-1, εμποδίζει τη διασύνδεση του U2 snRNP με αποτέλεσμα την μη αποτελεσματική κοπή στο 3' σημείο κοπής [251].

Οι ίδιες οι πρωτεΐνες hnRNP είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος των pre-mRNA τους. Η hnRNP A1 φέρει πολλαπλά στοιχεία ISS εκατέρωθεν του εξονίου 7b, στοιχεία τα οποία αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες hnRNP A/B και F/H με αποτέλεσμα την αποκοπή αυτού του εξονίου [242, 252-255]. Το εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA της hnRNP I, που ρυθμίζεται από την ίδια την παρουσία της πρωτεΐνης, οδηγεί στην επικράτηση φυσιολογικών επιπέδων της πρωτεΐνης στο κύτταρο μέσω ενός αρνητικού βρόγχου ανάδρασης [256]. Η πρωτεΐνη hnRNP I αποτελεί μια ακόμη πρωτεΐνη της οικογένειας των hnRNP η οποία εμπλέκεται στο μάτισμα του pre-mRNA. Η διασύνδεσή της με την πολυπυριμιδική περιοχή των εσωνίων [257] έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του εξονίου 7 στο μετάγραφο της τροπομοσίνης β [258]. Η αφαίρεση της hnRNP I in vitro, αυξάνει την ενσωμάτωση εξονίων, ενώ η επαναπροσθήκη της πρωτεΐνης αποκαθιστά τα υψηλά επίπεδα απαλοιφής τους [259, 260].

Διαφορετικές πρωτεΐνες hnRNP μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικούς ρόλους στο μάτισμα του ίδιου pre-mRNA. Για παράδειγμα η hnRNP A1 αποτελεί έναν αρνητικό παράγοντα του ματίσματος του εξωνίου N1 του c-Src [238], ενώ αντίθετα οι πρωτεΐνες hnRNP F [261] και hnRNP H [262] είναι απαραίτητες για το βέλτιστο μάτισμα αυτού του μετάγραφου.

Η συμμετοχή των hnRNP A/B στο εναλλακτικό μάτισμα επιτυγχάνεται πιθανόν και με άλλους μηχανισμούς. Μελέτες έδειξαν ότι η hnRNP A1 συνδέεται με τα 3' σημεία τομής με την παρουσία των U1 και U2 snRNP, ενώ αλληλεπιδρά με τα U2 και U4 snRNP [263-266].

Τέλος, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υποκυτταρική εντόπιση των hnRNP, η οποία σχετίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μπορεί να επηρεάσει το μάτισμα των μετάγραφων στο οποίο αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται. Η κυτταροπλασματική συσσώρευση της hnRNP A1, η οποία παρατηρήθηκε έπειτα από την επίδραση στρες σε κυτταρικές σειρές, οδήγησε σε αλλαγές του προτύπου εναλλακτικού ματίσματος του pre-mRNA του αδενοϊού E1A. Η κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης συνοδεύεται από ταυτόχρονη αύξηση της φωσφορυλίωσής της, ενώ στο μηχανισμό συσσώρευσης της στο κυτταρόπλασμα εμπλέκεται το μονοπάτι MKK_{3/6}-p38 [267].

A2.5 Οι πρωτεΐνες hnRNP σε παθολογικές καταστάσεις

Λόγο του πολλαπλού βιολογικού ρόλου που διαδραματίζουν και της εμπλοκής τους σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, οι πρωτεΐνες hnRNP θεωρούνται σημαντικοί γονιδιακοί ρυθμιστές. Αντικείμενο ιδιαίτερης μελέτης είναι η εμπλοκή τους σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αυτοανοσία και ο καρκίνος.

A2.5.1 Αυτοανοσία

Οι αυτοάνοσες παθήσεις, για παράδειγμα οι ρευματικές παθήσεις, χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων ειδικών για κάθε κατηγορία νόσου. Τα αυτοαντισώματα είναι αντισώματα τα οποία στρέφονται κατά συστατικών των ίδιων των κυττάρων με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων που κυμαίνονται από ήπια έως πολύ σοβαρά. Η εντόπιση των αυτοαντισωμάτων και της

ειδικότητάς τους, και η συσχέτισή τους με τα στάδια εξέλιξης μιας νόσου, βοηθούν στην διάγνωση μιας αυτοάνοσης παθολογικής κατάστασης και πιθανόν στην αντιμετώπισή της.

Μια κατηγορία αυτοαντισωμάτων στρέφεται κατά συστατικών των ριβονουκλεϊκών συμπλόκων (RNP), πρωτεϊνών και RNA, όπως είναι τα αντι-Sm, αντι-U1(RNP), αντι-Ro, αντι-La, αντι-Jo και αντι-ριβοσωμικά αντισώματα [268]. Μέσω της παρουσίας αυτών των αντισωμάτων έγινε ο χαρακτηρισμός των αυτοαντιγόνων-στόχων, ενώ πολλά από αυτά καθιερώθηκαν ως βιολογικοί δείκτες για την ύπαρξη συγκεκριμένων παθήσεων, όπως τα αντισώματα αντι-Sm για το συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) και τα αντισώματα αντι-La για το σύνδρομο Sjogren.

Οι πρωτεΐνες hnRNP αποτελούν στόχους αυτοαντισωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή των πρωτεϊνών αυτών σε αυτοάνοσα νοσήματα [269]. Μια από τις πρώτες μελέτες έδειξε την παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών hnRNP A/B, συγκεκριμένα των A2/B1 και B2, σε ορό από ασθενή με SLE και χαρακτηριστικά που συνδέονται με το σύνδρομο Sjogren [270]. Η ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών αργότερα ταυτίστηκε με τα αυτοαντισώματα RA33 [271-273]. Τα αυτοαντισώματα RA33 εντοπίστηκαν κυρίως σε ασθενείς με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (MCTD), ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE), ενώ σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) εντοπίστηκαν αυτοαντισώματα κατά της πρωτεΐνης hnRNP I [274-276]. Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα οι πρωτεΐνες hnRNP αντιπροσωπεύουν πιθανότατα τα πιο ειδικά πυρηνικά αυτοαντιγόνα, με αποτέλεσμα τα RA33 αυτοαντισώματα να προτείνονται ως διαγνωστικά εργαλεία για τη διάγνωση και πρόγνωση της ασθένειας.

Επίσης, σε ορούς ασθενών που εμφανίζουν αυτοαντισώματα RA33 έχουν βρεθεί αντισώματα έναντι της hnRNP A1 και hnRNP A3, σε συνδυασμό και με αντισώματα έναντι μιας πρωτεΐνης hnRNP που δεν ανήκει στην ομάδα των A/B, της hnRNP L [277]. Τέλος, έχουν εντοπισθεί και αυτοαντισώματα με ειδικότητα κατά των κεντρικών πρωτεϊνών hnRNP C1 και C2 [278, 279].

A2.5.2 Καρκίνος

Η εμπλοκή των πρωτεϊνών hnRNP στον καρκίνο έχει μελετηθεί αρκετά. Λόγω του πολυλειτουργικού βιολογικού τους ρόλου, οι hnRNP εμπλέκονται σε πολλά στάδια της καρκινικής εξαλλαγής, λειτουργώντας ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, ρυθμίζοντας πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και στον καρκίνο, ρυθμίζοντας διαφορετικά καρκινικά στάδια όπως είναι η αναστολή της απόπτωσης, η αγγειογένεση και η μετάσταση [136]. Σημαντικό παράγοντα της εμπλοκής των hnRNP στον καρκίνο αποτελεί η απορρύθμιση της αυστηρά ρυθμισμένης έκφρασης τους που παρατηρείται στα φυσιολογικά κύτταρα, και που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το στάδιο ανάπτυξης και διαφοροποίησης των ιστών [131, 280].

Δράση μιας πρωτεΐνης hnRNP ως ογκογονίδιο έχει υποστηριχθεί για την hnRNP P2 που συνιστά προϊόν του ογκογονιδίου TLS/FUS [281]. Με χρωμοσωμική μετάθεση, προκύπτει σύντηξη του αμινοτελικού άκρου της P2 με το τμήμα με ικανότητα πρόσδεσης DNA των παραγόντων μεταγραφής CHOP [282] και ERG [283]. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν είναι χαρακτηριστικές για συγκεκριμένους τύπους καρκίνων, με το προϊόν FUS/CHOP να εμφανίζεται στο μιξοειδές λιποσάρκωμα [284] και το προϊόν FUS/ERG στη μυελοειδή λευχαιμία. Επίσης η υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP D σε ζωικά μοντέλα, είχε ως άμεση συνέπεια την αύξηση των επιπέδων των mRNA στόχων της όπως τα c-myc, c-fos και c-jun, και οδήγησε σε ανάπτυξη όγκων [285].

Οι πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η έκφραση τους ρυθμίζεται ανάλογα με τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Η παρατήρηση ότι η σίγαση της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών με siRNA είχε σαν συνέπεια τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αποτελεί μια ένδειξη για τον χαρακτηρισμό των A1 και A2/B1 ως ογκογονιδίων, μολονότι δεν είναι γνωστό αν η διαφοροποίηση στην έκφραση των πρωτεϊνών είναι αιτία ή αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού [286, 287]. Η μοναδική πρωτεΐνη hnRNP με ογκοκατασταλτική δράση μέχρι στιγμής είναι η E4 (PCBP4) [288].

Ένας ακόμη τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες hnRNP εμπλέκονται στην καρκινική εξαλλαγή είναι με τη ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών με γνωστό ρόλο στην καρκινογένεση (Εικόνα 10). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη hnRNP K οδηγεί σε

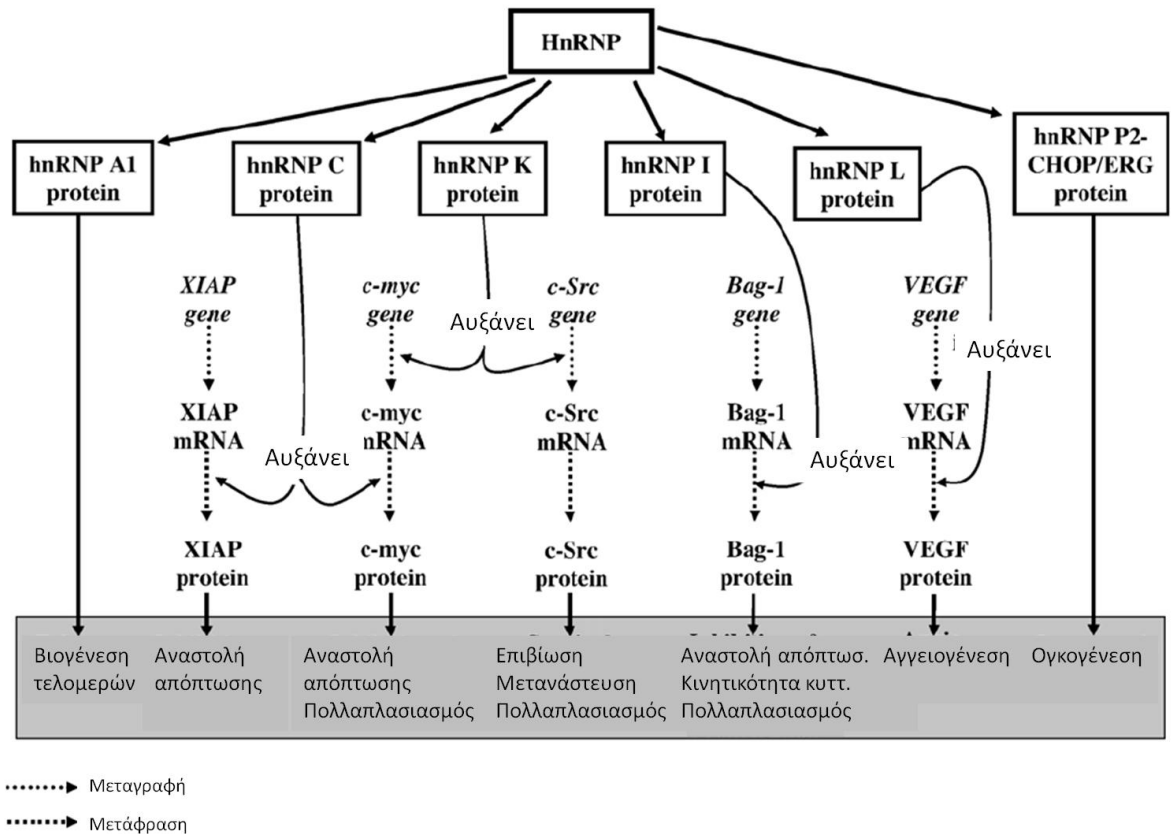
αύξηση της μεταγραφής των c-myc και c-Src και η hnRNP C της μετάφρασης του mRNA του c-myc [166, 213].

Η αναστολή της απόπτωσης λόγω της αύξησης στην έκφραση του παράγοντα XIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis), μέσω αύξησης της μετάφρασής του, συνδέεται με την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης hnRNP C1/C2 [289]. Αντίθετα, άλλες πρωτεΐνες hnRNP προάγουν αντί να αναστέλλουν την απόπτωση όπως ισχύει για τις hnRNP H και F [290]. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 μέσω siRNA σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού, οδήγησε τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση [165, 291], συνδέοντας την καρκινική υπόσταση των κυττάρων με την υποχρεωτική έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνη hnRNP L συνδέεται με τη ρύθμιση παραγόντων αγγειογένεσης, συγκεκριμένα του VEGF. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διασύνδεσης της πρωτεΐνης με το mRNA του VEGF σε συνθήκες υποξίας, με την έλλειψη της hnRNP L να οδηγεί σε μείωση της ημισείας ζωής του mRNA στόχου [187]. Επίσης η hnRNP A1 συνδέεται με την αγγειογένεση ενισχύοντας τη μετάφραση του παράγοντα αγγειογένεσης FGF 2 [219].

Μια σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP και της μετάστασης προέρχεται από την παρατήρηση της παρουσίας πρωτεϊνών hnRNP, των P2, K και E1, στα κέντρα έναρξης της εξάπλωσης των κυττάρων (spreading initiation centers) [292].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς καρκινικούς τύπους για αρκετές από τις πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας [136]. Οι πιο πολλές μελέτες όμως αφορούν στην αλλαγή των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 στον καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 10 Σημαντικά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, στα οποία πιθανόν εμπλέκονται πρωτεΐνες hnRNP. Στο σχεδιάγραμμα, το οποίο δείχνει τα διαφορετικά στάδια της έκφρασης των γονιδίων (μεταγραφή και μετάφραση), παρουσιάζονται γονίδια που έχει δειχθεί ότι ρυθμίζονται από πρωτεΐνες hnRNP. Στο γκρίζο κουτί αναγράφονται τα στάδια της καρκινογένεσης τα οποία επηρεάζονται από τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (από Carpenter et al., 2006).

A2.5.3 Η hnRNP A2/B1 ως ένας κλινικά χρήσιμος βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα

Έχοντας ως αντικειμενικό στόχο την ανάπτυξη μοριακών εργαλείων για την ακριβή αναγνώριση και κατηγοριοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα, οι Mulshine και συνεργάτες παρήγαγαν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο φάνηκε να συνδέεται ειδικά με ένα αντιγόνο σε πολλές κυτταρικές σειρές μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα αλλά όχι μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [293]. Το αντίσωμα (703D4) δοκιμάστηκε ανοσοϊστοχημικά και σε ιστούς μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και γειτονικό ιστό, φυσιολογικό ή με αρχικές αλλοιώσεις, προκειμένου να μελετηθεί η κατανομή του αντιγόνου στο επιθήλιο του πνεύμονα. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία του αντιγόνου μπορεί να σχετίζεται με πολύ πρώιμες αλλοιώσεις [294]. Το αντιγόνο του αντισώματος 703D4 τελικά αναγνωρίστηκε ως η πρωτεΐνη hnRNP A2/B1 [295]. Ακολούθησαν 3 ανεξάρτητες μελέτες ανίχνευσης της hnRNP A2/B1, μέσω του αντισώματος 703HD4, σε κύτταρα σιέλου απόμων ομάδας υψηλού κινδύνου για πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, οι οποίες υπέδειξαν τη δυνητική χρησιμότητα της πρωτεΐνης ως πρώιμου δείκτη στον καρκίνο του πνεύμονα. Η πρώτη σχετική μελέτη έδειξε θετική χρώση για hnRNP A2/B1 σε αποθηκευμένα δείγματα σιέλου και προέβλεπε την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα με ακρίβεια 88% 2 έτη πριν την κλινική παρουσία του [296]. Τα ενθαρρυντικά αυτά προκαταρκτικά αποτελέσματα οδήγησαν σε δύο ανεξάρτητες δοκιμές αναφορικά με την πρόβλεψη ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα μέσω εξέτασης κυττάρων σιέλου που συλλέχθηκαν από άτομα υψηλού κινδύνου, στις οποίες αξιολογήθηκε η πρόβλεψη ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα μέσω της υπέρ-έκφρασης της hnRNP A2/B1 σε σύγκριση με τη κυτταρομορφολογική εξέταση. Για τη μία έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από κινέζους εργάτες σε ορυχεία κασσίτερου, οι οποίοι εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα ραδονίου, αρσενικού και καπνού από τσιγάρο, για την πρόβλεψη ανάπτυξης πρωτογενούς καρκίνου. Στη δεύτερη έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς άνευ καρκίνου από 11 κέντρα (the Lung Cancer Early Detection Working Group, LCEDWG), οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση όγκων στους πνεύμονες, και εξετάστηκαν για πρόβλεψη επανεμφάνισης καρκίνου σε νέα εστία (δευτερος πρωτογενής καρκίνος). Περισσότεροι από 7.000 ασθενείς συμμετείχαν συνολικά και στις δύο έρευνες. Τα θετικά δεδομένα υποβλήθηκαν στην αναφορά προόδου του πρώτου χρόνου πριν από την ολοκλήρωση και των δύο ερευνών [66]. Οι συγγραφείς ανέφεραν 77% ευαισθησία και 82% ειδικότητα στον εντοπισμό καρκίνου του πνεύμονα 1-2 χρόνια πριν την κλινική παρουσία στην έρευνα του LCEDWG και 82 και 65% αντίστοιχα στους εργάτες ορυχείων. Οι παρατηρήσεις αυτές ήταν πολύ ενθαρρυντικές συγκρινόμενες με την κυτταρομορφολογική ανάλυση των κυττάρων του σιέλου, αφού τα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονταν μόνο στο 8-22% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο τονίστηκε από τους συγγραφείς ότι η έρευνα είναι προκαταρκτική και ότι είναι πιθανόν ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου που σχετίζεται με τους ασθενείς και των δύο ερευνών, να αυξήσει παράλληλα την δυνατότητα πρόβλεψης μέσω της υπέρ-έκφρασης της hnRNP A2/B1 πάνω από τα αναμενόμενα επίπεδα στο γενικό πληθυσμό. Συζητήθηκε επίσης η πιθανότητα να

χρησιμοποιηθεί η παρατηρούμενη υπερέκφραση της hnRNP A2/B1 ως ένα πρωταρχικό τεστ σε μια διαδικασία σάρωσης ή στην παρακολούθηση ομάδων υψηλού κινδύνου [66].

Σε μεταγενέστερες μελέτες διερευνήθηκε η χρησιμότητα της hnRNP A2/B1 ως βιοδείκτη, μελετώντας την αλλαγή των επιπέδων της έκφρασης της στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα των ανθρώπων. Σε μια από τις μελέτες φάνηκε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 σε κύτταρα που περιέχονται στο βρογχοκυψελιδικό υγρό από έκπλυση (BAL), το οποίο λαμβάνεται από ασθενείς με ενδείξεις για καρκίνο του πνεύμονα, σε αναντιστοιχία με τα κυτταρομορφολογικά ευρήματα. Μόνο 23 από τους 103 ασθενείς παρουσίασαν κακοήθη κύτταρα στη μορφολογική εξέταση, οι 22 από τους οποίους βρέθηκαν θετικοί για παρουσία hnRNP A2/B1, ενώ 41 ακόμα ασθενείς -που βρέθηκαν θετικοί στην παρουσία hnRNP A2/B1- ήταν αρνητικοί για παρουσία καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με τη μορφολογία τους. Από τους 41 αυτούς ασθενείς, οι 29 είχαν νεοπλασία σύμφωνα με ραδιολογικά και βρογχοσκοπικά ευρήματα, 4 ακόμα παρουσίασαν νεοπλασία μέσα σε 8 μήνες από την εξέταση, 2 ασθενείς είχαν παρουσιάσει παλαιότερα καρκίνο του πνεύμονα και τέλος 2 ασθενείς παρουσίαζαν καρκίνωμα σε άλλο όργανο. Μόνο 4 από τους εξεταζόμενους με θετική έκφραση hnRNP A2/B1 δεν παρουσίασαν καρκίνο στο επόμενο διάστημα. Τα αποτελέσματα για την έλλειψη έκφρασης hnRNP A2/B1 ήταν παρόμοια σε επιτυχία, με ένα σκορ 96% σε ευαισθησία και 82% σε ειδικότητα [297].

Μια άλλη ερευνητική ομάδα υπέδειξε την ισομορφή B1 της hnRNP A2/B1 ως πιθανό καλύτερο βιοδείκτη από την hnRNP A2/B1, και μελέτησε την πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των επιδράσεων των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε προκλινικά μοντέλα καθώς και σε μοντέλα ιστοκαλλιέργειας του καρκίνου του πνεύμονα [298-300]. Παράλληλα, μελετήθηκε η έκφρασή της σε αρχειακό υλικό ιστών [301] αλλά και σε πλάσμα αίματος σε επίπεδο έκφρασης του γονιδίου [302, 303]. Η μελέτη μέσω ανοσοϊστοχημείας, σε ασθενείς με κακοήθη μεσοθηλίωμα, έδειξε μια μέτρια έκφραση της B1 στους καρκινικούς ιστούς με πιθανότητα όμως για δυνητική χρήση ως προγνωστικού δείκτη επιβίωσης [304]. Στο ίδιο συμπέρασμα, για τη δυνατότητα της B1 να χρησιμοποιηθεί ως δυνητικά καλός προγνωστικός δείκτης, είχε καταλήξει μια προγενέστερη εργασία [305]. Τα παραπάνω παραμένουν ωστόσο σε στάδιο προκαταρκτικής έρευνας.

Η μελέτη για τη χρησιμότητα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 ως πρώιμου βιοδείκτη συνεχίσθηκε και σε άλλο βιοπτικό υλικό πνεύμονα [306] ενώ επίσης εξετάστηκε τόσο η σχέση της και με άλλους δείκτες σε επίπεδο έκφρασης γονιδίου [307], όσο και η προγνωστική και διαγνωστική αξία της σχετικά με τον καρκίνο του πνεύμονα [308]. Υπερέκφραση της A2/B1 έχει παρατηρηθεί επίσης σε καρκίνο του παγκρέατος και του μαστού, σε λεμφοπολλαπλασιαστικές δυσλειτουργίες και σε πολλές καρκινικές σειρές διαφόρων ιστολογικών προελεύσεων [291, 295, 309-311]. Μελέτες για την έκφραση της hnRNP A2/B1 έχουν γίνει και σε μοντέλα ποντικών [312].

Παρότι όμως η έκφρασή της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 εμφανίζεται συνήθως αυξημένη σε δείγματα που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, δεν περιορίζεται μόνο σε όγκους. Ο εντοπισμός της hnRNP A2/B1 με ανοσοϊστοχημεία στο 50% των δειγμάτων από βρογχικό επιθήλιο χρόνιων καπνιστών, ποσοστό που ξεπερνά τη συχνότητα εμφάνισης όγκων στους πνεύμονες στη συγκεκριμένη ομάδα ατόμων, έδειξε ότι η θετική χρώση σε ανοσοϊστοχημεία φαίνεται να μην χαρακτηρίζει αποκλειστικά τα κακοήθη κύτταρα [313]. Επίσης έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε και σε φυσιολογικά κυψελιδικά κύτταρα αν και με περιορισμένη ένταση έναντι των καρκινικών κυττάρων [314], ενώ σε περιπτώσεις υποξίας στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται μείωση της έκφρασης της [315]. Αναλύσεις σε εμβρυονικό ιστό ποντικών, επίμων και ανθρώπων υποδεικνύουν ότι η έκφραση της hnRNP A2/B1 ρυθμίζεται διαφορετικά κατά την ανάπτυξη και τελικά μειώνεται σε ενήλικο πνευμονικό ιστό. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην διατύπωση της πρότασης ότι η hnRNP A2/B1 αποτελεί μια ογκοεμβρυϊκή πρωτεΐνη (oncofetoprotein) [316]. Η υποκυτταρική εντόπισή της μπορεί να μεταβληθεί από εντελώς πυρηνική μέχρι και να περιλάβει χρώση του κυτταροπλάσματος σε κύτταρα του πνεύμονα με περισσότερες αλλοιώσεις του DNA [317]. Η πλειονότητα των δεδομένων υποστηρίζει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης της hnRNP A2/B1 και της νεοπλαστικής μεταμόρφωσης, αλλά η αιτία και οι συνέπειες αυτής της έκφρασης δεν έχουν αποσαφηνιστεί, ενώ πολλές φορές τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι αντικρουόμενα.

Οι παραπάνω έρευνες προκάλεσαν ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τις πρωτεΐνες hnRNP γενικά στον καρκίνο του πνεύμονα. Μελέτη και για την έκφραση άλλων hnRNP, της A1, της C1/C2 και της K, παράλληλα με την A2/B1, έχει δείξει ότι η

έκφρασή τους διαφοροποιείται μεταξύ της φυσιολογικής και της καρκινικής κατάστασης [318].

A3. Αυτοαντισώματα σαν βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάγκη για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα έχει οδηγήσει σε έρευνα για την αναζήτηση μορίων βιοδεικτών που θα προσφέρουν μια γρήγορη, άμεση, ειδική και πρώιμη εντόπιση του καρκίνου. Μια από τις μη παρεμβατικές διαδικασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η λήψη αίματος από τον πιθανό ασθενή και η αναζήτηση συγκεκριμένων βιοδεικτών στον ορό ή στο πλάσμα, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα [64, 319]. Πρόσφατα όμως άρχισε να εξετάζεται η περίπτωση της παρουσίας άλλων μορίων στον ορό, των αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που είτε εκφράζονται αποκλειστικά, είτε υπερεκφράζονται στον καρκίνο.

Η παρουσία αντιγόνων των οποίων η έκφραση αυξάνεται σε καρκινικές καταστάσεις έχει χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικός δείκτης για την παρουσία συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, όπως το PSA (Prostate-Specific Antigen) για τον καρκίνο του προστάτη και το CEA (Carcino-Embryonic Antigen) για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η έκκριση πρωτεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο κατά την καρκινική εξαλλαγή, όπως για παράδειγμα της cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (PKA) η οποία χαρακτηρίζεται σαν εξωκυττάρια PKA (ECPKA), και η αύξηση των επιπέδων της, δημιουργεί αντισώματα έναντι αυτής. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να εντοπιστούν με μια ενζυματική ανοσοβιολογική δοκιμασία (EIA) με μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από την εντόπιση του ίδιου του αντιγόνου, σε μια πλειάδα καρκινικών τύπων [320, 321]. Γενικά είναι πλέον αντιληπτό ότι ο καρκίνος μπορεί να πυροδοτήσει αυτοανοσία [322]. Αν και οι παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή τέτοιων αυτοαντισωμάτων δεν είναι πλήρως κατανοητοί, τα δεδομένα που υπάρχουν δείχνουν ότι οι στόχοι των αυτοαντισωμάτων είναι κυτταρικές πρωτεΐνες που η παρεκκλίνουσα έκφραση τους μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, τα ονομαζόμενα καρκινο-συνδεδεμένα αντιγόνα (Cancer Associated Antigens, Tumor Associated Antigens) [323-325]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εντόπιση αυτοαντισωμάτων έναντι της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σε διάφορους τύπους καρκίνου [326].

Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, μελέτες έχουν δείξει την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών αντιγόνων (Anti-Nuclear antibodies, ANAs), ένα μέρος των οποίων παρουσιάζει μάλιστα εξειδίκευση όσον αφορά τον υπο-τύπο του καρκίνου, ενώ φάνηκε και η σχέση της παρουσίας αυτών των αυτοαντισωμάτων με την πρόγνωση της ασθένειας [327]. Τα πυρηνικά αυτοαντισώματα που εντοπίστηκαν σε δύο διαφορετικούς τύπους καρκίνου (πνεύμονα και λαιμού-κεφαλής) με την ίδια κυτταρική προέλευση, δηλαδή καρκινώματα εκ πλακώδους επιθηλίου, ήταν επίσης ειδικά σε μεγάλο βαθμό για τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου [328]. Προγνωστική αξία φαίνεται να έχει και η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της p53 σε ορούς ασθενών με καρκίνο στον πνεύμονα [329]. Οι μελέτες για την εύρεση ειδικών αυτοαντισωμάτων, κυρίως με μεθόδους πρωτεομικής, φέρνουν στο φως μια πλειάδα υποψήφιων βιοδεικτών [330], που όμως η σχέση τους με τον καρκίνο του πνεύμονα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Τέλος, η ανίχνευση ενός συνδυασμού αυτοαντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών παραγόντων της καρκινογένεσης, με αρκετά βελτιωμένη ειδικότητα ως προς την ανίχνευση των ίδιων των αντιγόνων, μπορεί να προσφέρει ένα ευαίσθητο και ειδικό τεστ αίματος για την πρόωμη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα [331].

A4.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας Διατριβής είναι η ταυτοποίηση ειδικών μοριακών αλλαγών/τροποποιήσεων σε πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA (πρωτεΐνες RBP) που φαίνεται να σχετίζονται με την καρκινική εξαλλαγή στον ανθρώπινο πνεύμονα. Αφορά, κατά κύριο λόγο, στη μελέτη των προτύπων έκφρασης των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP), ειδικότερα της ομάδας των hnRNP A/B, λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν μέλη της ομάδας ως πιθανοί βιολογικοί δείκτες για πρόωμη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα.

Η μελέτη επικεντρώνεται σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίες περιλαμβάνουν καρκινικό ιστό σε άμεση σύγκριση με παρακείμενο, φαινομενικά υγιή, ιστό από τον ίδιο ασθενή. Οι κύριες πειραματικές προσεγγίσεις αφορούν:

A) στον εκτενή ανοσοχημικό προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B, αλλά και άλλων πρωτεϊνών RBP με διαφαινόμενη εμπλοκή στον καρκινικό μετασχηματισμό των κυττάρων, με στόχο την αποσαφήνιση της απορύθμισής τους στον καρκίνο του πνεύμονα και την διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής τους ως βιοδεικτών

B) στον ποσοτικό προσδιορισμό των αντίστοιχων mRNA, με στόχο την άμεση σύγκριση των αλλαγών προτύπων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών με τα αντίστοιχα επίπεδα των mRNA στο ίδιο βιοπτικό υλικό. Η ταυτοποίηση πιθανών διαφοροποιήσεων ανάμεσα στο επίπεδο της πρωτεΐνης και του mRNA στα ζεύγη βιοψιών (καρκινικός/φυσιολογικός ιστός) θα επιτρέψει έναν πρώτο μοριακό χαρακτηρισμό του μηχανισμού της απορύθμισης της έκφρασης των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών.

Επιπλέον στόχο αποτελεί η διερεύνηση μοριακών/βιοχημικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών hnRNP, κυρίως της hnRNP A3, με τη δημιουργία νέων εργαλείων που θα βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση του ρόλου των πρωτεϊνών αυτής της ομάδας (A/B) στην κυτταρική λειτουργία και στην απορύθμιση της στον καρκίνο.

B. Υλικά και Μέθοδοι

B. Υλικά και μέθοδοι

B1. Κυτταροκαλλιέργεια

Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές επιθηλιακού τύπου καλλιεργούνται σε στειρές συνθήκες στους 37⁰ C παρουσία 5% CO₂, σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa (καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας) και A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα) καθώς και η κυτταρική σειρά αρουραίου Novikoff (ηπάτωμα) καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM (παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης / στρεπτομικίνης (1%) και 10% FBS (Fetal Bovine Serum)). Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές H157 (καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου πνεύμονα), HCC78 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα) και WISH (αμνιοτικής προέλευσης) καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI (παρουσία 1% γλουταμίνης, 1% πενικιλίνης / στρεπτομικίνης και 10% FBS).

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με τη χρήση θρυψίνης (0,25% σε PBS) μετά από πλύση δύο φορές με PBS. Η δράση της θρυψίνης τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.000 σ.α.λ. (στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά, επαναδιάλυση των κυττάρων σε γνωστό όγκο PBS και υπολογισμός του αριθμού τους με τη χρήση της πλάκας Neubauer. Τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με PBS και αποθηκεύονται σε μορφή ιζήματος στους -80° C.

B2. Κυτταρικά Εκχυλίσματα

B2.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος

Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και η όλη διαδικασία εκτελείται στους 0-4⁰ C. Στο κυτταρικό ίζημα γίνεται προσθήκη διαλύματος NET-2 (10 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,05% NP-40) σε συγκέντρωση 1-2x10⁷ κύτταρα / ml, παρουσία αναστολέα των πρωτεασών (1 mM PMSF και του μείγματος αναστολέων των πρωτεασών (Sigma)). Τα κύτταρα λύνονται με την επίδραση

υπερήχων (6 επαναλήψεις των 20 δευτερολέπτων) στους 0° C και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 σ.α.λ.. Το υπερκείμενο συλλέγεται, ψύχεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους -80° C.

Μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (Sigma): 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin. Τελική αραιώση 1/100.

B2.2 Παρασκευή πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος

Η παρασκευή πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος στηρίζεται στη μέθοδο των Choi και Dreyfuss [80]. Η διαδικασία ολοκληρώνεται στο ταχύτερο δυνατό χρόνο σε χαμηλή θερμοκρασία (0 - 4° C). Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα A (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂) σε αναλογία 5x10⁷ κύτταρα/ml διαλύματος, παρουσία 0,5% Triton X-100 και 1 mM PMSF. Ακολουθεί ομογενοποίηση στον πάγο με τη χρήση υάλινου ομογενοποιητή Dounce με σφιχτό έμβολο (10 παλινδρομήσεις) και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4.000 σ.α.λ. στους 4° C. Το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό εκχύλισμα) ψύχεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους -80° C. Το ίζημα (πυρήνες) επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα A απουσία Triton, σε αναλογία 2,5x10⁷ αρχικός αριθμός κυττάρων/ml διαλύματος, 1mM PMSF και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (Sigma). Ακολουθεί λύση με την επίδραση υπερήχων (2 επαναλήψεις των 5 λεπτών στον πάγο) και το εκχύλισμα επιστρέφεται σε διάλυμα A με 30% σακχαρόζη και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 5,000 σ.α.λ. στους 4° C.

Το υπερκείμενο, που περιλαμβάνει τα διαλυτά συστατικά του πυρήνα (πυρηνικό εκχύλισμα), συλλέγεται από την άνω στιβάδα της σακχαρόζης, ψύχεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους -80° C.

B2.3 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες κυτταρικών εκχυλισμάτων κατακρημνίζονται με προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA) σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v). Μετά από παραμονή σε πάγο για 30 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13,000 σ.α.λ. στους 4° C. Τέλος το ίζημα πλένεται δύο φορές με διάλυμα παγωμένης (-20° C) αιθανόλης 75% και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα.

B2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο Bradford, με τη χρήση του τυποποιημένου σκευάσματος Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate. Ετοιμάζονται αραιώσεις του προς μέτρηση πρωτεϊνικού δείγματος, καθώς και ενός πρότυπου δείγματος αλβουμίνης βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης, που θα χρησιμοποιηθεί για την καμπύλη αναφοράς, σε τελικό όγκο 800 μ l. Προστίθενται 200 μ l από το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο χρωστικής (BioRad) στα δείγματα και μετά την πάροδο 10 λεπτών μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) στα 595 nm. Η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη που λαμβάνεται από τις μετρήσεις των αραιώσεων του δείγματος της γνωστής συγκέντρωσης.

B3. Ανοσοαποτύπωση με μεταφορά κατά Western (Western blot)

B3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μία διάσταση (SDS/PAGE)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά βάσει του μοριακού τους βάρους σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, υπό συνθήκες αποδιάταξης, παρουσία του ισχυρά ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο), σύμφωνα με το ασυνεχές σύστημα του Laemmli [332].

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναδιαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 5% β -μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 2,3% SDS, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης), αποδιατάσσονται με θέρμανση στους 96° C για 10 λεπτά και φορτώνονται σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (ακρυλαμίδη:δισακρυλαμίδη 29:1 w/w) στο θάλαμο ηλεκτροφόρησης της συσκευής MINI –PROTEAN III (Bio-Rad) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,9, 400 mM γλυκίνη και 0,1% SDS). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο τμήματα διαφορετικής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης και διαφορετικού pH: το άνω τμήμα, πήκτωμα συμπύκνωσης, με σύσταση 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (w/v) ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0,1 % (v/v) τετρα-μεθυλεθυλενεδιαμίνη

(TEMED) στο οποίο γίνεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μία λεπτή στιβάδα, και το κάτω τμήμα, πήκτωμα διαχωρισμού, με σύσταση 0,375 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 % (w/v) ακρυλαμίδη:δισακρυλαμίδη, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS και 0,1% (v/v) TEMED, όπου γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση διάρκειας περίπου 45-60 λεπτών, σε σταθερή τάση περίπου 150 V μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να φτάσει στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού. Μαζί με το δείγμα φορτώνεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker).

Εάν είναι επιθυμητό ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με τη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R250 (0,25% w/v) σε διάλυμα μονιμοποίησης (50% (v/v) μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) και αποχρωματισμός σε διάλυμα 25% (v/v) αιθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών.

B3.2 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western

B3.2.1 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου γίνεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran nitrocellulose transfer membrane, Whatman) σε συσκευή υγρής μεταφοράς (Biorad) στους 4° C σύμφωνα με τη μέθοδο των Fritz και συνεργατών [333]. Το πήκτωμα τοποθετείται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη και εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) το οποίο περιέχει 200 ml 10X διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), 200 ml μεθανόλη και 600 ml d.d. H₂O (pH 8,3). Η μεταφορά πραγματοποιείται στα 300 mA για 90 λεπτά. Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται σε διάλυμα TBS (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) για 10 λεπτά, ενώ ακολουθεί έλεγχος της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς με αντιστρεπτή χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με τη χρωστική Ponceau-S (0,2% (w/v) σε 3% τριγλωροοξικό οξύ) για ένα λεπτό. Ο αποχρωματισμός γίνεται με έκπλυση σε νερό.

B3.2.2 Ανοσοαποτύπωση

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά τη χρώση με Ponceau-S ξεπλένεται σε διάλυμα TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl) και στη συνέχεια επώαζεται με ήπια ανακίνηση σε διάλυμα δέσμευσης (blocking buffer, Zeller) (10 mM Tris-HCl pH7,5, 0,1 M MgCl₂, 5% (v/v) άπαχο γάλα, 0,5% Tween 20, 0,1% (v/v) Triton X-100), ώστε να δεσμευθούν όλες οι ελεύθερες μη ειδικές θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη, για 2 φορές από 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα με ήπια ανάδευση, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά για όλη τη νύχτα στους 4⁰C. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα Zeller 2 φορές για 10 λεπτά, και ακολουθεί επώαση διάρκειας 90 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με δεύτερο αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του πρώτου αντισώματος, συζευγμένο με το ένζυμο ραφανιδική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase), σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα Zeller. Τέλος η μεμβράνη ξεπλένεται 2 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα Zeller και στη συνέχεια επιπλέον 2 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα TBS.

Στην παρούσα εργασία, τα εμπορικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής (σε παρένθεση οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν):

α-ακτίνη: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού MAB1501, Chemicon-Milipore (1:4.000)

α-hnRNP A1: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 4B10, Santa Cruz Biotechnology (1:1.000)

α-hnRNP A2/B1: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού DP3B3, Santa Cruz Biotechnology (1:1.000)

α-hnRNP A3: πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ab50949, Abcam (1:2.000)

α-hnRNP C1/C2: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 4F4, Santa Cruz Biotechnology (1:1.000)

α-hnRNP PSF: πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού H-80, Santa Cruz Biotechnology (1:1.000)

α-hnRNP L: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 4D11, Santa Cruz Biotechnology (1:2.000)

α-hnRNP M1-4: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 1D8, Santa Cruz Biotechnology (1:1.000)

α-hnRNP SF2/ASF: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 96, Santa Cruz Biotechnology (1:500)

α -hnRNP K/J: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 3C2, Santa Cruz Biotechnology (1:500)

Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής (σε παρένθεση οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν):

ανθρώπινο: goat anti-human IgG Horseradish Peroxidase conjugate Sigma (1:40.000)

ποντικού: goat anti-mouse IgGM Horseradish Peroxidase conjugate Sigma (1:20.000)

κουνελιού: goat anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase conjugate Chemicon-Milipore (1:10.000)

B3.2.3 Αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL)

Η ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στηρίζεται στην τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL), μέσω αντιδραστηρίων της εταιρίας Amersham. Ορισμένες φορές χρησιμοποιείται και μη εμπορικό μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας που αποτελείται από δύο διαλύματα, εκ των οποίων το πρώτο περιέχει 100 μ l 250 mM λουμινόλη διαλυμένη σε DMSO (3-Aminophthalhydrazide 98%, Alfa Aesar), 44 μ l 90 mM κουμαρικό οξύ σε DMSO (p-Coumaric acid, Sigma) και 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα 1 M Tris-HCl (pH 8,5) σε συνολικό όγκο 10 ml, ενώ το δεύτερο 6,4 μ l H₂O₂ (30%) και 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5) σε συνολικό όγκο 10 ml. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται στο διάλυμα χημειοφωταύγειας για 1 λεπτό ενώ στη συνέχεια τοποθετείται σε κασέτα έκθεσης σε επαφή με φιλμ αυτοραδιογραφίας (Super RX Fuzi medical x-ray film, Fuzifilm) για διάφορους χρόνους (από λίγα λεπτά μέχρι μερικά δευτερόλεπτα), ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά την έκθεση ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών πάνω σ' αυτό.

B3.2.4 Μέθοδος οπτικής πυκνομετρίας για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών

Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνών, γίνεται με τη χρήση του προγράμματος Imagequant της Molecular Dynamics έπειτα από σάρωση των πρωτεϊνικών ζωνών στα φιλμ αυτοραδιογραφίας με χρήση ψηφιακού σαρωτή.

B4. Βιοψίες πνεύμονα ασθενών με ΜΜΚΠ

B4.1 Παραγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Από βιοψίες που φυλάσσονται στους -80°C ή σε υγρό άζωτο αποκόπτεται ένα τεμάχιο. Η διαδικασία γίνεται σε υγρό άζωτο και ολοκληρώνεται σε όσο το δυνατό συντομότερο χρονικό διάστημα. Το βάρος των τεμαχίων, που λήφθηκε στην παρούσα μελέτη, κυμαίνεται από 25 μέχρι 55 γραμμάρια.

Ο ιστός εμβαπτίζεται σε 500 μl διαλύματος λύσης (lysis buffer: 9,5 M ουρία, 2% NP-40, 5% μερκαπτοαιθανόλη), και ομογενοποιείται με τη βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή με πλαστικές λεπίδες (TissueRuptor, Qiagen) σε μέγιστη ταχύτητα για περίπου 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, εάν παρατηρηθούν αδιάλυτα τεμάχια, η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στο ομογενοποίημα προστίθεται ίσος όγκος κρύου PBS και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA), σε τελική συγκέντρωση 10%, με 30 λεπτά επώαση σε πάγο και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 λεπτά στους 4°C . Ακολουθούν δύο πλύσεις του ίζηματος με αιθανόλη (75%), και στη συνέχεια το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Στο τέλος επαναδιαλύεται σε 50 μl διαλύματος λύσης και ίση ποσότητα αποδιατακτικού διαλύματος φόρτωσης (SDS sample buffer) και ακολουθεί ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE.

B4.2 Απομόνωση RNA από κυτταρικές σειρές

Η απομόνωση ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές πραγματοποιείται με τη χρήση της τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων (kit) TRI Reagent® Solution της εταιρίας Ambion σύμφωνα με το πρωτόκολλο του προμηθευτή. Τα στάδια απομόνωσης RNA σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο έχουν ως εξής:

Ομογενοποίηση κυττάρων (TissueRuptor, Qiagen) σε 1 ml διαλύματος TRI Reagent ανά 1×10^7 κύτταρα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Εκχύλιση του RNA με προσθήκη 100 µl BCP για κάθε 1 ml διαλύματος TRI Reagent, ανάμιξη, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και φυγοκέντριση στα 12.000 x g για 10–15 λεπτά στους 4°C. Η υδατική φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο.

Καταβύθιση του RNA με προσθήκη 500 µl ισοπροπανόλης για κάθε 1 ml TRI Reagent με έντονη ανακίνηση για 5–10 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5–10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 12,000 x g για 8 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.

Έκπλυση του ίζηματος με 1 ml αιθανόλης (75%) για κάθε 1 ml διαλύματος TRI Reagent και φυγοκέντριση στα 7,500 x g για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης το ίζημα στεγνώνει στον αέρα.

Στο RNA γίνεται μια επιπλέον κατεργασία με DNάση. Το ίζημα διαλύεται σε 200 µl TE (Tris-EDTA), προστίθεται 50 µl 50 mM MgCl₂, 2,5 µl 10 mM DTT και 5 µl DNase I (2U/µl) και επώάζεται για 1 ώρα στους 37° C. Ακολουθεί προσθήκη 5 µl 0,5 M EDTA και 5 µl 10% SDS για να σταματήσει η αντίδραση. Το RNA απομονώνεται από το διάλυμα με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης:χλωροφόρμιου (1:1). Μετά από φυγοκέντριση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά, λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση που περιέχει το RNA και ακολουθεί η κατακρήμνιση του.

B4.3 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων

Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται από ένα διάλυμα με την προσθήκη 1/10 (v/v) του διαλύματος 3 M οξικού νατρίου (NaOAc) pH5,2 και 2,5 όγκων παγωμένης αιθανόλης (100%) με έντονη ανάδευση. Το δείγμα παραμένει για 2 ώρες στους -80°C ή για περισσότερο από 12 ώρες στους -20°C. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. στους 4°C και ξέπλυμα του ιζήματος δύο φορές με παγωμένη αιθανόλη (75%). Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και επαναδιαλύεται σε επιθυμητή ποσότητα TE.

B4.4 Απομόνωση RNA από βιοψίες πνεύμονα

Η απομόνωση ολικού RNA από τις βιοψίες πνεύμονα πραγματοποιείται με τη χρήση της τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων RNeasy Mini Kit της

εταιρίας Qiagen και ακολουθείται το πρωτόκολλο του προμηθευτή που συνοπτικά έχει ως εξής:

Από τις αποθηκευμένες σε ψύξη βιοψίες αποκόπτεται τεμάχιο μέχρι 30 mg (για την ακεραιότητα του απομονωμένου RNA λαμβάνονται οι απαραίτητες προφυλάξεις διατήρησης χαμηλής θερμοκρασίας –με χρήση υγρού αζώτου- και αποφυγής επαφής με ριβονουκλεάσες του περιβάλλοντος). Το απομονωμένο τεμάχιο ομογενοποιείται με μηχανικό ομογενοποιητή (TissueRuptor, Qiagen) με την προσθήκη αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος (600 μl, RLT buffer) και το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται ώστε να ληφθεί το υπερκείμενο. Ακολουθεί προσθήκη 1 όγκου αιθανόλης (70%) στο εκχύλισμα, ανάμειξη και μεταφορά σε στήλη με μεμβράνη δέσμευσης RNA (RNeasy spin column) για σύντομη φυγοκέντρωση. Μετά την έκπλυση της στήλης (350 μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1) ακολουθεί κατεργασία με 30 Units DNάση (RNase-Free DNase Set, Qiagen) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και νέα έκπλυση της στήλης με προσθήκη 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος (RW1) και σύντομη φυγοκέντρωση. Ακολουθούν εκπλύσεις της στήλης (2 φορές με προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE) με μια τελική μακρά φυγοκέντρωση. Τέλος η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής 1,5 ml, προστίθενται 30–50 μl H₂O (ελεύθερου RNάσης) απευθείας στην μεμβράνη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα 8.000 x g για έκλυση του RNA.

B4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων (φωτόμετρο DU 640B, Beckman) σε μήκος κύματος 260 nm. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται από τον τύπο: Συγκέντρωση RNA (μg/ml) = 40 x OD₂₆₀ x συντελεστή αραιώσης δείγματος, όπου OD₂₆₀ η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm. Για την αξιολόγηση της καθαρότητας του RNA υπολογίζεται ο λόγος OD₂₆₀/ OD₂₈₀, ο οποίος πρέπει να είναι 1,8 – 2,0 για να θεωρηθεί το απομονωμένο RNA υψηλής καθαρότητας.

B4.5.1 Πειραματική διαδικασία συμβατικού RT-PCR

Στάδιο 1: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA πραγματοποιείται με τη μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR). Επειδή σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των mRNA των πρωτεϊνών hnRNP, η δημιουργία cDNA από το ολικό RNA που απομονώθηκε πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών oligo(dT) εκκινητών (που επιλέγουν το mRNA) στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η SuperScriptII αντίστροφη μεταγραφάση της Invitrogen και ακολουθείται το πρωτόκολλο που προτείνει ο προμηθευτής. Συνοπτικά η αντίδραση περιλαμβάνει:

Ανάμιξη 1 μg απομονωμένου RNA, 1 μl dNTPs (10mM), 1 μl εκκινητών oligo(dT₁₅) (25pmol/μl) και προσθήκη d.d. H₂O έως τα 12 μl τελικού όγκου αντίδρασης. Ακολουθεί επώαση στους 65°C για 5 λεπτά, άμεση τοποθέτηση στον πάγο, σύντομη φυγοκέντρηση, προσθήκη 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5X First-Strand Buffer, 2 μl 0.1 M DTT, 1 μl του αναστολέα ριβονουκλεασών Human Placental Ribonuclease Inhibitor (HT Biotechnology) και νέα επώαση στους 42°C για 2 λεπτά. Τέλος προστίθεται 1 μl (200 Units) SuperScriptII και ακολουθεί επώαση στους 42°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 75°C για 15 λεπτά. Το cDNA (τελικός όγκος 20 μl) φυλάσσεται στους -20°C.

Στάδιο 2: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών για τα οποία προσδιορίστηκε η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m), ο αριθμός των απαιτούμενων κύκλων και η συγκέντρωση MgCl₂, για τη βέλτιστη απόδοση προϊόντων. Τα ζεύγη των εκκινητών για τη διενέργεια συμβατικής PCR και οι θεωρητικές τους τιμές αποδιάταξης (που είναι μέσα στα αποδεκτά όρια) έχουν ως εξής:

hnRNP A1	F: 5'-ACTGTGAATGGCCACAACACTG-3' R: 5'-TGCCATAGCTACTGCTGCTG-3'	60 62
hnRNP A2/B1	F: 5'-GAGTCCGGTTCGTGTTTCGTC-3' R: 5'-TGGCAGCATCAACCTCAGC-3'	62 62
RPL32	F: 5'-TTAAGCGTAACTGGCGGAAAC-3' R: 5'-GAGCGATCTCGGCACAGTAA-3'	58 61
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	62 62
CD44	F: 5'-GATGATGACGTGAGCAGCGGCTC-3' R: 5'-GTCCTTTATGGACCAGAGGTTGTG-3'	66 62,7
CD44 v8	F: 5'-GATGATGACGTGAGCAGCGGCTC-3' R: 5'-CCTTCATGTGATGTAGAGAAGC-3'	66 58,4
CD44 v6	F: 5'-GATGATGACGTGAGCAGCGGCTC-3' R: 5'-TTCCTGCTTGATGACCTCGTC-3'	66 59,8
CASP9	F: 5'-TCCTGCTTAGAGGACACAG-3' R: 5'-GGACACAAAGATGTCACTGG-3'	56,7 57,3
LRDD	F: 5'-ACTCACGAGGACCCTCAGC-3' R: 5'-GGAGACAGGCACCCAGTGT-3'	61 61
MAP4K4	F: 5'-CAAGCCAAGCTTCCATGCTC-3' R: 5'-TGGTGGAGTTTCTCTGTCCT-3'	59,4 57,3
PPP3CB	F: 5'-ACAGGGATGTTGCCTAGTGG-3' R: 5'-ATCCAAACCCTTTGCCTCTT-3'	59,4 55,3

Οι αντιδράσεις PCR λαμβάνουν χώρα στον θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ research), σε σωληνάρια τύπου eppendorf μικρού όγκου (0.5 ml) και λεπτών τοιχωμάτων. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25 μl και περιέχει τα εξής: X μl cDNA, 2,5 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης, 1,5μl 25 mM MgCl₂, 1μl από κάθε εκκινητή (25 pmol/μl), 1 μl dNTPs (10 mM το κάθε ένα) και 2 Units ένζυμο Taq πολυμεράσης (Invitrogen). Παράλληλα πραγματοποιείται και μια επιπλέον αντίδραση χωρίς προσθήκη cDNA ώστε να ελεγχθεί η πιθανή επιμόλυνση των αντιδραστηρίων με ξένο DNA.

Το πρόγραμμα διαδοχικών εναλλαγών θερμοκρασίας είναι το παρακάτω:

-Ένας αρχικός κύκλος στους 94° C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη των διπλών ελίκων του cDNA.

-25-35 κύκλοι (ανάλογα με το γονίδιο) με τα εξής βήματα :

94° C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη των διπλών ελίκων του cDNA

60° C (ή σε μικρότερη θερμοκρασία αν κριθεί απαραίτητο σύμφωνα με το T_m των εκκινητών) για 45 δευτερόλεπτα για την πρόσδεση των εκκινητών στο cDNA

72° C για 30 δευτερόλεπτα για την επιμήκυνση των προϊόντων

-Ένας τελικός κύκλος επιμήκυνσης των προϊόντων στους 72° C για 10 λεπτά

-Ψύξη στους 4° C

Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης αποθηκεύονται στους -20° C μέχρι την ανάλυσή τους. Η απόδοση των αντιδράσεων αλλά και η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης.

B4.5.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Γενικά χρησιμοποιούνται πηκτώματα αγαρόζης 1%, τελικού όγκου 70 ml. Χρησιμοποιείται αγαρόζη χαμηλού σημείου ζέσεως (AppliChem) και οι ηλεκτροφορήσεις λαμβάνουν χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA) ή 0.5xTBE (45 mM Tris-borate/1 mM EDTA), με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml.

Στα προϊόντα των αντιδράσεων PCR με τελικό όγκο 25 μl προστίθεται 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (6x gel loading dye blue, New England BioLabs) και 20 μl από αυτά φορτώνονται στις εγκοπές φόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται στα 120 volts και σταματάει όταν το μέτωπο της χρωστικής φτάσει στο 70% περίπου του μήκους του πηκτώματος.

Για την ταυτοποίηση απομονωμένου RNA χρησιμοποιήθηκε 1 μg RNA σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, το οποίο αρχικά θερμάνθηκε στους 96° C για 10 λεπτά για αποδιάταξη της δομής του.

Το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων προσδιορίζεται με την βοήθεια δείκτη DNA προσδιορισμένου μεγέθους που ηλεκτροφορείται παράλληλα με τα δείγματα. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε πλαίσιο λάμπας UV και φωτογραφίζεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

B4.5.3 Αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qReal-time PCR)

Για τον υπολογισμό της έκφρασης του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, τόσο μεταξύ των δειγμάτων από ζεύγη βιοψιών καρκινικού-φυσιολογικού ιστού όσο και δειγμάτων από κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιείται η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time - PCR). Χρησιμοποιείται το μηχάνημα iQ5 Real-Time PCR Detection System (Biorad) και το τυποποιημένο σκεύασμα iQ SYBR Green Supermix (Biorad) που στηρίζεται στη χρήση της χρωστικής SYBR Green I, η οποία έχει την ιδιότητα αποκλειστικής πρόσδεσης σε δίκλωνο DNA (dsDNA). Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται το λογισμικό iQ5 Optical System Software (Version 2.0, Biorad).

Για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας (efficiency) των αντιδράσεων για κάθε ζεύγος εκκινητών, γίνεται χρήση cDNA από κύτταρα A549. Η δημιουργία πρότυπης καμπύλης πραγματοποιείται με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων cDNA (από 100-0,8 ng), ενώ αποδεκτές είναι οι τιμές που κυμαίνονται από 80 έως 110%.

Σε κάθε αντίδραση γίνεται μέτρηση της καμπύλης τήξης (melting curve), χαρακτηριστικής για το κάθε προϊόν, για να καθοριστεί η ειδικότητα της, ενώ η παράλληλη διεξαγωγή αντιδράσεων χωρίς την προσθήκη εκμαγείου cDNA εγγυάται την απουσία μόλυνσης στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται. Με το πέρας της αντίδρασης γίνεται έλεγχος των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να επιβεβαιωθεί το μέγεθος τους, και η απουσία μη ειδικών προϊόντων.

Για τη διενέργεια των αντιδράσεων Real-Time PCR σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών που διαφοροποιούνται από τα ζεύγη που χρησιμοποιούνται στη συμβατική PCR, σε σχέση με το μέγεθος των προϊόντων που λαμβάνονται, δεδομένου ότι για την επιτυχή διεξαγωγή αντιδράσεων Real-Time PCR το μέγεθος αυτό πρέπει να είναι σχετικά μικρό (να μην υπερβαίνει τα 180-200 ζεύγη βάσεων). Οι αλληλουχίες των ζευγών των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Real-Time PCR για κάθε γονίδιο που εξετάζεται και οι θεωρητικές τους τιμές για αποδιάταξη (T_m) είναι οι παρακάτω (η σύνθεσή τους έγινε στην MWG, Γερμανία):

hnRNP A1	F: 5'-CCAGAGAAGATTCTCAAAGACC-3'	58,4
	R: 5'-CTTCAGTGTCTTCTTTAATGCC-3'	56,5
hnRNP A2/B1	F: 5'-AGCTTTGAAACCACAGAAGAA-3'	54,4
	R: 5'-TTGATCTTTTGCTTGCAGGA-3'	55
hnRNP B1	F: 5'-TGTTCCTTTGGAGAGGAAAAAAG-3'	54,4
	R: 5'-TTGATCTTTTGCTTGCAGGA-3'	55
RPL32	F: 5'-TTAAGCGTAACTGGCGGAAAC-3'	58
	R: 5'-GAGCGATCTCGGCACAGTAA-3'	61
ASF/SF2	F: 5'-CTTGGTGGGAAGGCCTGTT-3'	58,8
	R: 5'-AGATGCGGCAATCGTTGTTC-3'	57,3

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε πλάκες πολλαπλών φρεατίων (96 well iCycler iQ pcr plates, BioRad) σε τελικό όγκο 25 μl με την εξής σύνθεση:

5 μl cDNA (10 ng/μl) από το υπό εξέταση δείγμα, 1,5 μl από τον κάθε εκκινητή (συγκέντρωσης 10 pmol/μl), 12,5 μl SYBR Green Supermix και 4,5 μl H₂O.

Το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε είναι δύο βημάτων (πρόσδεση εκκινητών και επιμήκυνση σε ένα βήμα) με τις εξής συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνους αντιδράσεων:

1ο στάδιο

95° C για 3,5 λεπτά (αρχική αποδιάταξη της διπλής έλικας)

2ο στάδιο (40 κύκλοι)

95° C για 15 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη της διπλής έλικας)

60° C για 30 δευτερόλεπτα (πρόσδεση των εκκινητών και επιμήκυνση του προϊόντος)

Στο τέλος κάθε κύκλου γίνεται η μέτρηση του σήματος

3ο στάδιο (80 κύκλοι)

Δημιουργία καμπύλης τήξης προϊόντων (melting curve) με αρχική θερμοκρασία 55° C και αύξηση ανά 10 δευτερόλεπτα (μέχρι τους 94,5° C).

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της έκφρασης των mRNA χρησιμοποιείται το ειδικό πρόγραμμα Gene Expression Analysis που περιέχεται στο λογισμικό iQ5 Optical System Software. Ο υπολογισμός γίνεται με τροποποίηση της μεθόδου Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta C_T$) των Livak και Schmittgen [334], ώστε να περιλαμβάνεται στον υπολογισμό η αποτελεσματικότητα (efficiency) κάθε ζεύγους

εκκινητών. Η κανονικοποίηση γίνεται με βάση την έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου RPL32 ως εσωτερικού μάρτυρα για την εξομάλυνση των τιμών.

B5. Κλωνοποίηση –πλασμιδιακές κατασκευές

B5.1 Βακτηριακά στελέχη –πλασμιδιακοί φορείς

Για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται το στέλεχος *E.coli* XL1Blue, ενώ για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το στέλεχος BL21(DE3) για την πρωτεΐνη hnRNP A3Ct και Rosetta2 για την πρωτεΐνη hnRNP A2. Το στέλεχος Rosetta2 προμηθεύει το βακτηριακό κύτταρο με tRNAs για 7 σπάνια κωδικόνια (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, CGG, και GGA) με ένα πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την έκφραση πολυπεπτιδίων σε αυτή τη διατριβή, είναι οι pGEX4T2 για την hnRNP A2 και pGEX4T3 για την hnRNP A3Ct, στους οποίους οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε αμινοτελική σύντηξη με την πρωτεΐνη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), μεγέθους 26 kDa. Το γονίδιο της GST περιέχει ένα σημείο εκκίνησης μετάφρασης (ATG) καθώς και θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος, και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή tac. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Οι προαναφερθέντες πλασμιδιακοί φορείς προσδίδουν στο βακτηριακό κύτταρο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

Ο κλώνος για την hnRNP A3Ct απομονώθηκε στο εργαστήριό μας από cDNA βιβλιοθήκη ηπατοκυττάρων αρουραίου (pmBx) ενώ ο κλώνος για την hnRNP A2 προέρχεται από cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (pHCA2, προσφορά του Dr. G. Dreyfuss). Και τα δύο ενθέματα περιέχονται σε πλασμίδια pBluescript με ανθεκτικότητα έναντι της αμπικιλίνης.

B5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια γίνεται με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης/SDS. Για έλεγχο των πλασμιδίων η απομόνωση γίνεται από παρασκευή μικρής κλίμακας και για την προετοιμασία των πλασμιδίων για την αντίδραση λιγάσης καθώς και για τον πολλαπλασιασμό των τελικών κατασκευών από παρασκευή μεσαίας κλίμακας.

B5.2.1 Παρασκευή μικρής κλίμακας (Mini preparation)

Μοναδική αποικία που προέρχεται από μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων εμβολιάζεται σε 2 ml LB το οποίο περιέχει κατάλληλο (για το πλασμίδιο) αντιβιοτικό, και επώάζεται στους 37°C με ανάδευση για 12-14 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 ml της καλλιέργειας για 1 λεπτό στις 6.000 σ.α.λ., επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH8,0) και 20 μg RNaseA, προσθήκη 200 μl NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS), και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστίθενται 200 μl 3 M KoAc (3 M οξικό κάλιο, 2 M παγόμορφο οξικό οξύ, pH 5,5) και ακολουθεί τοποθέτηση σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (σε επιτραπέζια φυγόκεντρο) στη μέγιστη ταχύτητα στους 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο και το πλασμιδιακό DNA καταβυθίζεται με προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη (περίπου 100 μl), στεγνώνει στον αέρα και επαναδιαλύεται σε 35 μl 1:10 TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris,pH 8,0).

B5.2.2 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας (midi preparation)

Μοναδική αποικία βακτηρίων, από μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων, εμβολιάζεται σε 25 ml LB που περιέχει το κατάλληλο (για το πλασμίδιο) αντιβιοτικό και επώάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για 12-15 ώρες. Κατόπιν ψύχεται για 5 λεπτά, φυγοκεντρείται στις 3.000 σ.α.λ. σε φυγόκεντρο Beckman J2-21 (κεφαλή JA20) στους 4°C για 10 λεπτά και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2,5 ml

ρυθμιστικού διαλύματος P1. Ακολουθεί προσθήκη 5 ml διαλύματος NaOH/SDS, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 5 ml 3 M ψυχρού KOAc, τοποθέτηση στον πάγο για 10 λεπτά, και φυγοκέντρηση στους 4°C στις 9.000 σ.α.λ. (Beckmann JA20) για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου corex και προστίθενται 8 ml ισοπροπανόλης. Αφού αφεθεί τουλάχιστον 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται εκ νέου στους 4° C στις 9.000 σ.α.λ. (Beckmann κεφαλή JA20) για 20 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500 μl TE/EDTA/SDS (11 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0,5 (w/v) SDS, pH8,0), γίνεται προσθήκη 200 μg RNaseA και επώαση στους 65°C για 30 λεπτά. Με το τέλος της επώασης ακολουθεί προσθήκη 500 μl διαλύματος PEG (13% (w/v) PEG 8000, 1,6 M NaCl), με έντονη ανάδευση, και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα τέλος επαναδιαλύεται σε 500 μl TE.

Ένα τελευταίο βήμα αποτελεί ο καθαρισμός του διαλύματος με τη βοήθεια της εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο και καταβύθιση με αιθανόλη. Γίνεται προσθήκη 400 μl φαινόλης /χλωροφόρμιου (1:1) και έντονη ανάδευση (vortex) για τη δημιουργία ομοιογενούς γαλακτώματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά και λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση, στην οποία προστίθενται 400 μl χλωροφορμίου και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά, λαμβάνεται με προσοχή η υπερκείμενη υδατική φάση (περίπου 350-400 μl) και γίνεται προσθήκη 40 μl NaOAc (3 M, pH5,2) και 1.000 μl κρύας αιθανόλης (100%). Το μείγμα αναμιγνύεται με ανατάραξη και τοποθετείται στους -20°C για περισσότερο από 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο με 1 ml αιθανόλης (70%). Μετά από φυγοκέντρηση, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και επαναδιαλύεται σε 100 μl TE.

B5.3 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία πλασμιδιακών φορέων και ενθεμάτων

Για την υποκλωνοποίηση του cDNA της hnRNP A2 και του cDNA του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης hnRNP A3, από τα πλασμίδια στα οποία βρίσκονται στα οχήματα έκφρασης pGEX4T2 και pGEX4T3 αντίστοιχα, γίνεται αποκοπή των ενθεμάτων από τα οχήματα έκφρασης με ενζυμική πέψη. Γενικώς, χρησιμοποιούνται 15 μl πλασμιδιακού DNA και 1 με 2 μl (10-40 Units)

περιοριστικού ενζύμου σε αντίδραση τελικού όγκου 30 μ l, ενώ η πέψη διεξάγεται στους 37°C για παραπάνω από 5 ώρες. Για την έκτμηση του cDNA της hnRNP A2 από το πλασμίδιο pHCA2 γίνεται τριπλή πέψη με τα ένζυμα EcoRI, XmnI και BglII. Για την έκτμηση του cDNA της hnRNP A3Ct από το πλασμίδιο pmBx γίνεται πέψη με το ένζυμο HaiIII.

Για την προετοιμασία των πλασμιδίων pGEX4T2 και pGEX4T3, ώστε να δεχθούν τα ενθέματα, γίνεται πέψη με τα ένζυμα SmaI, BamHI και SmaI αντίστοιχα. Μετά την πέψη ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να διαχωριστούν οι γραμμικοί πλέον φορείς έκφρασης καθώς και τα ενθέματα. Η επανάκτηση του DNA από το πήκτωμα περιγράφεται παρακάτω.

B5.4 Εκχύλιση DNA από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

Η εκχύλιση του ηλεκτροφορημένου DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και ο καθαρισμός του, γίνεται με τη χρήση της τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων QIAquick Gel Extraction Kit της εταιρίας Qiagen ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Αποκοπή τεμαχίου πηκτώματος αγαρόζης που περιέχει το επιθυμητό DNA, προσδιορισμός του βάρους (ανώτατο όριο τα 400 mg), προσθήκη 3 όγκων ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (QG) για κάθε όγκο αποκομμένου τεμαχίου και επώαση στους 50°C για 10 λεπτά με περιοδική έντονη ανακίνηση (vortex).

Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, τοποθέτηση του δείγματος στην ειδική στήλη QIAquick spin column, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απόρριψη του διερχόμενου από τη στήλη υγρού (που περιέχει τη διαλυτοποιημένη αγαρόζη).

Έκπλυση της στήλης με 0,75 ml διαλύματος (PE), φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απόρριψη του διερχόμενου από τη στήλη υγρού.

Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής 1,5 ml όπου ακολουθεί η έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA, με προσθήκη 50 μ l ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

B5.5 Ενζυμικές πέψεις- έλεγχος των κατασκευών

Για τον αρχικό έλεγχο της ακεραιότητας των πλασμιδίων καθώς και για την ταυτοποίηση θετικής αντίδρασης ένθεσης του σωστού τμήματος DNA στο πλασμίδιο εισαγωγής -με το σωστό προσανατολισμό- χρησιμοποιούνται 5 μl πλασμιδιακού DNA αν προέρχεται από μικρής κλίμακας απομόνωση, ή 2 μl αν προέρχεται από μεσαίας κλίμακας, 1 μl 10x κατάλληλου για το ένζυμο ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο παρέχεται μαζί με το ένζυμο, και 0,5 μl (5-10 Units) από κάθε ένζυμο σε τελικό όγκο 10 μl. Η επώαση στους 37°C πραγματοποιείται για μία ώρα.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση σωστής εισαγωγής του cDNA της hnRNP A2 στο φορέα pGEX4T2 είναι τα BamHI και XhoI, ενώ τα ένζυμα για την ταυτοποίηση σωστής εισαγωγής του cDNA του καρβοξυτελικού άκρου της hnRNP A3 στο φορέα pGEX4T3 είναι τα EcoRI και PstI. Ακολουθεί ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης.

B5.6 Αντίδραση προσθήκης ενθεμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς (αντίδραση λιγάσης)

Οι γραμμικοί (έπειτα από ενζυμική πέψη) πλασμιδιακοί φορείς pGEX4T2 και pGEX4T3 συνδυάζονται σε αναλογία περίπου 1:3 με τα αντίστοιχα ενθέματα και με την προσθήκη 350 U T4 λιγάσης (Takara) και του ανάλογου ρυθμιστικού διαλύματος (10x T4 DNA ligase buffer: 660 mM Tris-HCl pH7,6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP), επωάζονται για 12-14 ώρες στους 16°C προκειμένου να ολοκληρωθούν οι κατασκευές. Η απενεργοποίηση του ενζύμου γίνεται με θέρμανση στους 56°C για 1 ώρα και τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης αποθηκεύονται στους -20°C.

B5.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων

B5.7.1 Παρασκευή επιδεκτικών E. Coli

Για την παρασκευή επιδεκτικών βακτηρίων *E. Coli*, καλλιέργειες των στελεχών XL1Blue (στέλεχος κλωνοποίησης), BL21(DE3) (στέλεχος έκφρασης) και ROSETTA2 (στέλεχος έκφρασης) υπόκεινται σε κατεργασία με διαλύματα CaCl₂ και MnCl₂.

Πιο συγκεκριμένα, 250 ml LB εμβολιάζονται με το επιθυμητό στέλεχος βακτηρίων σε κωνική φιάλη 2 L και επωάζονται στους 18°C με ανάδευση ~200 σ.α.λ. μέχρι η οπτική τους πυκνότητα OD₆₀₀ να φτάσει το 0,6. Μετά από παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά, τα βακτήρια φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο Beckman (J2-21) στις 2.500 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 80 ml διαλύματος TB (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH6,7) και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και νέα φυγοκέντρωση. Τέλος το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται με ήπιες κινήσεις σε 20 ml TB και προστίθεται DMSO σε τελική συγκέντρωση 7%. Το βακτηριακό εναιώρημα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά, κατανέμεται σε ίσες ποσότητες των 0,2 ml και ψύχεται σε υγρό άζωτο. Η αποθήκευση γίνεται στους -80° C.

B5.7.2 Μετασηματισμός επιδεικτικών E.coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές

Σε 200 μl εναιωρήματος επιδεικτικών κυττάρων προστίθεται 1 μl από το διάλυμα των αντιδράσεων λιγάσης ή από το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA. Το μίγμα αφήνεται για 30 λεπτά στον πάγο, στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 1 λεπτό (θερμικό shock) και άμεσα τοποθετείται στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 1 ml LB και επώαση στους 37°C για 1 ώρα, ώστε τα βακτήρια να συνέλθουν από την καταπόνηση. Μετά από ελαφριά φυγοκέντρωση (~3.000 σ.α.λ.) αφαιρείται το πλεονάζον υγρό και τα βακτήρια επαναδιαλύονται σε ποσότητα 150-200 μl με ήπιες κινήσεις. Το βακτηριακό εναιώρημα απλώνεται σε τριβλίο Petri με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό, σε όσο το δυνατό στείρες συνθήκες, και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για περισσότερο από 12 ώρες όπου και γίνεται έλεγχος για την ύπαρξη αποικιών.

B6. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP σε σύντηξη με GST

B6.1 Καλλιέργεια βακτηρίων και επαγωγή της έκφρασης

Το στέλεχος που επιλέχθηκε για την έκφραση της hnRNP A3Ct είναι το BL21 (DE3) και το στέλεχος για την έκφραση της hnRNP A2 το ROSETTA2 (DE3).

Μια απομονωμένη αποικία, από τα βακτήρια που έχουν μετασηματισθεί με το αντίστοιχο όχημα, εμβολιάζεται σε 50 ml θρεπτικό υλικό LB που φέρει το κατάλληλο για το πλασμίδιο αντιβιοτικό και επωάζεται στους 30°C για περίπου 12-14 ώρες με ανάδευση στις 200 σ.α.λ. Το αντιβιοτικό για την περίπτωση της ανασυνδυασμένης hnRNP A3Ct είναι αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 100 µg/ml) και για την περίπτωση της ανασυνδυασμένης hnRNP A2 είναι αμπικιλίνη (100 µg/ml) και χλωραμφενικόλη (τελική συγκέντρωση 34 µg/ml), καθώς το στέλεχος ROSETTA2 περιέχει ένα επιπλέον πλασμίδιο. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2.500 σ.α.λ. για 10 λεπτά και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml LB.

5 ml από το βακτηριακό διάλυμα εμβολιάζονται σε 1 L LB που φέρει τα κατάλληλα αντιβιοτικά, σε κωνική φιάλη 3 λίτρων. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με ανάδευση, έως ότου τα βακτήρια αρχίσουν να αναπτύσσονται εκθετικά και μέχρι η πυκνότητα τους, που μετράται φασματοφωτομετρικά, να φτάσει το 0,6 (οπτική απορρόφηση) σε μήκος κύματος 600 nm ($OD_{600} = 0,6$) (U-2000 spectrophotometer, Hitachi). Στη συνέχεια η καλλιέργεια ψύχεται μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, και ακολουθεί η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με την προσθήκη IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM, με ανάδευση για 12-14 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 10 λεπτά στις 5.000 σ.α.λ., στους 4°C (φυγόκεντρος J2-21, κεφαλή JA-10, Beckman).

Το βακτηριακό ίζημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C ή να υποστεί άμεση λύση για την εκχύλιση των πρωτεϊνών.

B6.2 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το βακτηριακό ίζημα

Όλες οι διεργασίες σε αυτό το στάδιο διεξάγονται στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS-T (PBS και 10% Triton x 100) και προστίθενται EDTA, PMSF και DTT σε τελική συγκέντρωση 1 mM το κάθε ένα. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με τη χρήση υπερήχων (4 παλμοί των 20 δευτερολέπτων) με διαστήματα 1 λεπτού μεταξύ των παλμών ώστε να επανέλθει η θερμοκρασία σε χαμηλά επίπεδα (το διάλυμα παραμένει σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας). Μετά τον 1ο και 3ο παλμό προστίθεται στο διάλυμα νέο PMSF (1 mM) για την αναστολή της δράσης των πρωτεασών που απελευθερώνονται με τη λύση των κυττάρων. Με το πέρας της λύσης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις

10.000 σ.α.λ. στους 4°C για 10 λεπτά. Εάν το υπερκείμενο διάλυμα δεν είναι διαυγές ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -20°C.

B6.3 Δέσμευση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης

Οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες που το αμινοτελικό άκρο τους είναι συντηγμένο με την πρωτεΐνη GST, μπορούν να δεσμευθούν σε σφαιρίδια αγαρόζης στα οποία έχουν προσδεθεί ομοιοπολικά μόρια γλουταθειόνης, με γνωστή υψηλή συγγένεια για την GST. Τα σφαιρίδια (Sigma) αρχικά διογκώνονται σε d.d. H₂O και ξεπλένονται με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος PBS, ενώ αποθηκεύονται στους 4°C σε διάλυμα 2 M NaCl σε αναλογία 1:1 (50% εναιώρημα) με την προσθήκη NaN₃.

Για τη δέσμευση των πρωτεϊνών, 500 μl σφαιριδίων εξισορροπούνται σε περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος PBS-T τουλάχιστον 2 φορές (με ήπιες, στις 2.000-3.000 σ.α.λ., σύντομες φυγοκεντρήσεις για καταβύθιση των σφαιριδίων). Ακολουθεί η προσθήκη του πρωτεϊνικού διαλύματος που προέρχεται από τη λύση των βακτηρίων και επώαση για 1 ώρα στους 4°C με αργή ανακίνηση. Μετά από φυγοκέντρωση για απομάκρυνση του πρωτεϊνικού διαλύματος, τα σφαιρίδια ξεπλένονται με περίσσεια κρύου PBS 5 φορές για περίπου 10 λεπτά, και τέλος αποθηκεύονται στους 4°C με τη προσθήκη ίσου όγκου PBS και 1 mM NaN₃.

B6.4 Έκλυση

Στην περίπτωση που είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες αποδεσμευμένες από τα σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης, γίνεται έκλυση σε περίσσεια διαλύματος γλουταθειόνης. Γίνεται έκπλυση 100 μl σφαιριδίων (50% εναιώρημα), που φέρουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (50 mM Tris-HCl pH8,0 , 150 mM NaCl) για 2 φορές, και ανάμιξη με 300 μl διαλύματος γλουταθειόνης (50 mM Tris-HCl pH8,0 , 150 mM NaCl, 20 mM γλουταθειόνη, pH ~7,6) και ήπια αναδύση για περίπου 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για ένα λεπτό στις 4.000 σ.α.λ. και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος που φέρει τις εκλουσμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί με προσθήκη εκ νέου 300 μl διαλύματος γλουταθειόνης. Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα SDS-PAGE

και ταυτοποιείται η παρουσία τους με χρώση Coomassie Brilliant Blue R250. Αποθηκεύονται στους -20°C .

B7. Πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης (Pull-down)

Για τον έλεγχο της ικανότητας διασύνδεσης των πρωτεϊνών hnRNP A3 και A2 με άλλες πρωτεΐνες, και τον χαρακτηρισμό αυτών των αλληλεπιδράσεων, γίνεται εφαρμογή της πειραματικής προσέγγισης της πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull down) μέσω των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκφράστηκαν, απομονώθηκαν και δέθηκαν σε σφαιρίδια αγαρόζης. Η μελέτη πραγματοποιείται σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα – πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά - από κυτταρικές σειρές (HeLa, Novikoff και A549) με την ακόλουθη διαδικασία:

Στάδιο 1) Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα, στην περίπτωση που έχουν αποθηκευτεί στους -80°C , φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στους 4°C σε μέγιστη ταχύτητα για απομάκρυνση συσσωματωμάτων που οφείλονται στην ψύξη. Το υπερκείμενο επωάζεται με σφαιρίδια αγαρόζης – γλουταθειόνης (50 μl /1,5 ml εκχυλίσματος) στους 4°C με ανακίνηση για 30 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δένουν μη ειδικά πάνω στα σφαιρίδια. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για καταβύθιση των σφαιριδίων αγαρόζης και φύλαξη του υπερκείμενου στον πάγο, ενώ το ίζημα απορρίπτεται. Στην περίπτωση που διερευνάται το κατά πόσο οι παρατηρούμενες διασυνδέσεις οφείλονται στην παρουσία RNA στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ένα επιπλέον στάδιο προετοιμασίας του εκχυλίσματος περιλαμβάνει την επώαση με RNάση A (~50 μg /αντίδραση) στους 30°C για 15 λεπτά.

Στάδιο 2) Προετοιμασία σφαιριδίων αγαρόζης που φέρουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

Τα σφαιρίδια που φέρουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και χρησιμοποιούνται για την καταβύθιση, εξισορροπούνται σε περίσσεια διαλύματος NET-2 (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% NP-40). Η ποσότητα των

σφαιριδίων που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, κρίνεται μετά από ανάλυση τους σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, είτε με χρώση Coomassie είτε με ανοσοαποτύπωση, και λαμβάνεται ίδιος όγκος σφαιριδίων (για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ξεχωριστά) για κάθε αντίδραση μέσα στο ίδιο πείραμα. Ο τελικός όγκος σφαιριδίων που χρησιμοποιείται ανά αντίδραση (μετά την προσθήκη σφαιριδίων αγαρόζης-γλουταθειόνης για δημιουργία ορατού αποτελέσματος όπου χρειάζεται) είναι 25 μ l.

Στάδιο 3) Επώαση κυτταρικών εκχυλισμάτων με τα σφαιρίδια

Στα σφαιρίδια αγαρόζης-πρωτεΐνης γίνεται προσθήκη εκχυλίσματος πρωτεϊνών (τελικού όγκου 500 μ l) και επώαση στους 4°C με ανακίνηση για 1,5 ώρα. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση σε χαμηλή ταχύτητα και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Τα σφαιρίδια ξεπλένονται 4 φορές με περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος NET-2 ή NET-2 συμπληρωμένου με 300 mM NaCl στην περίπτωση που εξετάζεται η επίδραση της αλατότητας του διαλύματος στις διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Τέλος, για να αναλυθούν οι πρωτεΐνες σε πήκτωμα SDS-PAGE, προστίθεται αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer).

B8. Παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης hnRNP A3

Για την παρασκευή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3 χρησιμοποιείται ως ανοσογόνο υλικό η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3, η οποία ηλεκτοφορείται σε πήκτωμα SDS/PAGE και εντοπίζεται με χρώση Coomassie blue. Το τμήμα του πηκτώματος που φέρει την πρωτεΐνη αποκόβεται, κονιορτοποιείται με τη βοήθεια υγρού αζώτου και επαναδιαλύεται σε PBS. Με αυτόν τον τρόπο προετοιμασίας και καθαρισμού, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε αποδιαταγμένη μορφή και απελευθερώνεται σταδιακά από την πολυακρυλαμίδα, η οποία δρά και ως ανοσοενισχυτικό. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης είναι προσαρμογή των πρωτοκόλλων που περιέχονται στο βιβλίο “Antibodies, a laboratory manual” [335].

Το σχήμα ανοσοποίησης που ακολουθείται έχει ως εξής: Γίνεται ανοσοποίηση σε τρία κουνέλια ηλικίας 12 εβδομάδων. Πριν την πρώτη ένεση με ανοσογόνο υλικό γίνεται δοκιμαστική αιμοληψία στα ζώα (ορός ελέγχου). Το ανοσογόνο υλικό

αναμιγνύεται με ίσο όγκο (1:1) από πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Sigma) και ενίεται ενδομυϊκά σε τρία διαφορετικά σημεία στα ζώα. Γίνεται επανάληψη της διαδικασίας σε 3 και 6 εβδομάδες μετά την πρώτη ένεση, αλλά το ανοσογόνο υλικό αναμιγνύεται με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Sigma). Δέκα ημέρες μετά την τρίτη ένεση γίνεται έλεγχος για την ανοσοαπόκριση των ζώων με δοκιμαστική αιμοληψία και δοκιμή του ορού με ανοσοαποτύπωση.

Από τα 3 κουνέλια στα οποία εφαρμόστηκε το παραπάνω σχήμα ανοσοποίησης, αντέδρασε θετικά μόνο το ένα. Στο ζώο που ανταποκρίθηκε στην ανοσοποίηση γίνεται τέταρτη ένεση (boost) περίπου 20 ημέρες μετά, με επανάληψη της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τις δύο τελευταίες ανοσοποιήσεις. Μετά την παρέλευση 10 ημερών το ζώο αφαιμάζεται και το αίμα που συλλέγεται παραμένει 1 ώρα στους 37°C και 17 ώρες στους 4°C ώστε να πραγματοποιηθεί η πήξη του. Κατόπιν συλλέγεται ο ορός με φυγοκέντρηση στα 10.000 x g για 10 λεπτά στους 4°C, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C ή στους 4°C παρουσία 0,03% NaN₃.

B8.1 Καθαρισμός αντισώματος μέσω ανοσοσυγγένειας

Λόγω της παρουσίας μη ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ανοσοποιημένου ζώου, κρίνεται αναγκαία η απομόνωση των ειδικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου. Για την περίπτωση της απομόνωσης των ειδικών αντισωμάτων έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης hnRNP A3 από τον ορό του ανοσοποιημένου κουνελιού, ακολουθήθηκε η διαδικασία του καθαρισμού μέσω ανοσοσυγγένειας, με τα εξής στάδια:

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του ανοσοποιημένου ορού. Μετά την απόψυξη, 2 ml ορού φυγοκεντρώνται για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος στα 6,500 x g για 10 λεπτά στους 4°C, και στο υπερκείμενο προστίθεται 1 ml PBS (18,5 mM NaH₂PO₄·H₂O, 80 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4) και κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου (NH₄)₂SO₄ σε τελική συγκέντρωση 50%. Το διάλυμα αναδεύεται στον πάγο για περίπου 6 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6.500 x g για 10 λεπτά στους 4°C, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml PBS και υπόκειται σε διαπίδυση έναντι PBS (3 αλλαγές) κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κατόπιν φυγοκεντρείται εκ νέου για απομάκρυνση τυχόν ιζήματος.

Επόμενο στάδιο είναι η προετοιμασία του υλικού πρόσδεσης των αντισωμάτων. Το υλικό που περιέχει το αντιγόνο, δηλαδή σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης με GST-hnRNPA3Ct, αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS/PAGE και μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αφού γίνει ο εντοπισμός της θέσης του αντιγόνου με αντιστρεπτή χρώση Ponceau S, ακολουθεί αποκοπή της λωρίδας της μεμβράνης στη θέση αυτή, και τεμαχισμός σε μικρά θραύσματα τα οποία τοποθετούνται σε σωληνάρια τύπου falcon. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης δεσμεύονται με διάλυμα 3% BSA σε TBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Ακολουθεί ξέπλυμα των θραυσμάτων της μεμβράνης με TBS για 2 λεπτά, από 2 φορές.

Το τελευταίο στάδιο είναι η πρόσδεση των αντισωμάτων του ορού στο αντιγονικό υλικό και η έκλουσή τους από αυτό. Ο ορός που ελήφθη από το ανοσοποιημένο κουνέλι αραιώνεται σε TBS (2 ml ορού σε 8 ml TBS) και ακολουθεί επώαση με τα θραύσματα της μεμβράνης για ~3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν ο ορός απομακρύνεται και η μεμβράνη ξεπλένεται 2 φορές με TBS για 5 λεπτά και 2 φορές με PBS. Ακολουθεί έκλυση των αντισωμάτων με έντονη ανακίνηση σε 1 ml διαλύματος γλυκίνης (0,1 M, pH 2,5) για περίπου 5 λεπτά. Το διάλυμα γλυκίνης αντισωμάτων μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο το οποίο περιέχει 100 μl 1 M Tris (pH 8,0) για εξουδετέρωση του χαμηλού pH και γίνεται προσθήκη 1 mg/ml BSA για σταθεροποίηση των αντισωμάτων.

B8.2 Χρωματογραφία συγγένειας με χρήση κυτταρίνης-ssDNA

Για τον εμπλουτισμό πρωτεϊνικού υλικού από εκχύλισμα κυττάρων Novikoff σε RBPs (RNA Bindins Proteins), χρησιμοποιείται η τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας με χρήση σφαιριδίων κυτταρίνης-ssDNA, λόγω της ιδιότητας των πρωτεϊνών αυτών να προσδένουν σε μονόκλωνο DNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

Αρχικά γίνεται προετοιμασία των σφαιριδίων κυτταρίνης-ssDNA και του κυτταρικού εκχυλίσματος. Τα σφαιρίδια (100 mg σφαιριδίων/10⁹ κύτταρα) εμβαπτίζονται σε διάλυμα BP-100 (50 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, 100 mM NaCl) -σε συγκέντρωση 1 ml διαλύματος/10 mg σφαιριδίων- και επωάζονται για όλη τη νύχτα στους 4°C με ήπια ανακίνηση. Κατόπιν ξεπλένονται 3 φορές με περίσσεια

διαλύματος BP-100 (~10ml), με φυγοκεντρήσεις για 1 λεπτό στις 3.000 σ.α.λ. στους 4°C. Το κυτταρικό εκχύλισμα υπόκειται σε φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά στους 4°C για απομάκρυνση συσσωματωμάτων που οφείλονται στην ψύξη. Ακολουθεί απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων με χρήση μικροκοκκικής νουκλεάσης (0,5 mM PMSF, 1 mM CaCl₂, 10 μl/ml μίγμα αναστολέων πρωτεασών, 5 U/ml μικροκοκκική νουκλεάση) για 25 λεπτά στους 30°C. Η αντίδραση αναστέλλεται με την προσθήκη 2,5 mM EGTA και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά στους 4°C.

Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρεται για επώαση με τα σφαιρίδια κυτταρίνης-ssDNA για 30 λεπτά στους 4°C με ήπια ανακίνηση. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση στις 2.000 σ.α.λ. για περίπου 1 λεπτό στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

Τέλος τα σφαιρίδια ξεπλένονται 5 φορές με διάλυμα BP-100 για περίπου 5 λεπτά την κάθε φορά και ακολουθεί η έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με επώαση σε διάλυμα BP-2 (50 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, 2 M NaCl) για μερικά λεπτά με ανατάραξη, και φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθούν τα σφαιρίδια.

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα: 0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄, pH7,4

Γ. Αποτελέσματα

Γ. Αποτελέσματα

Γ1. Μοριακός χαρακτηρισμός της απορύθμισης στην έκφραση πρωτεϊνών hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα

Γ1.1 Μελέτη των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα μη μικροκυτταρικού τύπου (ΜΜΚΠ)

Η μελέτη των προτύπων έκφρασης μιας ομάδας πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης RNA (RBP) στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, αφορά τις πρωτεΐνες hnRNP τύπου A/B (hnRNP A1, A2/B1 και A3), και hnRNP K/J όπως και τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2, με γνωστή ανταγωνιστική δράση στο εναλλακτικό μάτισμα έναντι των πρωτεϊνών hnRNP A/B. Η μελέτη αυτή στηρίχθηκε στην ανάλυση ολικών εκχυλισμάτων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western Blot), σε κυτταρικά συστήματα, και κατά κύριο λόγο, σε ζεύγη βιοψιών καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του πνεύμονα από τον ίδιο ασθενή.

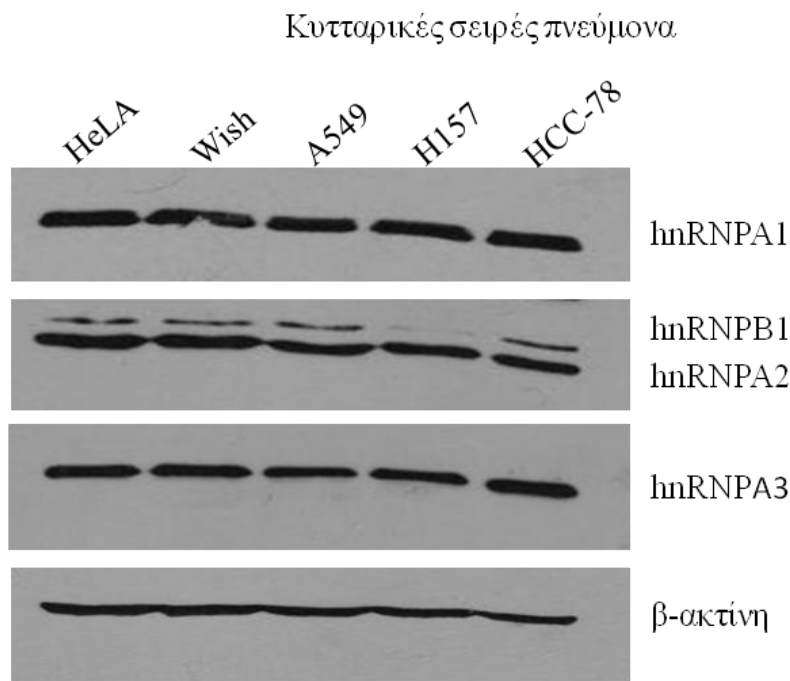
Γ1.1.1 Κυτταρικά συστήματα

Η πρώτη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε σε ολικά εκχυλίσματα κυτταρικών σειρών επιθηλιακού τύπου και αποσκοπούσε στον έλεγχο των ανοσοχημικών αντιδράσεων για ταυτοποίηση πρωτεϊνών hnRNP. Έγινε άμεση σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B μεταξύ τριών καρκινικών σειρών προέλευσης ανθρώπινου πνεύμονα που περιελάμβαναν κύτταρα A549 (αδενοκαρκίνωμα), HCC-78 (αδενοκαρκίνωμα) και NCI-H157 (αδενοκαρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου). Στην ανάλυση συμπεριελήφθη και η κυτταρική σειρά HeLa (καρκίνωμα τραχήλου μήτρας), γνωστή σειρά αναφοράς, όπως επίσης και η προ-καρκινική κυτταρική σειρά Wish, αμνιοτικής προέλευσης.

Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχος αριθμός κυττάρων από κάθε κυτταρική σειρά, για τη δημιουργία ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Παράλληλα με την ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών hnRNP χρησιμοποιήθηκαν και αντισώματα κατά της πρωτεΐνης β-ακτίνη ως πρωτεΐνη αναφοράς. Όπως φάνηκε στο ανοσοαποτύπωμα (Εικόνα 11), τα επίπεδα έκφρασης

των πρωτεϊνών hnRNP A1, A2/B1 και A3 δε διαφοροποιούνται μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών και της προ-καρκινικής σειράς wish. Μικρή διαφοροποίηση παρουσίασε στη σειρά H157 η ισομορφή B1 της πρωτεΐνης A2/B1 με συγκριτικά χαμηλά επίπεδα. Τα σχετικά υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP σε καρκινικές και προ-καρκινικές κυτταρικές σειρές οφείλονται πιθανά στον έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς είναι γνωστή η σύνδεση της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP τόσο με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου [286].

Η δυσκολία τόσο στη διαθεσιμότητα όσο και στην καλλιέργεια μιας πρωτογενούς μη-καρκινικής σειράς του πνεύμονα, για άμεση σύγκριση με της καρκινικές σειρές, και η διασύνδεση της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μας απέτρεψε από την ευρεία εφαρμογή των κυτταρικών συστημάτων στη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP κατά την καρκινική εξαλλαγή στον άνθρωπο. Σαν αποτέλεσμα, η χρήση των κυτταρικών σειρών περιορίστηκε στον έλεγχο και αντιπαραβολή των πειραματικών προσεγγίσεων με υλικό προερχόμενο από πνευμονικό ιστό.



Εικόνα 11 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυτταρικών σειρών που αναγράφονται, με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών hnRNP A1, A2/B1 και A3, καθώς και β-ακτίνης ως εσωτερικό δείκτη για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE (πήκτωμα 10%).

Γ1.1.2 Ζεύγη βιοψιών καρκινικού/φυσιολογικού ιστού από ασθενείς με ΜΜΚΠ

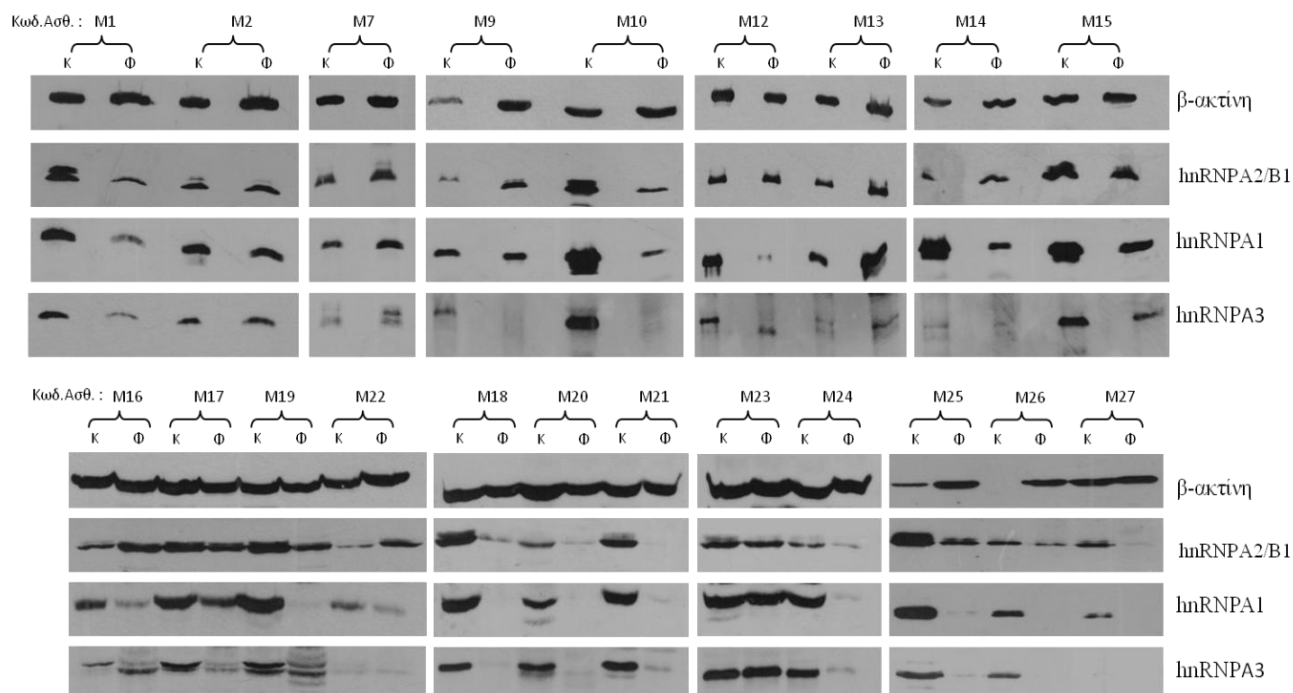
Εξετάστηκαν συνολικά 21 ασθενείς με ΜΜΚΠ, σε αντίστοιχα ζεύγη βιοψιών καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Οι βιοψίες προήλθαν από το νοσοκομείο Μεταξά (συνεργασία με τον Δρ. Χ. Βαλαβάνη στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ) από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1, στο σύνολο των βιοψιών αντιστοιχούσαν 6 αδenoκαρκινώματα, 9 καρκινώματα εκ πλακώδους επιθηλίου, 2 μεγαλοκυτταρικά και 5 μεικτού τύπου. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 54 έως 78 χρόνια, με μέση ηλικία τα 66. Όσον αφορά το φύλο, 18 ήταν άντρες και 3 γυναίκες. Η διαφοροποίηση των καρκινικών ιστών ήταν ενδιάμεσου ή χαμηλού βαθμού, ενώ εμφάνιση πλευρικής διήθησης παρουσίασε σχεδόν ο μισός αριθμός των ασθενών.

A/A Ασθενών	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΙΣΤΙΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ
M1	A	66	Αδενοκαρκίνωμα	Χαμηλή	ΛΙΓΑ	ΟΧΙ
M2	A	57	Αδενοκ/Βρογχοκυψελ.	Ενδιάμεση	ΝΑΙ	ΟΧΙ
M7	A	54	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση	ΝΑΙ	ΟΧΙ
M9	A	63	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση	ΛΙΓΑ	ΝΑΙ
M10	A	57	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση/Χαμηλή	ΛΙΓΑ	ΝΑΙ
M12	A	65	Μεγαλοκυτταρικό	Χαμηλή	ΛΙΓΑ	ΟΧΙ
M13	A	67	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση/Χαμηλή	ΝΑΙ	ΟΧΙ
M14	A	69	Μεγαλοκυτταρικό	Χαμηλή	ΛΙΓΑ	ΝΑΙ
M15	Θ	55	Μεικτό-Αδενοκ/Πλακ	Χαμηλή	ΛΙΓΑ	ΝΑΙ
M16	Θ	76	Αδενοκαρκίνωμα	Ενδιάμεση	ΛΙΓΑ	ΝΑΙ
M17	A	60	Αδενοκαρκίνωμα	Ενδιάμεση	ΛΙΓΑ	ΟΧΙ
M18	A	75	Μεγαλοκυτ/Αδενοκ	Χαμηλή	ΟΧΙ	ΟΧΙ
M19	Θ	55	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση/Χαμηλή	ΟΧΙ	ΝΑΙ
M20	A	74	Μεικτό-Αδενοκ/Πλακ	Χαμηλή	ΟΧΙ	ΟΧΙ
M21	A	70	Αδενοκαρκίνωμα	Χαμηλή	ΟΧΙ	ΝΑΙ
M22	A	71	Αδενοκαρκίνωμα	Χαμηλή	ΝΑΙ	ΟΧΙ
M23	A	78	Πλακώδους επιθ.	Χαμηλή	ΝΑΙ	ΟΧΙ
M24	A	72	Πλακώδους επιθ.	Ενδιάμεση	ΟΧΙ	ΝΑΙ
M25	A	60	Αδενοκαρκίνωμα	Χαμηλή	Μ/Δ	Μ/Δ
M26	A	62	Πλακώδους επιθ.	Χαμηλή	Μ/Δ	Μ/Δ
M27	A	58	Πλακώδους επιθ.	Χαμηλή	Μ/Δ	Μ/Δ

Πίνακας 1 Κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη A:Άρρεν Θ:Θήλυ (Μ/Δ: Μη Διαθέσιμο στοιχείο)

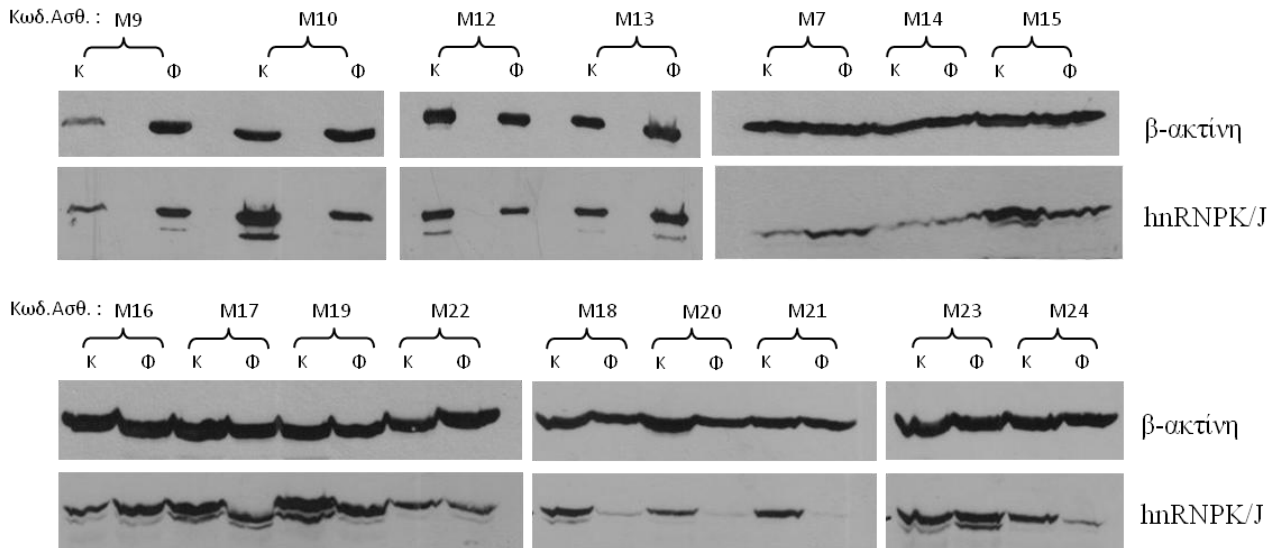
Στο επίπεδο της σύγκρισης βιοπτικού υλικού από τον πνεύμονα ασθενών με ΜΜΚΠ, πραγματοποιήθηκε ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων των hnRNP A/B από τον καρκινικό ιστό σε άμεση αναφορά με παρακείμενο, φαινομενικά υγιή ιστό, από τον ίδιο ασθενή. Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B (A1, A2/B1, A3) καθώς και της β-ακτίνης στο σύνολο των 21 ασθενών. Όπως φαίνεται στην εικόνα, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου

ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP στον καρκινικό ιστό σε αντιδιαστολή με χαμηλά επίπεδα στο φυσιολογικό (λχ. M18, M26 για hnRNP A1), αλλά και περιπτώσεις με παραπλήσια ή και ακόμη υψηλότερα επίπεδα στις φυσιολογικές θέσεις των βιοψιών έναντι των καρκινικών (M23 για hnRNP A1 και hnRNP A3, M16 για hnRNP A2/B1).

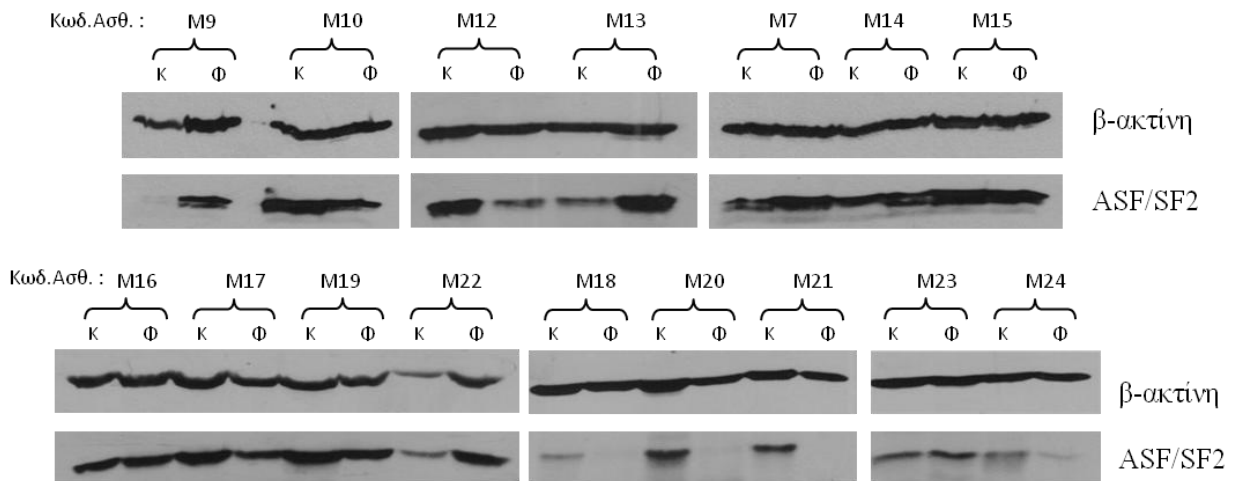


Εικόνα 12 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του συνόλου των βιοψιών (21 ζεύγη καρκινικού (K) και φυσιολογικού (Φ) ιστού) με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών hnRNP A1, A2/B1 και A3, καθώς και κατά της β-ακτίνης ως εσωτερικό δείκτη για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των hnRNP A/B προέκυψαν και με τον ανοσοχημικό προσδιορισμό των επιπέδων των συγγενικών μεταξύ τους hnRNP K και J (Εικόνα 13) όπως επίσης και για τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 (Εικόνα 14).



Εικόνα 13 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα βιοψιών (ζεύγη καρκινικού (K) και φυσιολογικού (Φ) ιστού) με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών hnrNP K/J, καθώς και της β-ακτίνης ως εσωτερικό δείκτη για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων.



Εικόνα 14 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα βιοψιών (ζεύγη καρκινικού (K) και φυσιολογικού (Φ) ιστού) με αντισώματα έναντι του παράγοντα ASF/SF2 και της β-ακτίνης ως εσωτερικό δείκτη για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνών hnrNP πραγματοποιήθηκε με την πυκνομέτρηση των χαρακτηριστικών, για κάθε αντιγονική πρωτεΐνη, ζωνών στο φιλμ αυτοραδιογραφίας, μετά από ψηφιοποίηση, με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, για την εξομάλυνση των διαφορών που οφείλονται σε πιθανές διαφορές στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης στο πήκτωμα SDS-PAGE, έγινε ως προς τα επίπεδα της β-

ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για κάθε υπό εξέταση δείγμα χωριστά. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ανάλυση των ζευγών των βιοψιών από τον ίδιο ασθενή έγινε πάντα στο ίδιο πήκτωμα. Ακολούθησε ο υπολογισμός της σχετικής (ως προς β-ακτίνη) έκφρασης κάθε πρωτεΐνης χωριστά, στον καρκινικό και στο φυσιολογικό ιστό. Τέλος, προσδιορίστηκε ο λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων του καρκινικού ως προς τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό στον ίδιο ασθενή για κάθε ζεύγος βιοψιών (λόγος K/Φ). Τα αποτελέσματα του υπολογισμού του λόγου K/Φ για όλες τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν, συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Επισημαίνεται ότι δεν επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ισομορφικών τύπων hnRNP A2 και B1 χωριστά, λόγο της μικρής διαφοράς μοριακού βάρους (38 και 40 kDa αντίστοιχα) και της γειννιάσής τους στα πηκτώματα SDS-PAGE (10%) στα οποία αναλύθηκαν. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των συγγενικών hnRNP K και J.

Κωδ. Ασθ.	hnRNP A1	hnRNP A2/B1	hnRNP A3	hnRNP K/J	ASF/SF2
M1	3,3	4,1	3,6	M/Δ	M/Δ
M2	1,6	1,3	1,1	M/Δ	M/Δ
M7	0,8	0,9	0,6	0,2	0,5
M9	8,3	0,8	19,2	1,6	0,06
M10	13,2	4,9	8,7	2,2	2,8
M12	9,2	0,8	1	1,3	1,6
M13	0,4	0,8	0,6	0,9	0,5
M14	2,9	1,2	1,4	0,6	0,7
M15	2,3	1,8	2	3	1,6
M16	2,5	0,4	0,7	0,6	0,9
M17	1,2	1	1,2	1,5	1,5
M18	30	4,3	17	6,8	6,8
M19	23,3	1,2	2,5	2	1,5
M20	21,5	2,2	27,8	6,2	19,1
M21	25,3	45,2	7,5	42,2	63,2
M22	3,1	0,6	1,9	1,4	0,9
M23	1	1	0,7	0,8	0,7
M24	21,3	4	8,7	3,4	4,5
M25	100	7,2	53,7	M/Δ	M/Δ
M26	206	8,8	348	M/Δ	M/Δ
M27	12,59	8,7	28,3	M/Δ	M/Δ

Πίνακας 2 Λόγος των σχετικών (ως προς β-ακτίνη) πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό εξέταση πρωτεϊνών hnRNP και ASF/SF2 στον καρκινικό ως προς τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του πνεύμονα, για κάθε ασθενή (Λόγος Κ/Φ). Μ/Δ: Μη Διαθέσιμη Τιμή

Για κάθε ασθενή, ο λόγος Κ/Φ λαμβάνεται ως ο βαθμός της απορύθμισης στην έκφραση της πρωτεΐνης που εξετάζεται μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού πνευμονικού ιστού. Κ/Φ=1 υποδηλώνει απουσία διαφοροποίησης στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αφού προσμετρώνται παρόμοια σχετικά επίπεδα στον καρκινικό και στο φυσιολογικό ιστό από τον ίδιο ασθενή. Τιμές μεγαλύτερες

της μονάδας χαρακτηρίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης (υπερέκφραση), ενώ τιμές μικρότερες της μονάδας μειωμένα επίπεδα έκφρασης (υποέκφραση) στην καρκινική έναντι της φυσιολογικής θέσης του ιστού. Σε μικρό αριθμό ασθενών προσμετρήθηκαν ακραίες διακυμάνσεις τιμών λόγω μη ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης στο φυσιολογικό ιστό, με αποτέλεσμα ο λόγος K/Φ να είναι πολύ υψηλός (K/Φ>100). Με την εξαίρεση των ακραίων αυτών τιμών, το εύρος της διακύμανσης των τιμών K/Φ που προσμετρήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Το μεγαλύτερο εύρος των αλλαγών αφορούσε την πρωτεΐνη hnRNP A1 και ακολούθως την A3, ενώ η πιο μελετημένη στον καρκίνο του πνεύμονα πρωτεΐνη hnRNP A2/B1 εμφάνισε μικρότερο εύρος στη διακύμανση των τιμών του λόγου K/Φ.

Αναφορικά με τα επίπεδα των πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε σαφής υπερέκφραση των hnRNP A/B στον καρκινικό ιστό έναντι του φυσιολογικού. Καθορίζοντας ως το κατώφλι αλλαγών στο λόγο K/Φ μεγαλύτερο από δύο φορές (>2x), δηλαδή τουλάχιστον διπλάσια έκφραση στον καρκινικό έναντι του φυσιολογικού ιστού, στον ίδιο ασθενή, τα ποσοστά της υπερέκφρασης κυμάνθηκαν από 76% για την hnRNP A1 σε 52% και 43% για τις hnRNP A3 και hnRNP A2, αντίστοιχα (Πίνακας 3).

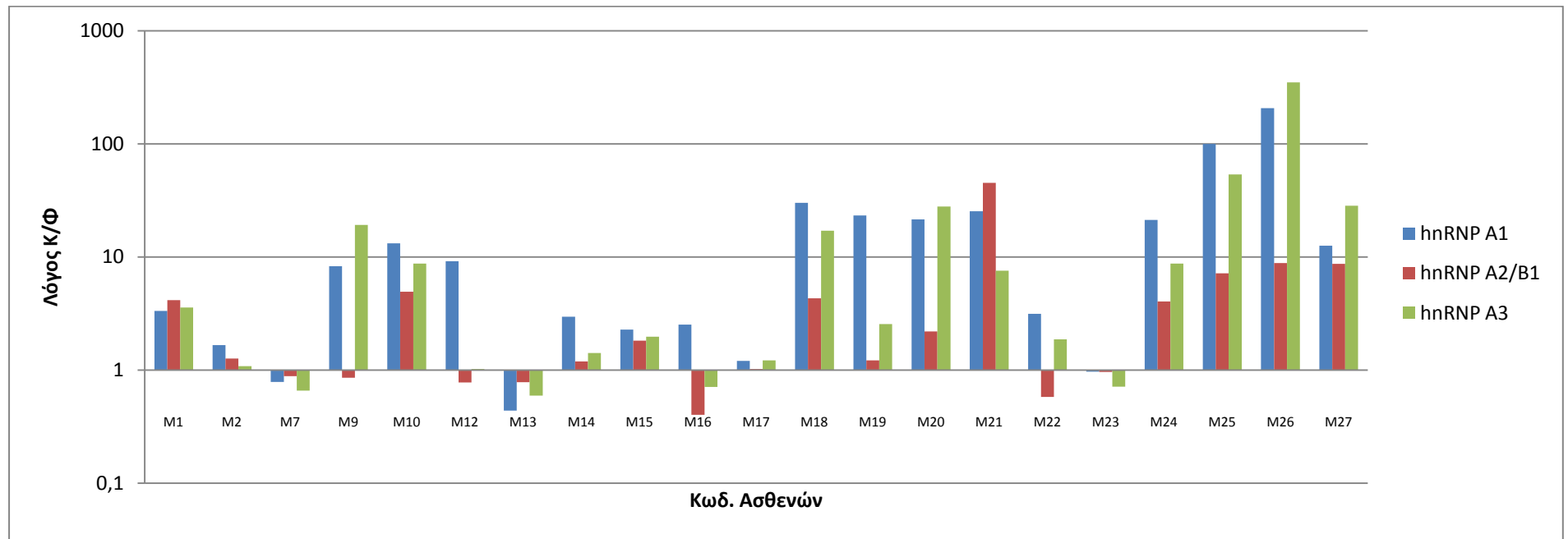
Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται η επικράτηση της hnRNP A1 έναντι της A2/B1 ως η πρωτεΐνη με την σημαντικότερη αλλαγή των επιπέδων έκφρασής στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα. Υπογραμμίζεται ότι όλες οι περιπτώσεις με υπερέκφραση της hnRNP A2 παρουσίασαν ταυτόχρονη υπερέκφραση των hnRNP A1 και A3. Για τις πρωτεΐνες hnRNP K/J και ASF/SF2 τα ποσοστά της υπερέκφρασης ήταν χαμηλότερα και προσέγγισαν το 38% και 31% αντίστοιχα (Πίνακας 3).

	hnRNP A1	hnRNP A2/B1	hnRNP A3	hnRNP K/J	ASF/SF2
Κατώφλι λόγου K/Φ >2	16/21	9/21	11/21	6/16	5/16
Ποσοστό υπερέκφρασης	76%	43%	52%	38%	31%

Πίνακας 3 Συχνότητα περιπτώσεων ασθενών με λόγο K/Φ>2 για τις υπό εξέταση πρωτεΐνες.

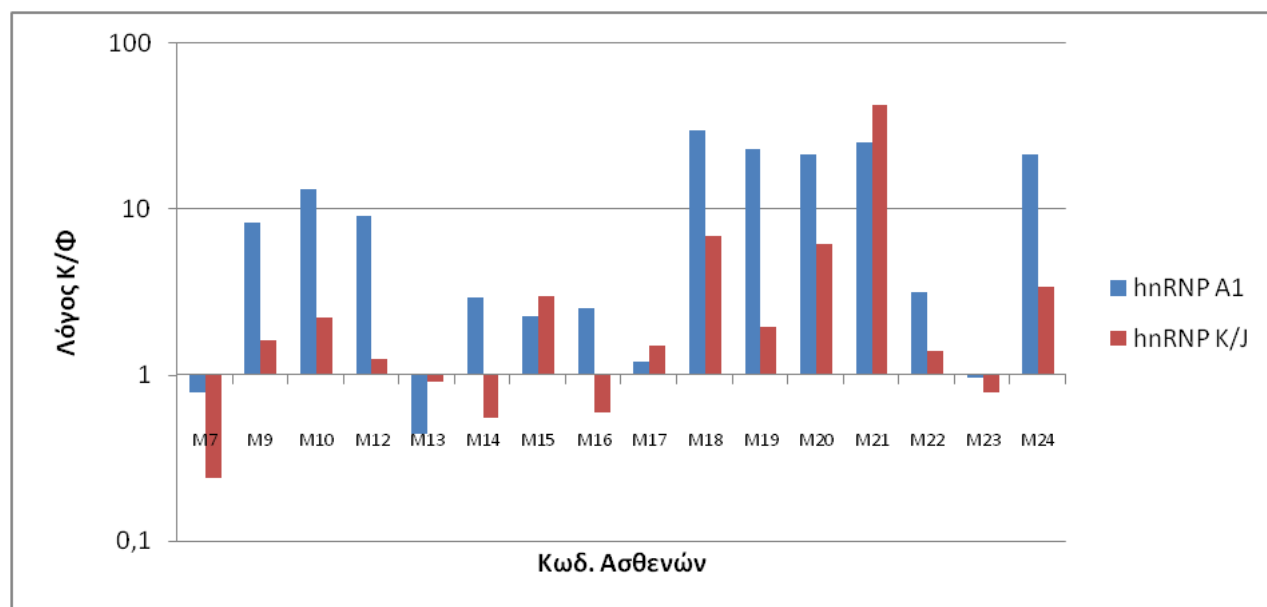
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η σύγκριση μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B (hnRNP A1, A2/B1 και A3) (Εικόνα 15). Παρατηρήθηκε ότι το

μεγαλύτερο ύψος των αλλαγών στο λόγο K/Φ, αφορούσε την hnRNP A1 με 9 από τα 21 ζεύγη βιοψιών (ποσοστό 43%) να έχουν λόγο μεγαλύτερο από 10 ($>10x$). Σε αντιδιαστολή, μόλις 1 ζεύγος για την hnRNP A2/B1, και 6 για την hnRNP A3 (ποσοστό 29%) παρουσίασαν αντίστοιχες αλλαγές (Πίνακας 4). Επίσης σημειώθηκε σαφής διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A/B (A1, A2/B1 και A3) στον ίδιο ασθενή, καθώς σε ποσοστό 19% (4 περιπτώσεις στις 21) εμφανίστηκε αντίθετη έκφραση (υπερ- ή υπο-έκφραση) αυτών των πρωτεϊνών, με μία τουλάχιστον εκ των τριών πρωτεϊνών να παρουσιάζει αντίθετη αλλαγή. Αντίστοιχα, τα ποσοστά της υπο-έκφρασης, μιας τουλάχιστον εκ των A/B, έφθασαν το 33%.



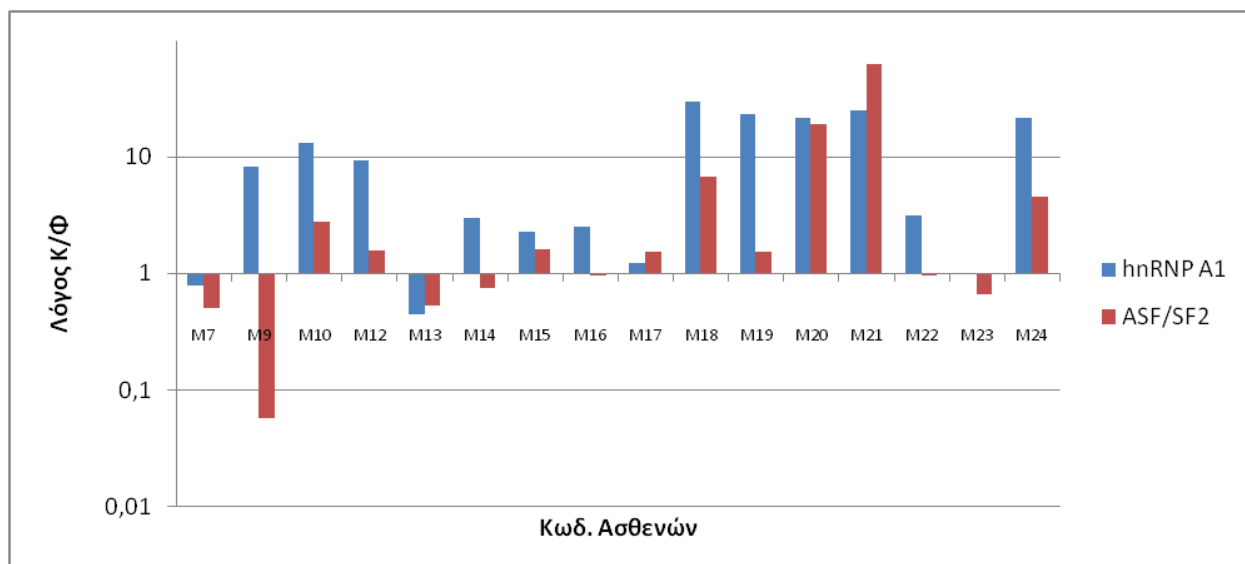
Εικόνα 15 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό ιστό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα, σε κάθε ασθενή (M1-M27).

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες hnRNP K/J, η άμεση σύγκριση με την hnRNP A1 ως την πρωτεΐνη με τον υψηλότερο βαθμό απορύθμισης, έδειξε παράλληλες αλλαγές στην έκφραση σε ποσοστό 88% (Εικόνα 16). Εντούτοις, συγκριτικά με την hnRNP A1 σημειώθηκε μικρότερο εύρος διακύμανσης και έντασης του λόγου Κ/Φ στο σύνολο των ασθενών. Χαρακτηριστικά σημειώνεται ότι μόλις 1 στα 16 ζεύγη βιοψιών έδωσε λόγο Κ/Φ>10 (Πίνακας 4).



Εικόνα 16 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό ιστό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP A1 και K/J στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα σε κάθε ασθενή (M7-M24).

Παράλληλες αλλαγές, σε ποσοστό 75%, με αυτές της hnRNP A1 σημειώθηκαν και στην περίπτωση του παράγοντα ASF/SF2 (Εικόνα 17), οι οποίες -όπως και στην περίπτωση των hnRNP K/J- ήταν μικρότερου εύρους και ύψους, με 2 στα 16 ζεύγη βιοψιών που αναλύθηκαν να παρουσιάζουν λόγο Κ/Φ>10 (Πίνακας 4).



Εικόνα 17 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό ιστό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP A1 και ASF/SF2 στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα σε κάθε ασθενή (M7-M24).

Για να εξακριβωθεί κατά πόσο οι τιμές του λόγου Κ/Φ είναι στατιστικά σημαντικές για κάθε υπό εξέταση πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος προσημασμένης διάταξης του Wilcoxon (signed-rank test). Ο έλεγχος αυτός χρησιμοποιείται στη σύγκριση δύο δειγμάτων από μη ανεξάρτητους μεταξύ τους πληθυσμούς και είναι κατάλληλος για ζεύγη παρατηρήσεων (όπως το t-test). Επιπλέον είναι στατιστικός έλεγχος που χρησιμοποιείται όταν η κατανομή των πληθυσμών από τους οποίους λαμβάνονται τα δεδομένα δεν είναι κανονική (όπως στην περίπτωση που εξετάζουμε), πρόκειται δηλαδή για μη παραμετρική μέθοδο ελέγχου. Ο έλεγχος προσημασμένων διατάξεων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της μηδενικής υπόθεσης που δηλώνει ότι στον αντίστοιχο πληθυσμό των διαφορών μεταξύ ζευγαριών, η διάμεση διαφορά ισούται με 0. Οι τιμές p που υπολογίστηκαν για κάθε υπό εξέταση πρωτεΐνη, εμφανίζονται στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.

Πρωτεϊνικά επίπεδα	Λόγος Κ/Φ			
	Εύρος διακύμανσης	Συχνότητα υπερέκφρασης		Σημαντικότητα (p)
		Κ/Φ>2 (αρ. ασθενών)	Κ/Φ>10 (αρ. ασθενών)	
hnRNP A1	0,4-30,0	76 % (16/21)	43 % (9/21)	0,0006
hnRNP A2/B1	0,4-9,0	43 % (9/21)	5 % (1/21)	0,0199
hnRNP A3	0,6-28,0	52 % (11/21)	28 % (6/21)	0,0025
hnRNP K/J	0,2-7,0	38 % (6/16)	6 % (1/16)	0,0319
ASF/SF2	0,1-19,0	31 % (5/16)	12 % (2/16)	0,4228

Πίνακας 4 Συγκεντρωτικός πίνακας του εύρους διακύμανσης τιμών του λόγου Κ/Φ (με αφαίρεση των ακραίων τιμών), της συχνότητας υπερέκφρασης για κατώφλι λόγου Κ/Φ >2 και >10, καθώς και της σημαντικότητας του στατιστικού έλεγχου (Wilcoxon), για κάθε πρωτεΐνη που εξετάστηκε.

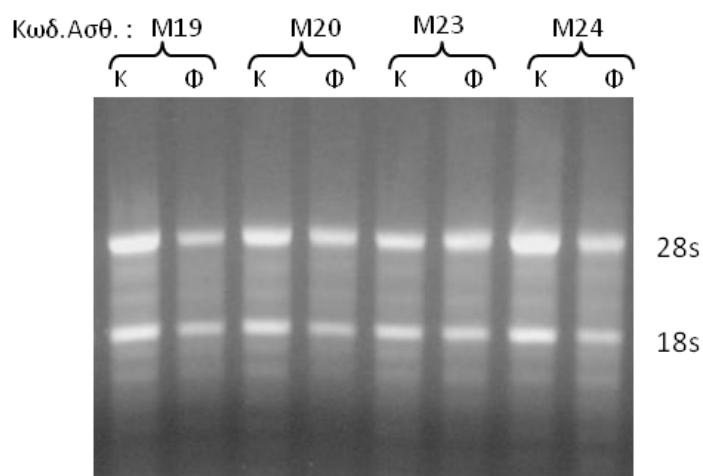
Παρατηρήθηκε ότι η τιμή p για τα σχετικά επίπεδα των hnRNP A1 και A3 είναι πολύ μικρότερη από αυτή της hnRNP A2, και σε επίπεδο σημαντικότητας 99% μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση, άρα τα επίπεδα των πρωτεϊνών A1 και A3 μεταξύ καρκινικής και φυσιολογικής θέσης του πνευμονικού ιστού διαφέρουν σημαντικά. Για τις hnRNP A2/B1 και K/J τα αντίστοιχα επίπεδα των πρωτεϊνών διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας 95%, ενώ αυτά του παράγοντα ASF/SF2 δε διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στον καρκινικό και φυσιολογικό ιστό.

Γ1.2 Μελέτη των προτύπων έκφρασης του mRNA των hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα

Ένα ερώτημα το οποίο δεν έχει μελετηθεί επαρκώς είναι το κατά πόσο οι παρατηρούμενες μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A/B οφείλονται σε παράλληλες μεταβολές στην έκφραση του mRNA των γονιδίων τους, καθώς οι υπάρχουσες μελέτες εστιάζουν στον προσδιορισμό είτε των πρωτεϊνικών επιπέδων (με ανοσοϊστοχημικές προσεγγίσεις ή ανοσοαποτυπώσεις) είτε των επιπέδων του mRNA, σε κυτταρικές σειρές και βιοψίες του πνεύμονα. Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι ο παράλληλος προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA των A/B, στο ίδιο υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των αντίστοιχων πρωτεϊνικών επιπέδων (ενότητα 1.1). Το γεγονός αυτό επέτρεψε την άμεση σύγκριση των επιπέδων πρωτεΐνης και mRNA για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο στον καρκινικό ιστό σε αντιπαραβολή με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του πνεύμονα.

Γ1.2.1 Απομόνωση mRNA

Για τη διενέργεια των πειραμάτων, κρίσιμο σημείο αποτέλεσε η επιτυχής απομόνωση ακέραιου και καθαρού ολικού mRNA, ιδιαίτερα από τον ιστό του πνεύμονα. Με τη χρησιμοποίηση της εμπορικής συσκευασίας αντιδραστηρίων της εταιρίας Qiagen Rneasy Mini kit απομονώθηκε ολικό RNA, τόσο από τις κυτταρικές σειρές όσο και από τα ζεύγη των βιοψιών από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Ειδικότερα στις βιοψίες οι καρκινικοί ιστοί έδωσαν κατά κανόνα μεγαλύτερη ποσότητα ολικού RNA από τους φυσιολογικούς ιστούς, για αντίστοιχο όγκο βιοψίας. Η ποιότητα του απομονωμένου ολικού RNA, όπως μετρήθηκε με το λόγο OD: 260/280 nm, κινήθηκε στα ίδια επίπεδα (περίπου 1,8) για όλα τα δείγματα με μικρές αποκλίσεις, ενώ η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 18) πιστοποίησε την ακεραιότητα του απομονωμένου RNA.



Εικόνα 18 Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, απομονωμένου ολικού RNA από ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα (Κ:Καρκινικός ιστός Φ:Φυσιολογικός ιστός). Σημειώνονται οι ζώνες του ριβοσωμικού 18 και 28 S RNA.

Η ταυτόχρονη επεξεργασία με DNάση, κατά την απομόνωση του ολικού RNA κρίθηκε απαραίτητη, καθώς επιτρέπει την απομάκρυνση πιθανών υπολειμμάτων γονιδιακού DNA το οποίο ενδέχεται να περιέχει ψευδογονίδια των συγκεκριμένων

πρωτεϊνών (βλ. Εισαγωγή), τα οποία θα μπορούσαν να αλλοιώσουν την εικόνα των επιπέδων έκφρασης των πραγματικών γονιδίων. Η επιλογή του mRNA γίνεται μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (RT) με τη χρήση εκκινητών που επιλέγουν ώριμο mRNA για τη δημιουργία του cDNA [Oligo(dT₁₅)].

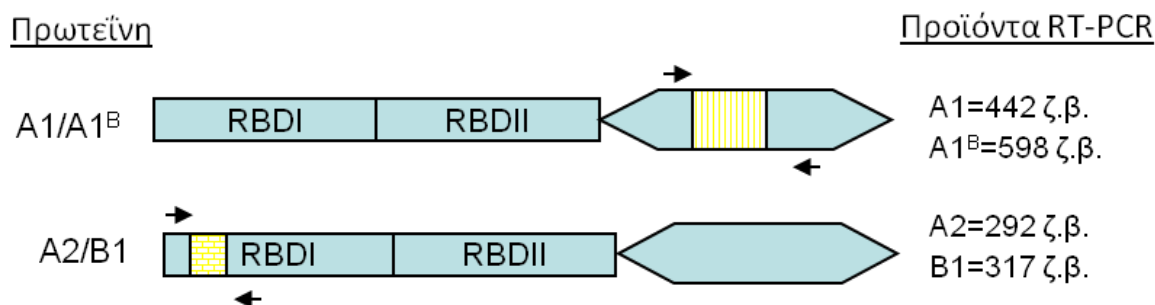
Γ1.2.2 Ημιποσοτικός προσδιορισμός του mRNA (αντίδραση RT-PCR)

Αρχικά, η μελέτη των επιπέδων του mRNA των hnRNP έγινε με συμβατική αντίδραση RT-PCR και ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των hnRNP A1 και A2 (καθώς και των γνωστών ισομορφών τους hnRNP A1^B και B1 αντίστοιχα) σε κυτταρικά συστήματα και σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Γ1.2.2.1 Αντίδραση RT-PCR σε ολικό RNA από κυτταρικά συστήματα

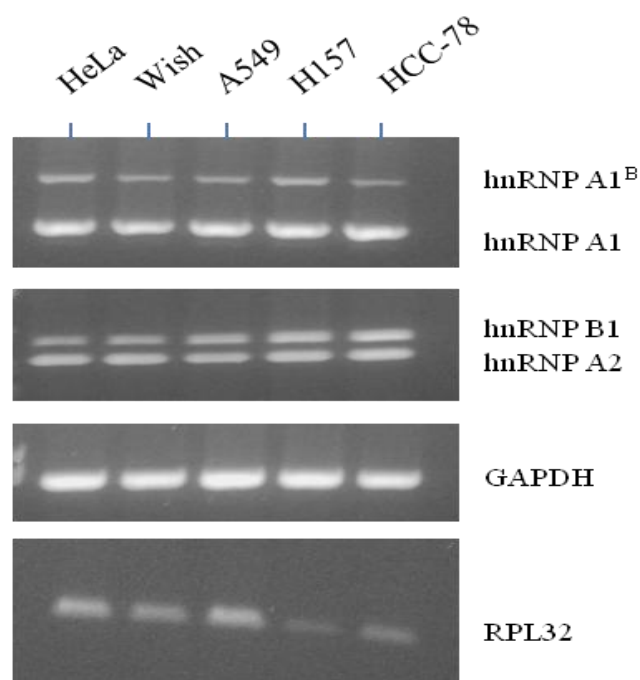
Όπως και στην περίπτωση των πρωτεϊνικών επιπέδων, τα πιλοτικά πειράματα, για διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του συμβατικού RT-PCR, πραγματοποιήθηκαν στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές του πνεύμονα (A549, HCC-78 και NCI-H157) καθώς και στην καρκινική σειρά HeLa και την προκαρκινική σειρά Wish.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19, τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στην ενίσχυση δύο προϊόντων, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος των γονιδίων hnRNP A1 και hnRNP A2/B1 που εξετάστηκαν (ισομορφές A1 και A1^B για hnRNP A1 και ισομορφές A2 και B1 για hnRNPA2/B1). Ως εσωτερικός μάρτυρας της αντίδρασης της PCR αρχικά επιλέχτηκε το mRNA του γονιδίου της GAPDH και σε δεύτερη φάση αυτό της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L32 (RPL32).



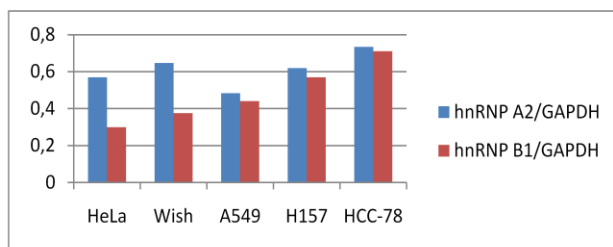
Εικόνα 19 Σχηματική παρουσίαση της δομής των πρωτεϊνών hnRNP A1/A1^B και A2/B1 που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα επιπλέον εξόνια των ισομορφών A1^B και B1. Η θέση κάθε ζεύγους των εκκινητών σημειώνεται με βέλη και αναγράφονται τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών (ζ.β.= ζεύγη βάσεων).

Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 20), ακολούθησε η πυκνομέτρηση των χαρακτηριστικών ζωνών των προϊόντων της αντίδρασης (με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού). Ο σχετικός προσδιορισμός των επιπέδων των mRNAs των hnRNP A/B στις 5 κυτταρικές σειρές έγινε μετά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση τις αντίστοιχες τιμές της GAPDH ή /και της RPL32.

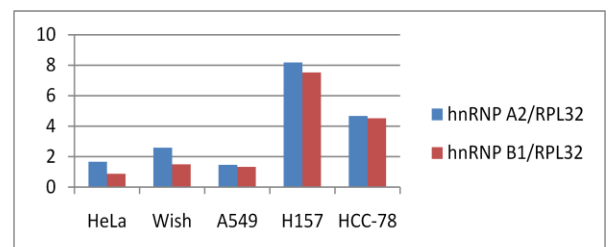


Εικόνα 20 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης, των προϊόντων της αντίδρασης PCR από τις πέντε κυτταρικές σειρές. Σημειώνονται οι θέσεις των προϊόντων της αντίδρασης των hnRNP A1/A1^B και A2/B1.

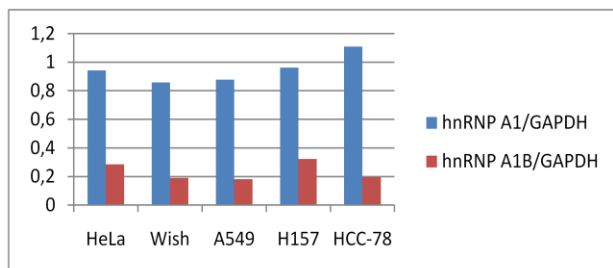
Τα αποτελέσματα των σχετικών επιπέδων του mRNA των πρωτεϊνών A/B από κάθε κυτταρική σειρά, εμφανίζονται στην Εικόνα 21. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των σχετικών επιπέδων αναφορικά με τον εσωτερικό μάρτυρα που χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση των τιμών. Με χρήση του mRNA της GAPDH, τα προϊόντα των ισομορφών hnRNP A1 και A1^B καθώς και της A2 δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των κυτταρικών σειρών, ενώ το mRNA της ισομορφής B1 εμφάνισε αύξηση στις καρκινικές σειρές του πνεύμονα H157 και HCC-78. Η χρήση του mRNA της RPL32 ως εσωτερικού μάρτυρα, ενέτεινε τη διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών H157 και HCC-78 έναντι των άλλων για όλους τους ισομορφικούς τύπους των hnRNP A/B. Το γεγονός ότι τα επίπεδα του mRNA της GAPDH εμφανίζονται αυξημένα σε σχέση με αυτά της RPL32, στις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν μας οδήγησε στο να θεωρηθεί το mRNA της RPL32 ως πιθανά καταλληλότερος δείκτης για κανονικοποίηση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η ιδιαίτερα υψηλή αναλογία της ισομορφής hnRNP B1, η οποία αγγίζει τα επίπεδα της κύριας ισομορφής A2, και στις τρεις καρκινικές σειρές του πνεύμονα (A549, H157 και HCC-78).



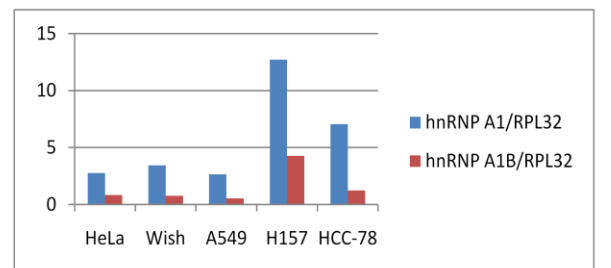
A



B



Γ

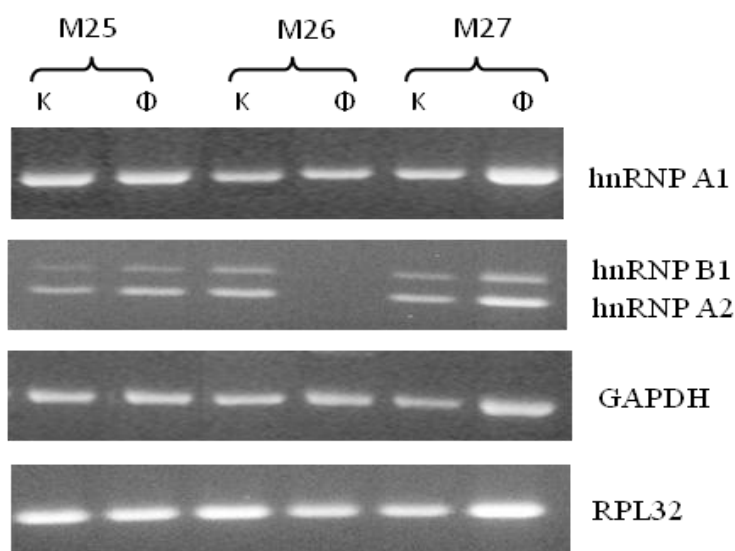


Δ

Εικόνα 21 Σχετικά επίπεδα του mRNA των hnRNP A1/A1^B και hnRNPA2/B1, στις υπό εξέταση κυτταρικές σειρές. Στα πλαίσια A και Γ παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα ως προς αυτά της GAPDH, ενώ στα B και Δ ως προς της RPL32.

Γ1.2.2.2 Αντίδραση RT-PCR σε ολικό RNA από βιοπτικό υλικό του πνεύμονα

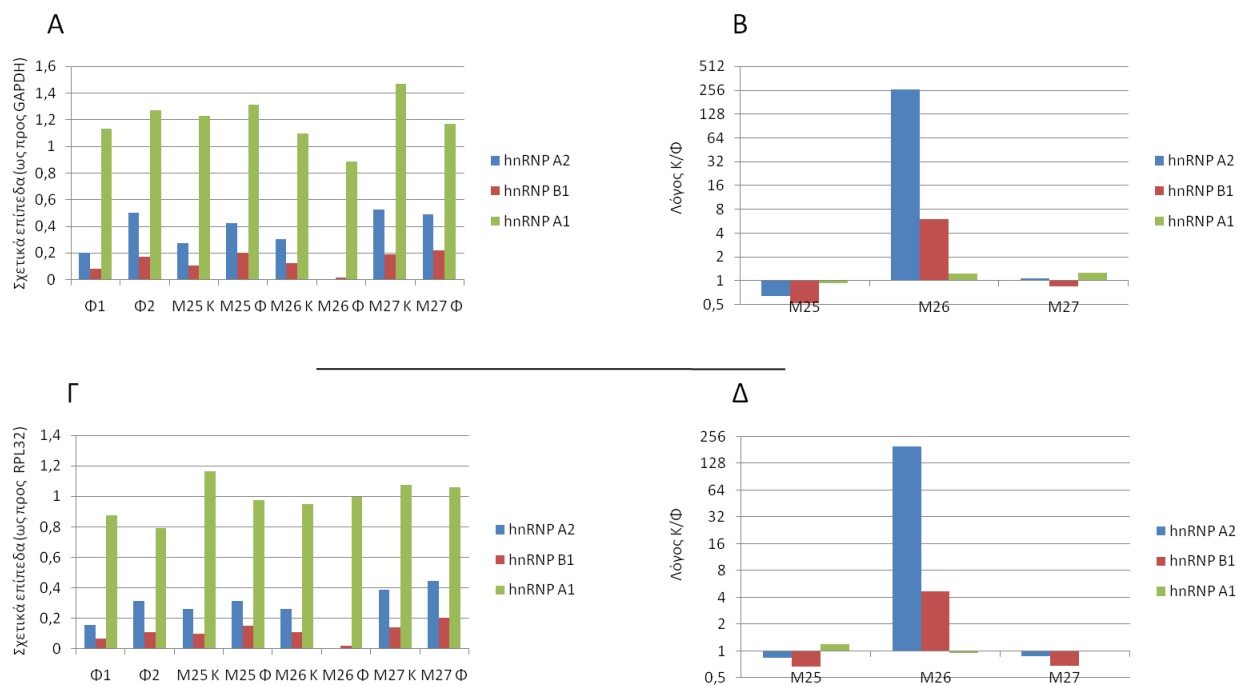
Για μια πρώτη εφαρμογή ημι-ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων του mRNA σε βιοπτικό υλικό του πνεύμονα, έγιναν πειράματα RT-PCR σε ολικό RNA από βιοψίες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, σε θέσεις καρκινικού και φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή, στις οποίες έχουν μελετηθεί παράλληλα και τα αντίστοιχα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP A/B (ζεύγη βιοψιών από ασθενείς με κωδικό M25, M26 και M27). Επιπλέον, υπήρξε και η δυνατότητα προσδιορισμού των σχετικών επιπέδων mRNA από βιοψίες του πνεύμονα ασθενών χωρίς καρκίνο (άλλη παθολογία). Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για RT-PCR όπως για τις κυτταρικές σειρές, με τη χρήση ίδιων εκκινήτων, και ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA, ως προς τους εσωτερικούς μάρτυρες GAPDH και RPL32 έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 22). Η παραπάνω ανάλυση ήταν και η πρώτη πειραματική προσέγγιση όπου έγινε άμεση σύγκριση των επιπέδων mRNA σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό, γεγονός που δεν ήταν εφικτό στην ανάλυση των κυτταρικών σειρών λόγω έλλειψης κατάλληλης μη καρκινικής σειράς.



Εικόνα 22 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR του mRNA των hnRNP A/B, GAPDH και RPL32 σε ζεύγη βιοψιών πνεύμονα (K:Καρκινικός ιστός Φ:Φυσιολογικός ιστός) από τρεις ασθενής με καρκίνο του πνεύμονα (M25, M26 και M27).

Σε αντιδιαστολή με την διαπιστωμένη υπερέκφραση των πρωτεϊνών από τους συγκεκριμένους ασθενείς (λόγος $K/\Phi \gg 10$), δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή των επιπέδων mRNA στον καρκινικό ιστό σε σύγκριση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό (Εικόνα 23). Σημειώνεται η περίπτωση του ασθενή M26 όπου τα προϊόντα mRNA της hnRNP A2/B1 (αλλά όχι της hnRNP A1) δεν ανιχνεύονται στη βιοψία από τη φυσιολογική θέση, γεγονός που επαληθεύεται και με τη χρήση της ποσοτικής αντίδρασης PCR (Real-Time PCR, βλ. παρακάτω). Από τα πρώτα αυτά αποτελέσματα έγινε εμφανής η αναντιστοιχία μεταξύ των επιπέδων πρωτεΐνης και mRNA, εφόσον τα αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP A/B, στην καρκινική έναντι της φυσιολογικής θέσης του ιστού, δεν συνοδεύονταν από αντίστοιχη αύξηση του mRNA. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτέλεσε η πρωτεΐνη hnRNP A1 και τα προϊόντα μεταγραφής του γονιδίου της.

Η παραπάνω ενδιαφέρουσα παρατήρηση κατέδειξε τη σημασία για μια πιο ενδελεχή διερεύνηση των επιπέδων του mRNA των hnRNP A/B σε ένα μεγαλύτερο αριθμό βιοψιών, εφόσον μάλιστα είναι πιθανό να υποδηλώνει εμπλοκή μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την μεταφρασιμότητα ή/και σταθερότητα των πρωτεϊνών και όχι με τη μεταγραφή των γονιδίων. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα του mRNA βιοψιών που προέρχονται από ασθενείς με μη καρκινική παθολογία (Φ1 και Φ2), ήταν στα ίδια σχεδόν επίπεδα με αυτά που προσμετρήθηκαν στα καρκινικά δείγματα. Στις ίδιες βιοψίες οι αντίστοιχες πρωτεΐνες ήταν μη ανιχνεύσιμες με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Τέλος σημειώνεται η γενική αναντιστοιχία του λόγου K/Φ στις πρωτεΐνες hnRNP A/B που προκύπτει με κανονικοποίηση των τιμών του mRNA είτε της GAPDH είτε της RPL32 (Εικόνα 23, πλαίσια Β και Δ) στους ασθενείς M25-27.



Εικόνα 23 Σχετικά επίπεδα του mRNA για τις hnRNP A1 και hnRNPA2/B1, σε βιοψίες των ασθενών M25-27, με καρκίνο του πνεύμονα (K: Καρκινικός ιστός Φ: Φυσιολογικός ιστός) και 2 βιοψίες από ασθενείς χωρίς καρκίνο (Φ1 και Φ2). Στο πλαίσιο A παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα ως προς GAPDH, ενώ στο πλαίσιο Γ ως προς RPL32. Στα πλαίσια B και Δ εμφανίζεται ο λόγος K/Φ των σχετικών επιπέδων του mRNA (ως προς GAPDH και RPL32, αντίστοιχα).

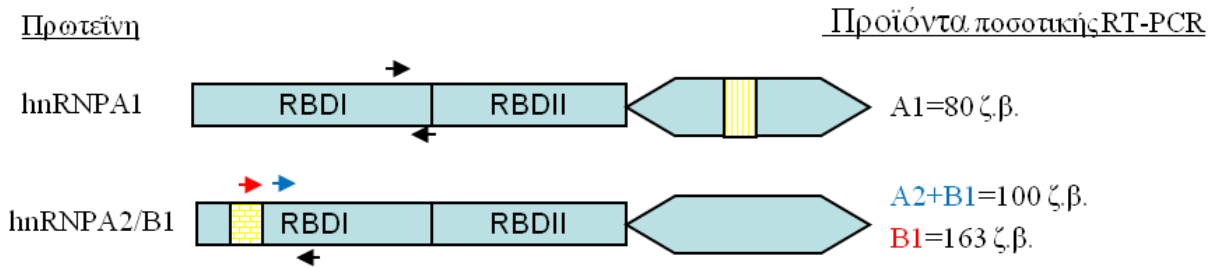
Γ1.2.3 Αντίδραση ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-time RT-PCR)

Για τον ακριβή προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων του mRNA, εφαρμόστηκε η ποσοτική μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time RT-PCR) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, σε απομονωμένο ολικό RNA. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στο σύνολο των δειγμάτων (ζεύγη βιοψιών από την καρκινική και παρακείμενη μη-καρκινική θέση) από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στα οποία εξετάστηκαν παράλληλα τα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B καθώς και ο παράγοντας ματίσματος ASF/SF2. Εξαιρεση αποτέλεσε το ζεύγος των βιοψιών από ένα ασθενή (M21) στον οποίο στάθηκε αδύνατο να απομονωθεί ολικό RNA. Συνολικά, μετρήθηκαν τα επίπεδα του mRNA τριών γονιδίων, των hnRNPA1, hnRNPA2/B1 και ASF/SF2.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για το mRNA της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L32 (RPL32). Η χρήση της RPL32 κρίθηκε ως η πιο κατάλληλη, καθώς στις πρώτες πειραματικές προσεγγίσεις

με τη μέθοδο Real-Time RT-PCR τα επίπεδα του mRNA της GAPDH, που χρησιμοποιήθηκε αρχικά σαν εσωτερικός μάρτυρας, ήταν κατά πολύ υψηλότερα στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς, για την ίδια ποσότητα ολικού RNA, με συνέπεια οι ποσότητες του mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων να εμφανίζονται αρκετά μειωμένες στην καρκινική θέση της βιοψίας έναντι της φυσιολογικής. Τα παραπάνω ενισχύονται και από αναφορές [336] που εμφανίζουν το εν λόγω γονίδιο ως μη κατάλληλο εσωτερικό μάρτυρα για προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στον καρκίνο. Παλαιότερη έρευνα μάλιστα προτείνει το γονίδιο της GAPDH ως πιθανό στόχο προς διερεύνηση για καρκινικό δείκτη στον καρκίνο του πνεύμονα, λόγω αυξημένης δραστηριοποίησής του [337]. Το ίδιο ισχύει και σε περιπτώσεις υποξίας [338], κατάσταση που αναμένεται στον καρκινικό ιστό.

Για την εφαρμογή της ποσοτικής μεθόδου PCR σχεδιάστηκαν νέα ζεύγη εκκινητών ώστε να δίνουν μοναδικά και μικρά σε μέγεθος προϊόντα PCR (μέχρι 200 βάσεις νουκλεοτιδίων), κατάλληλα για Real-Time PCR. Μία πρόκληση που εμφανίστηκε αφορούσε στο σχεδιασμό εκκινητών που να μπορούν να διαφοροποιούνται τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος της hnRNP A2/B1. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε ένα ζευγάρι εκκινητών που δίνει ένα προϊόν PCR αντίδρασης που αντιστοιχεί στο σύνολο των μετάγραφων του γονιδίου hnRNP A2/B1 (ισομορφές A2 και B1), και ένα δεύτερο που αντιστοιχεί αποκλειστικά στο mRNA της ισομορφής B1, όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 24. Δεν κατέστη δυνατό να σχεδιαστεί ένα ζευγάρι εκκινητών που να αντιστοιχεί αποκλειστικά στο mRNA της ισομορφής A2.

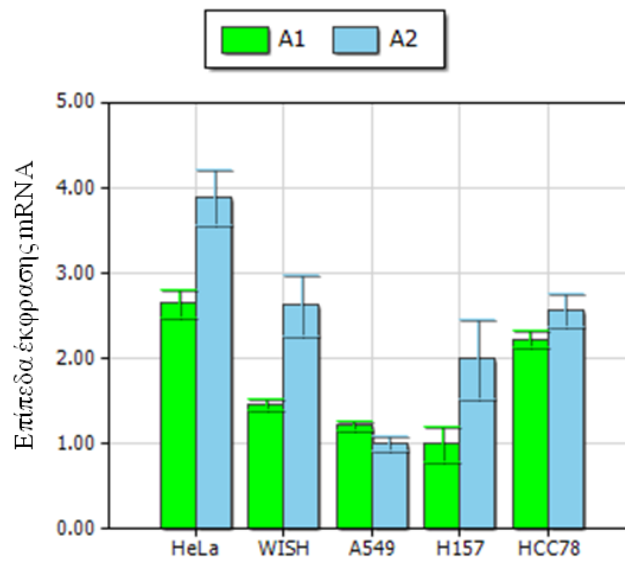


Εικόνα 24 Σχηματική παρουσίαση της δομής των πρωτεϊνών hnRNP A1/A1^B και A2/B1 που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα επιπλέον εξόνια των ισομορφών A1^B και B1. Η θέση κάθε ζεύγους των εκκινητών σημειώνεται με βέλη και αναγράφονται τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών (ζ.β.= ζεύγη βάσεων). Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των εκκινητών (forward primers) που ενισχύουν είτε την ισομορφή B1 είτε και τις δύο ισομορφές (A2 και B1) παρουσιάζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα.

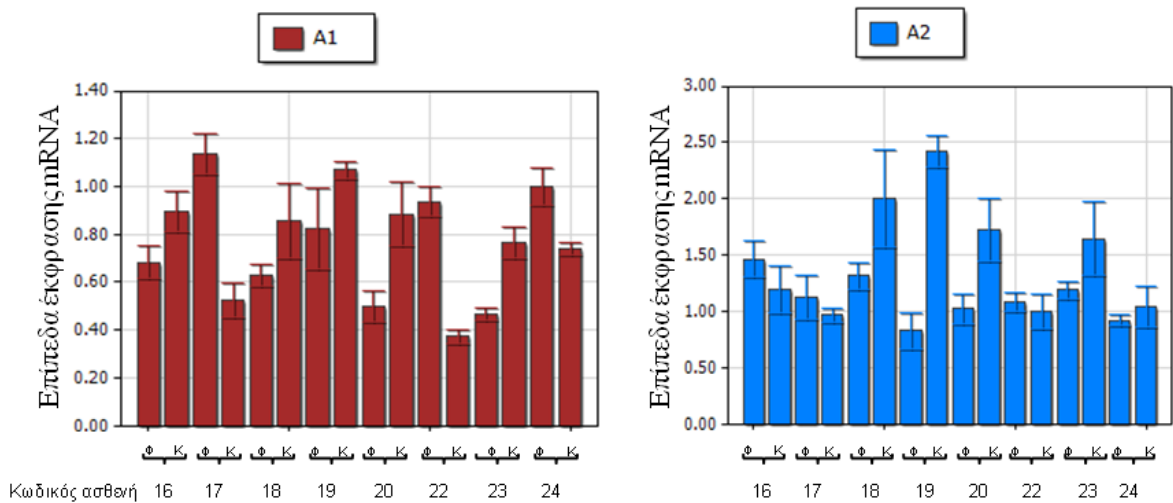
Για κάθε ζεύγος εκκινητών χωριστά, προηγήθηκε η μέτρηση της αποτελεσματικότητας (efficiency) της αντίδρασης PCR, σε cDNA που προέκυψε από ολικό RNA κυττάρων A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα), με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές αραιώσεις του cDNA. Αποδεκτές τιμές, για την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, θεωρήθηκαν όσες κυμάνθηκαν σε ποσοστά 80-110%. Οι τιμές της αποτελεσματικότητας κάθε αντίδρασης προσμετρήθηκαν κατά την ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα, και για κάθε ζεύγος εκκινητών, ενώ δείγματα από τον ίδιο ασθενή, καρκινικά και φυσιολογικά, φορτώθηκαν στις ίδιες πλάκες πολλαπλών φρεατίων.

Η ποσοτικοποίηση της σχετικής, ως προς τον εσωτερικό μάρτυρα, έκφρασης των γονιδίων (Normalized fold expression) έγινε με το ειδικό πρόγραμμα iQ5 της Biorad. Όπως και στην περίπτωση της μέτρησης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών, ακολούθησε η μέτρηση του λόγου των σχετικών επιπέδων mRNA από τους καρκινικούς ιστούς προς τα αντίστοιχα επίπεδα από τους φυσιολογικούς ιστούς για κάθε ασθενή χωριστά (λόγος K/Φ).

Προκειμένου να ελεγχθούν οι αντιδράσεις και τα προϊόντα τους, η Real-Time RT-PCR πραγματοποιήθηκε αρχικά σε cDNA από ολικό RNA των κυτταρικών σειρών A549, HCC-78, NCI-H157, HeLa και Wish (Εικόνα 25) για τα γονίδια hnRNP A1 και A2/B1. Ακολούθησαν οι αντιδράσεις στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα για όλους τους ασθενείς, για τα γονίδια hnRNP A1, A2/B1 (Εικόνα 26) και ASF/SF2.



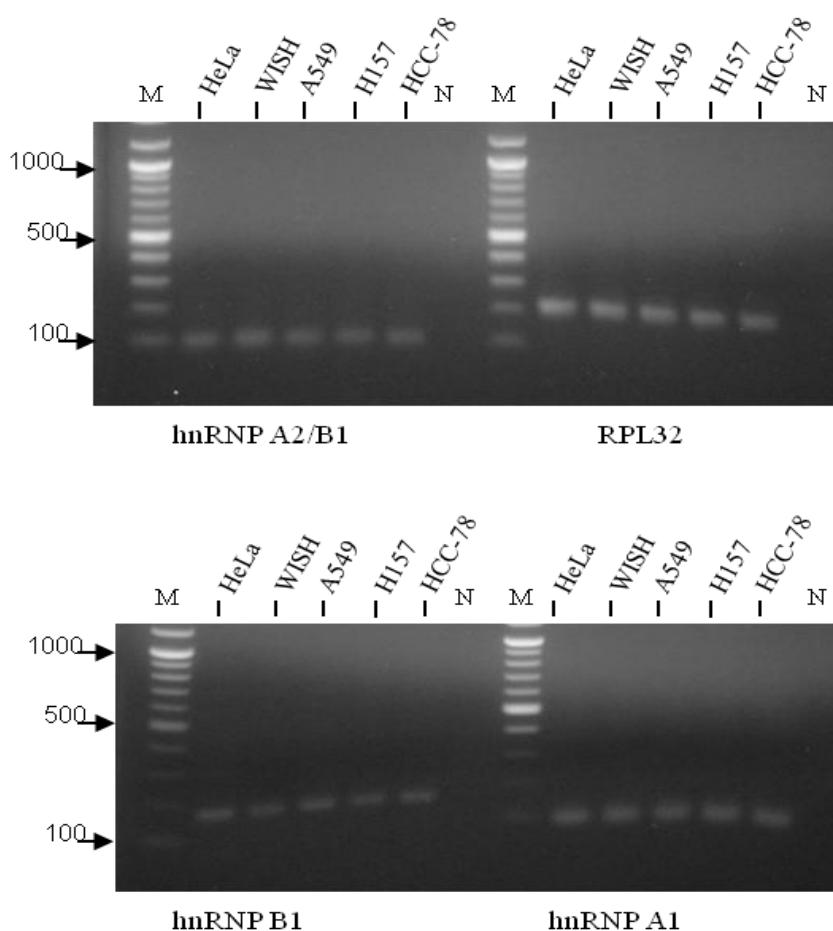
Εικόνα 25 Μέτρηση της σχετικής (μετά από κανονικοποίηση ως προς RPL32) έκφρασης του mRNA των hnRNP A1 και A2/B1 στις κυτταρικές σειρές που αναγράφονται.



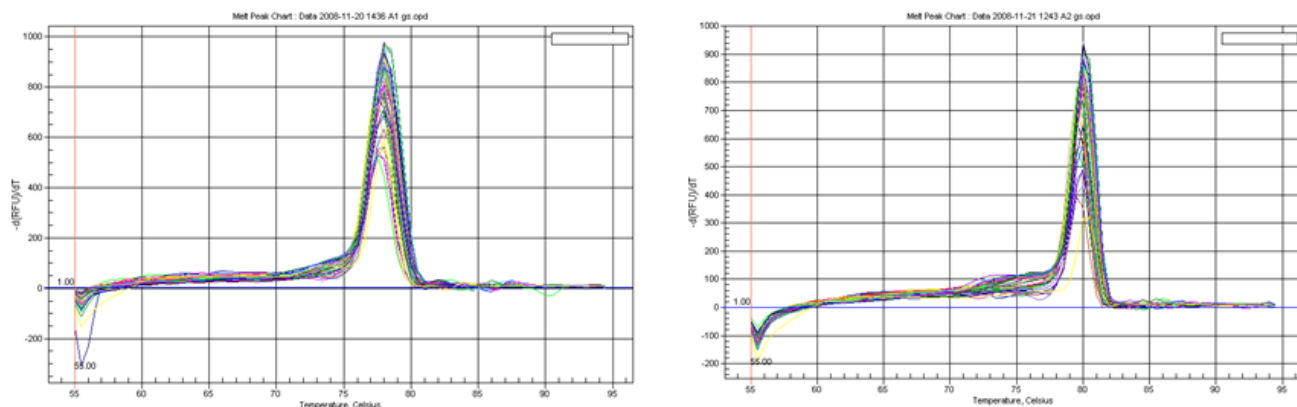
Εικόνα 26 Αντιπροσωπευτική εικόνα των μετρήσεων της σχετικής (μετά από κανονικοποίηση ως προς RPL32) έκφρασης του mRNA των hnRNP A1 και A2/B1 σε 8 ζεύγη βιοψιών από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Φ: φυσιολογικός ιστός K: καρκινικός ιστός).

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση (σε πήκτωμα αγαρόζης) (Εικόνα 27) καθώς και οι καμπύλες τήξης των προϊόντων της PCR (Εικόνα 28), πιστοποίησαν την ύπαρξη μοναδικών προϊόντων για κάθε ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε, απαραίτητη προϋπόθεση κατά τη διενέργεια Real-Time PCR με χρήση της χρωστικής

SYBERGreen. Η βασική ικανότητα της χρωστικής να ενώνεται με μόρια δίκλωνου DNA, δεν επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ παραπάνω του ενός προϊόντος μέσα στην ίδια αντίδραση PCR. Σε αντίθετη περίπτωση, η εμφάνιση μεγαλύτερου σήματος από το αναμενόμενο για ένα μόνο προϊόν, θα αλλοιώσει τις μετρήσεις για την έκφραση ενός συγκεκριμένου mRNA. Επιπλέον, σε κάθε αντίδραση πιστοποιήθηκε η απουσία μόλυνσης με εξωγενές DNA, με την παράλληλη χρήση αντίδρασης που συμπεριελάμβανε όλα τα συστατικά εκτός από cDNA.



Εικόνα 27 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός, σε πήκτωμα αγαρόζης, των προϊόντων της αντίδρασης Real-Time RT-PCR σε ολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές που αναγράφονται με εκκινητές για το cDNA των hnRNP A1, A2/B1 και RPL32 (M: Δείκτης μοριακού βάρους DNA N: Αντίδραση χωρίς cDNA).



Εικόνα 28 Αντιπροσωπευτική εικόνα των καμπύλων τήξης των προϊόντων της Real-Time PCR με χρήση εκκινητών για το γονίδιο hnRNPA1 και A2/B1 σε ζεύγη βιοψιών από 8 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

Τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό του λόγου Κ/Φ, μετά από τη μέτρηση των σχετικών επιπέδων του mRNA για τα γονίδια hnRNP A1, A2/B1 και ASF/SF2 συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Όπως ισχύει και στη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών, τιμές μεγαλύτερες της μονάδας χαρακτηρίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA στην καρκινική έναντι της φυσιολογικής θέσης της βιοψίας στον ίδιο ασθενή (υπερέκφραση), ενώ αντίθετα τιμές μικρότερες της μονάδας μειωμένα επίπεδα έκφρασης (υποέκφραση). Το εύρος των τιμών του λόγου Κ/Φ που παρατηρείται για τα mRNA διαμορφώνεται ως εξής: hnRNP A1: 0,2-5, hnRNP A2/B1: 0,4-207, hnRNP B1: 0,4-14,4 και ASF/SF2: 0,4-2,1 (Πίνακας 7). Με την εξαίρεση των ακραίων τιμών που εμφανίστηκαν στους ασθενείς M1 και M26 (όπως είχε φανεί και στην περίπτωση του συμβατικού PCR), για το mRNA της hnRNP A2/B1, τόσο το εύρος της διακύμανσης των τιμών όσο και το ύψος των αλλαγών στην έκφραση του mRNA ήταν μικρότερης κλίμακας συγκριτικά με αυτά των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό εξέταση γονιδίων.

Κωδ. Ασθ.	Λόγος Κ/Φ			
	hnRNPA1	hnRNPA2+B1	hnRNPB1	ASF/SF2
M1	0.2	30	14.4	M/Δ
M2	1.5	4	2.1	M/Δ
M7	0.9	1.2	1.7	0.9
M9	1.1	0.9	0.9	0.9
M10	1.5	2.4	1.3	0.6
M12	1	0.9	0.5	0.5
M13	0.7	0.9	0.7	1
M14	0.7	0.4	0.4	0.4
M15	0.8	0.8	0.5	0.4
M16	1.4	0.8	0.8	1.7
M17	0.6	0.9	0.8	0.7
M18	1.2	1.5	2.3	1.3
M19	1.1	2.5	1.3	0.9
M20	1.5	1.9	2.4	2.1
M22	0.5	0.9	0.6	0.41
M23	1.8	1.5	1.5	2
M24	0.8	1.3	0.7	0.5
M25	3.4	2.8	1.6	M/Δ
M26	0.7	207	M/Δ	M/Δ
M27	5	4	4.6	M/Δ

Πίνακας 5 Λόγος των σχετικών (ως προς RPL32) επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση mRNAs στον καρκινικό (Κ) ως προς τον παρακείμενο φυσιολογικό (Φ) ιστό (Λόγος Κ/Φ) στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (Μ/Δ: Μη Διαθέσιμη Τιμή).

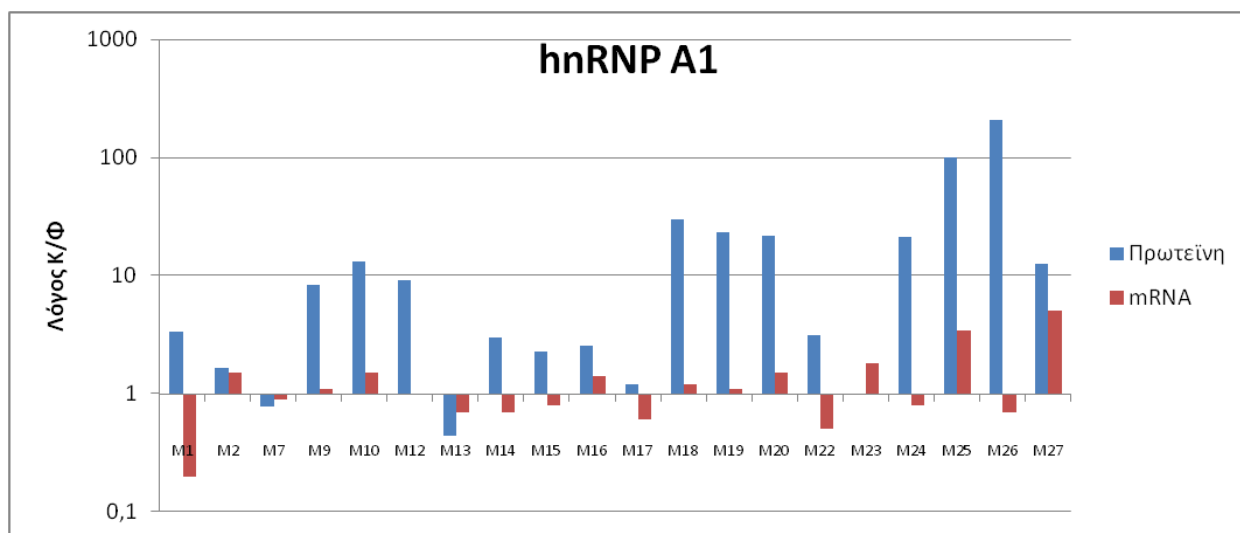
Αναφορικά με τα επίπεδα του mRNA, και σε αντιδιαστολή με τα πρωτεϊνικά επίπεδα, δεν παρατηρήθηκε στο σύνολο των ασθενών υπερέκφραση των hnRNP A/B στον καρκινικό ιστό έναντι του φυσιολογικού. Με κατώφλι αλλαγών στο λόγο Κ/Φ μεγαλύτερο από 1,5 φορές ($> 1.5x$), δηλαδή η έκφραση του γονιδίου στον καρκινικό ιστό να είναι τουλάχιστον μιάμιση φορά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του φυσιολογικού ιστού στον ίδιο ασθενή (Πίνακας 6), παρατηρήθηκε υπερέκφραση των επιπέδων mRNA σε ένα ποσοστό περίπου 40% για hnRNP A2/B1 ή B1 χωριστά. Το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο ίδιο επίπεδο με αυτό των αλλαγών στην έκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 (43%) (Πίνακας 3). Αντίθετα στην περίπτωση της hnRNP A1 εμφανίστηκε εντυπωσιακή διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA, εφόσον το ποσοστό υπερέκφρασης του mRNA φτάνει μόνο το 15% έναντι του 76% για τα πρωτεϊνικά επίπεδα. Τέλος, για τον παράγοντα ASF/SF2 το ποσοστό υπερέκφρασης του mRNA είναι 20% έναντι 31% για την αντίστοιχη πρωτεΐνη.

	hnRNPA1	hnRNPA2+B1	hnRNPB1	ASF/SF2
Κατώφλι λόγου >1.5	3/20	8/20	7/19	3/15
Ποσοστά υπερέκφρασης	15%	40%	37%	20%

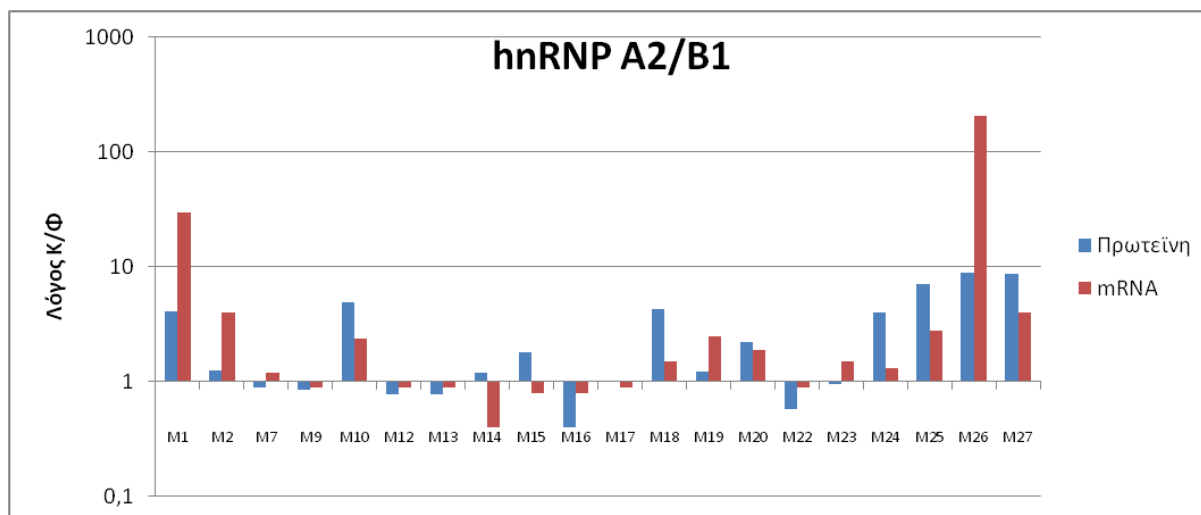
Πίνακας 6 Αριθμός περιπτώσεων και ποσοστό των λόγων Κ/Φ που ξεπερνούν το κατώφλι του 1,5 (Σχετική έκφραση του mRNA στον καρκινικό ιστό τουλάχιστον μιάμιση φορά αυτής στο φυσιολογικό ιστό).

Σε άμεση σύγκριση του λόγου Κ/Φ των επιπέδων πρωτεΐνης και του αντίστοιχου mRNA, παρατηρήθηκε στην περίπτωση της hnRNP A1 ένα ποσοστό 35% (7/20) των βιοψιών με αντίθετη ρύθμιση, δηλαδή υπερέκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων και υποέκφραση (λόγος Κ/Φ <1) του mRNA, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τους ασθενείς M1, M22 και M26 (Εικόνα 29). Ακόμα υψηλότερο ποσοστό (53%, 8/15) σημειώθηκε στην περίπτωση της ASF/SF2 (Εικόνα 31). Στην περίπτωση της hnRNP A1 όπου παρατηρήθηκε παράλληλη υπερέκφραση πρωτεΐνης και mRNA σε 8 από τις 20 περιπτώσεις ασθενών, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ήταν πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του mRNA. Όσον αφορά την πρωτεΐνη hnRNP A2/B1, αντίθετη ρύθμιση παρατηρήθηκε σε συγκριτικά μικρότερο

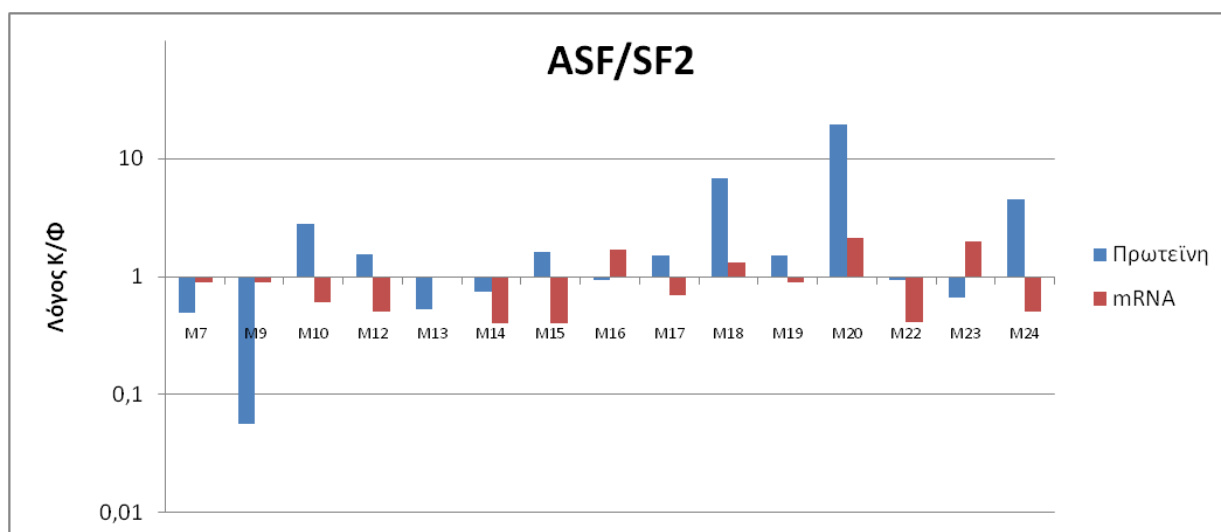
ποσοστό (15%, 3/20), με μία οριακή περίπτωση ενός ασθενή (M7), όπου ο λόγος Κ/Φ τόσο για την πρωτεΐνη όσο και για το mRNA πλησίαζε τη μονάδα (δηλαδή απουσία σημαντικής διακύμανσης). Επίσης σε μία περίπτωση (M26) η υπερέκφραση του mRNA ήταν πολύ μεγαλύτερου βαθμού από αυτή της πρωτεΐνης (Εικόνα 30).



Εικόνα 29 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA της hnRNP A1, στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα στο σύνολο των ασθενών.



Εικόνα 30 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA της hnRNP A2/B1, στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα στο σύνολο των ασθενών.



Εικόνα 31 Συγκριτική παρουσίαση του λόγου Κ/Φ (Καρκινικό/Φυσιολογικό) των σχετικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA της ASF/SF2, στα ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα στο σύνολο των ασθενών.

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι η σύγκριση των καρκινοεξαρτώμενων αλλαγών της hnRNP A1 και του παράγοντα ASF/SF2 σε ζεύγη βιοψιών (καρκινικός/φυσιολογικός ιστός), από τον ίδιο ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα τύπου ΜΜΚΠ, οδηγεί στην έλλειψη γενικής αντιστοιχίας μεταξύ των επιπέδων

πρωτεΐνης και mRNA. Επισημαίνεται η εντυπωσιακή διαφοροποίηση μεταξύ πρωτεϊνικών επιπέδων και των επιπέδων του mRNA στην περίπτωση της hnRNP A1. Γενικά, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών στον καρκινικό ιστό δεν συνοδεύεται από αντίστοιχες αλλαγές στο επίπεδο του mRNA των ίδιων των πρωτεϊνών.

Για την περίπτωση της hnRNP A2/B1 όμως δε φαίνεται να ισχύει η ίδια παρατήρηση, εφόσον τα ποσοστά των πρωτεϊνικών επιπέδων και του mRNA πλησιάζουν σε μεγάλο βαθμό. Από τις 9 περιπτώσεις ασθενών με υπερέκφραση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων, στις 6 παρατηρείται και αντίστοιχη υπερέκφραση του mRNA, σύμφωνα με τα όρια που έχουν οριστεί για την κάθε περίπτωση. Στις εναπομείναντες 3 περιπτώσεις, η μία (M18) εμφανίζει οριακή αύξηση του mRNA στην καρκινική κατάσταση έναντι της φυσιολογικής σύμφωνα με το κατώφλι που ορίστηκε ($K/\Phi=1,5$), και γι' αυτό το λόγο δεν προσμετράτε στο σύνολο, ενώ σε μία περίπτωση (M21) δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα του mRNA λόγω αδυναμίας απομόνωσης ολικού RNA από τις βιοψίες.

Όπως στην περίπτωση προσδιορισμού της σημαντικότητας της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών, έτσι και στη μελέτη του mRNA πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος προσημασμένης διάταξης του Wilcoxon (signed-rank test). Οι τιμές p για κάθε mRNA εμφανίζονται στο συγκεντρωτικό Πίνακα 7, όπου παρουσιάζονται και τα συγκεντρωτικά στοιχεία του εύρους διακύμανσης και της συχνότητας υπερέκφρασης του mRNA των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε ότι η τιμή p για τα επίπεδα του mRNA των υπό εξέταση πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη του 0,01, άρα σε επίπεδο σημαντικότητας 99% δε μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση και επομένως τα επίπεδα του mRNA δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών. Μοναδική εξαίρεση φαίνεται να αποτελεί το mRNA της hnRNP A2/B1 (το σύνολο των μετάγραφων και των δύο ισομορφών), τα επίπεδα του οποίου διαφοροποιούνται ανάμεσα στον καρκινικό και φυσιολογικό ιστό (επίπεδο σημαντικότητας 95%).

Επίπεδα mRNA	Λόγος Κ/Φ		
	Εύρος διακύμανσης τιμών	Συχνότητα υπερέκφρασης Κ/Φ>1.5 (αρ. περιπτώσεων)	Signed-rank test Σημαντικότητα (p)
hnRNP A1	0,2 – 5,0	15 % (3/20)	0,6407
hnRNP A2/B1	0,4 – 30,0	40 % (8/20)	0,0196
hnRNP B1	0,4 – 14,4	37 % (7/19)	0,1650
ASF-SF2	0,1 – 19,0	20 % (3/15)	0,1182

Πίνακας 7 Συγκεντρωτικός πίνακας του εύρους διακύμανσης τιμών του λόγου Κ/Φ (με αφαίρεση των ακραίων τιμών), της συχνότητας υπερέκφρασης και της σημαντικότητας του στατιστικού έλεγχου (υπόθεση Wilcoxon), για τα mRNA που εξετάστηκαν.

Γ1.3 Διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP A/B, ASF/SF2 και του εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων με εμπλοκή στην καρκινική εξαλλαγή.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, λαμβάνοντας υπόψη την σημασία της εμπλοκής του εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο και την συμμετοχή πρωτεϊνών hnRNP A/B και ASF/SF2, έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσο οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από τον ίδιο ασθενή μπορούν να συσχετιστούν με το πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος συγκεκριμένων γονιδίων. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε το ογκογονίδιο CD44, του οποίου το pre-mRNA υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα με την ενσωμάτωση εξονίων των οποίων η παρουσία έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια καρκινικής εξαλλαγής.

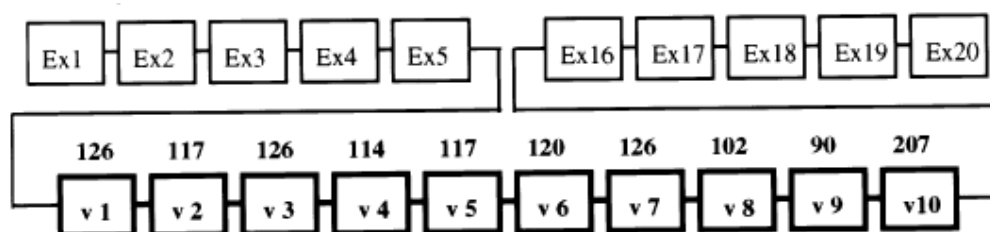
Επιπλέον, βασιζόμενοι σε πρόσφατη μελέτη η οποία κατέδειξε μια σειρά γονιδίων των οποίων το pre-mRNA υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα και αποτελεί mRNA-στόχο των hnRNP A/B [339], επιλέχθηκαν προς διερεύνηση σχετικά γονίδια όπως τα CASP9, MAP4K4, LRDD και PPP3CB.

Για τη διερεύνηση πιθανών συσχετισμών μεταξύ εναλλακτικού ματίσματος των συγκεκριμένων γονιδίων και αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των hnRNP A/B

και ASF/SF2, διενεργήθηκαν πειράματα RT-PCR σε ολικό RNA από τα ίδια ζεύγη βιοψιών (καρκινικός και φυσιολογικός ιστός) που προσδιορίστηκαν τα επίπεδα τους. Τα ζεύγη βιοψιών επιλέχθηκαν με κριτήριο το λόγο K/Φ που εμφάνισαν στη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών και περιελάμβαναν αντιπροσωπευτικά ζεύγη υψηλής και χαμηλής έκφρασης (λόγος K/Φ > 10 και περίπου 1-2, αντίστοιχα) Πίνακας 8.

Γ1.3.1 Συσχέτιση πρωτεϊνικών επιπέδων των hnRNP A1, ASF/SF2 και της έκφρασης ισομορφών του ογκογονιδίου CD44.

Το γονίδιο CD44 κωδικεύει μια οικογένεια μορίων που απαρτίζεται από πολλές ισομορφές. Τα μόρια αυτά είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με γλυκοζιομένο το εξωκυττάριο μέρος τους και αποτελούν τους κύριους υποδοχείς του υαλουρονικού οξέος, ενώ δένουν και γλυκοπρωτεΐνες του εξωκυτταρικού σκελετού (matrix) όπως κολλαγόνο και φιμπρονεκτίνη. CD44 έχει ανιχνευτεί μόνο σε ανώτερους οργανισμούς ενώ παρουσιάζει υψηλά συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των ειδών [340]. Η πρωτεϊνική πολυμορφία του γονιδίου παράγεται τόσο από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όσο και από εναλλακτικό μάτισμα. Το εναλλακτικό μάτισμα αφορά κυρίως 10 εξόνια της εξωκυττάριας περιοχής τα οποία αναφέρονται ως v1-10 [341] (Εικόνα 32). Η μη συμμετοχή των εξονίων v1-10 δίνει την αναφερόμενη ως βασική (standard) μορφή του CD44, ενώ η συμμετοχή όλων ή μέρους των v1-10 την καρκινοεξαρτώμενη μορφή CD44.



Εικόνα 32 Σχηματική παράσταση της δομής των εξονίων του CD44. Με v χαρακτηρίζονται τα 10 εξόνια (v1-v10) που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα, και των οποίων σημειώνεται το μέγεθος (αριθμός βάσεων).

Το CD44 έχει μελετηθεί για το μεταστατικό δυναμικό που φαίνεται να προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα σε διάφορους τύπους καρκίνου. Αυτό αποδίδεται στη φυσιολογική του δραστηριότητα, που είναι η διατήρηση ιστών και οργάνων, με ενεργό ρόλο στη συγκόλληση μεταξύ κυττάρων καθώς και κυττάρων και εξωκυτταρικού σκελετού [342]. Επίσης, οι αλλαγές τόσο σε επίπεδο έκφρασης πρωτεΐνης (υπερέκφραση ή υποέκφραση) όσο και ισομορφικών τύπων, συσχετίζονται με την εξέλιξη της καρκινογένεσης και το μεταστατικό δυναμικό. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί η έκφραση του CD44 στον καρκίνο του πνεύμονα [343-348]. Οι μελέτες έχουν αποδώσει ιδιαίτερη έμφαση στην παρουσία τις ισομορφής v6 [344, 349, 350] η οποία φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με το μη-μικροκυτταρικού τύπου καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου (squamous), και όχι με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [351]. Επισημαίνεται επίσης η σχέση μεταξύ αλλαγών στην έκφραση πρωτεϊνών με εμπλοκή στο εναλλακτικό μάτισμα, όπως οι πρωτεΐνες SR και οι hnRNP, και των πρότυπων εναλλακτικού ματίσματος του CD44 [352-355].

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης του CD44, τα οποία προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, μεταξύ της καρκινικής και φυσιολογικής θέσης στα ζεύγη βιοψιών, με στόχο την πιθανή συσχέτιση τους με τις καρκινοεξαρτώμενες αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A1, και ASF/SF2. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην παρατήρηση από τους Matter και συνεργάτες για συμμετοχή της hnRNP A1 στο εναλλακτικό μάτισμα του CD44 [356].

Σε μία πρώτη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε RT-PCR με τη χρήση εκκινητών (Fs/Rs) οι οποίοι επιλέχθηκαν με βάση την εργασία των Salles και συνεργατών [357] (Εικόνα 33) για τη βασική μορφή CD44s και τυχόν άλλων καρκινοεξαρτώμενων μορφών, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του πνεύμονα, A549, NCI-H157 και HCC-78, για την ταυτοποίηση των προτύπων του εναλλακτικού ματίσματος του CD44 στον καρκίνο του πνεύμονα. Στην ανάλυση αυτή, εκτός από την αναμενόμενη βασική μορφή CD44s με μέγεθος 266 βάσεις, που ανιχνεύθηκε σε όλες τις σειρές, παρατηρήθηκαν 4 ακόμα μορφές μεγαλύτερου μοριακού βάρους, κυρίως στην σειρά HCC-78 (Εικόνα 33). Οι μορφές αυτές αντιπροσωπεύουν άλλους ισομορφικούς τύπους της πρωτεΐνης, οι οποίοι περιλαμβάνουν συνδυασμούς εξονίων v1-v10 που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα.

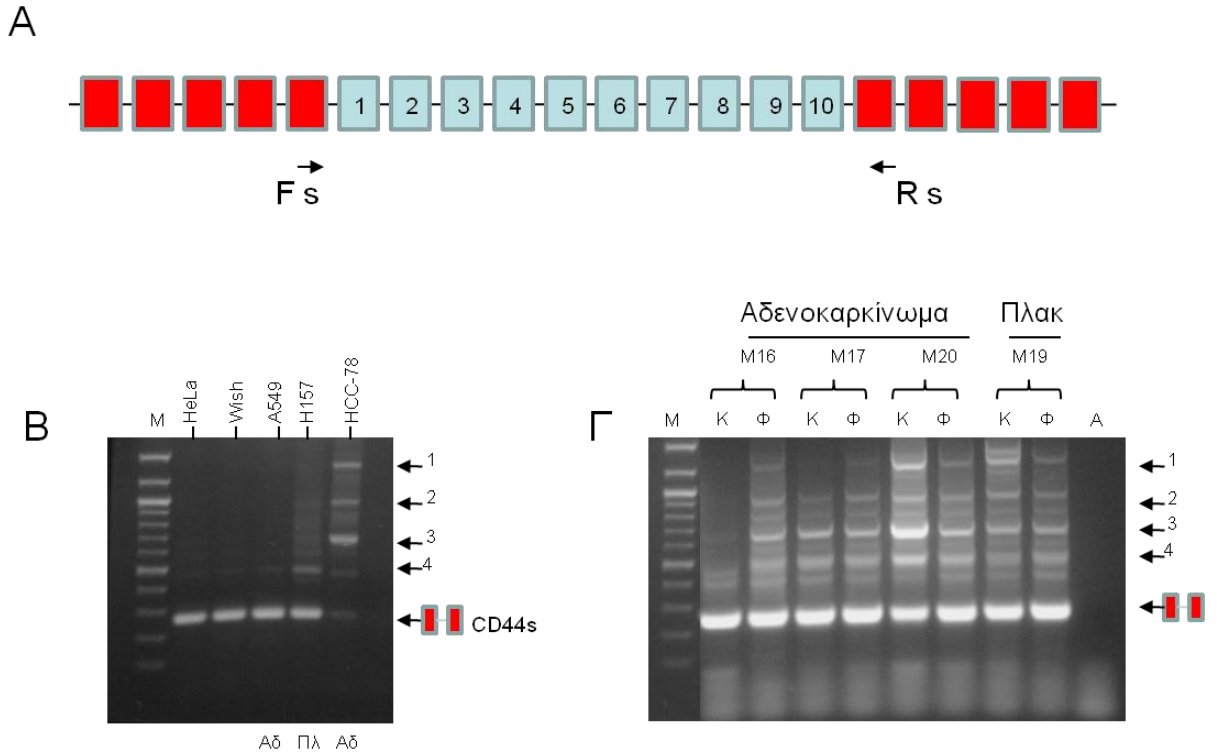
Ακολούθησε η διενέργεια RT-PCR στα 4 αντιπροσωπευτικά ζεύγη βιοψιών, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Επιλέχθηκαν 2 ζεύγη με υψηλό λόγο K/Φ για

την hnRNPA1 (ένα αδενοκαρκίνωμα, κωδικός ασθενή M20, και ένα καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου, M19), ένα ζεύγος με σχετικά χαμηλή υπερέκφραση στο καρκινικό ιστό (M16) και ένα ζεύγος χωρίς σημαντική αλλαγή των επιπέδων της A1 (M17). Το ζεύγος από τον ασθενή M20 παρουσιάζει επιπλέον υψηλό λόγο K/Φ για ASF/SF2.

	Λόγος K/Φ			
	M16	M17	M19	M20
hnRNP A1	2,5	1,2	23,3	21,5
ASF/SF2	0,9	1,5	1,5	19,1

Πίνακας 8 Λόγος K/Φ των πρωτεϊνών hnRNP A1 και ASF/SF2 στα αντιπροσωπευτικά ζεύγη βιοψιών που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου CD44.

Η διενέργεια RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών Fs/Rs στις βιοψίες, παρουσίασε μια πληθώρα προϊόντων. Η παρουσία της βασικής μορφής CD44s ήταν εμφανής σε όλες τις βιοψίες τόσο στον καρκινικό όσο και στο φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 33) (η χαρακτηριστική ζώνη του μικρότερου μοριακού βάρους). Επίσης επισημαίνεται η παρουσία προϊόντων μεγαλύτερου μοριακού βάρους (1-4), τα οποία εντοπίστηκαν κατά κύριο λόγο στην κυτταρική σειρά HCC-78. Τα προϊόντα αυτά, με εξαίρεση την καρκινική θέση του ζεύγους M16, εμφανίζονται τόσο στον καρκινικό όσο και φυσιολογικό ιστό του πνεύμονα.

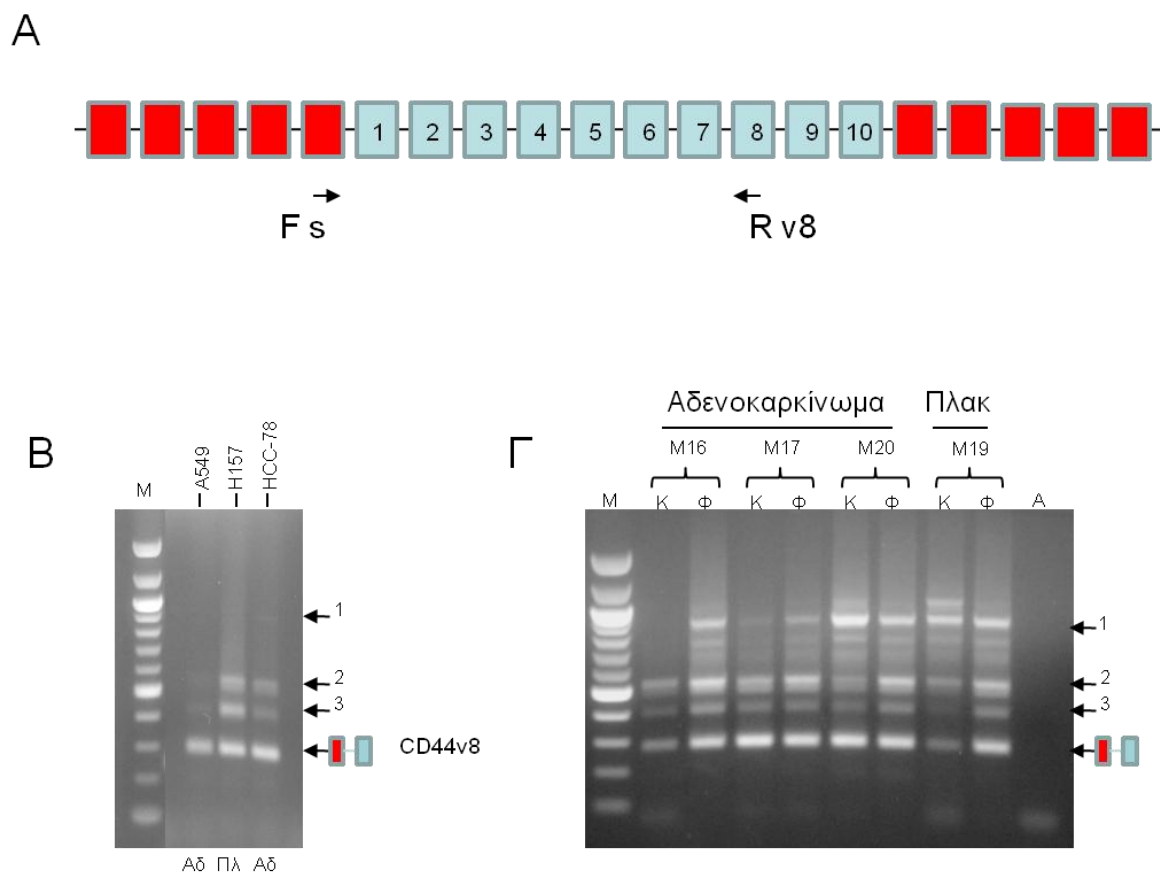


Εικόνα 33 A: Σχηματική παράσταση της θέσης του ζεύγους εκκινητών Fs/Rs στο CD44. Με κόκκινο σημειώνονται τα εξόνια του βασικού ματίσματος, με γαλάζιο τα εξόνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. B: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR σε ολικό RNA από κυτταρικές σειρές του πνεύμονα. Με τα βέλη 1-4 σημειώνονται τα προϊόντα της αντίδρασης επιπλέον της βασικής μορφής CD44s. Γ: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης σε ολικό RNA από ζεύγη βιοψιών. Με 1-4 σημειώνονται τα προϊόντα που λόγω μεγέθους ταυτίζονται με αυτά των κυτταρικών σειρών. (K:Καρκινικό Φ:Φυσιολογικό M:Μοριακός δείκτης DNA για σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR A:Αρνητικός μάρτυρας)

Μοναδική ουσιαδής μεταβολή στο πρότυπο ματίσματος μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού εμφανίστηκε στο ζεύγος M20, με την υψηλή υπερέκφραση των hnRNP A1 και ASF/SF2 (λόγος K/Φ>10, Πίνακας 8), όπου ενισχύθηκαν τα προϊόντα 1 και 3 στην καρκινική θέση του ιστού.

Για πιο ενδελεχή έλεγχο των προτύπων εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου CD44 πραγματοποιήθηκε νέα σειρά αντιδράσεων RT-PCR στα ίδια δείγματα βιοψιών, με εκκινητές που επιλέγουν συγκεκριμένα εξόνια των v1-v10. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών Fs/Rv8 για την επιλογή του εξονίου v8 (Εικόνα 34) καθώς επίσης και το ζεύγος Fs/Rv6 για επιλογή του εξονίου v6 (Εικόνα 35). Η επιλογή των εξονίων v6 και v8 στηρίχτηκε σε σχετικές αναφορές

στον καρκίνο του πνεύμονα [350, 358-360]. Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR έγινε παράλληλα σε ολικό RNA από κυτταρικές σειρές του πνεύμονα (A549, H157 και HCC-78) και βιοψίες.

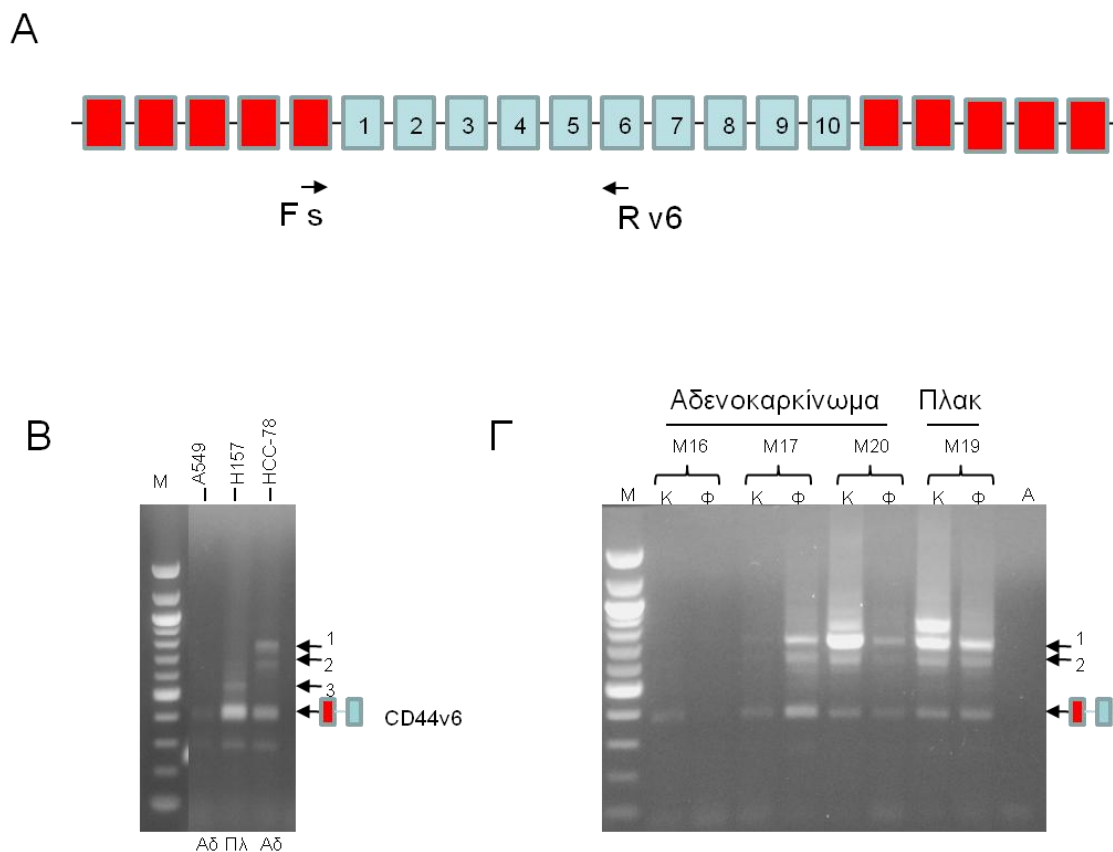


Εικόνα 34 Α: Σχηματική παράσταση της θέσης του ζεύγους εκκινητών Fs/Rv8 στο CD44. Με κόκκινο σημειώνονται τα εξόνια του βασικού ματίσματος, με γαλάζιο τα εξόνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. Β: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR σε ολικό RNA από κυτταρικές σειρές του πνεύμονα. Με τα βέλη 1-3 σημειώνονται τα προϊόντα της αντίδρασης επιπλέον της αναμενόμενης μορφής CD44v8. Γ: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης σε ολικό RNA από ζεύγη βιοψιών. Με 1-3 σημειώνονται τα προϊόντα που λόγω μεγέθους ταυτίζονται με αυτά των κυτταρικών σειρών. (Κ:Καρκινικό Φ:Φυσιολογικό Μ:Μοριακός δείκτης DNA για σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR Α:Αρνητικός μάρτυρας)

Στην περίπτωση των αντιδράσεων με χρήση των εκκινητών Fs/Rv8, επιλεγμένων για την ισομορφή CD44v8 (Εικόνα 34), παρατηρήθηκαν στις κυτταρικές σειρές, εκτός από το μικρότερου μεγέθους προϊόν (CD44v8) επιπλέον τρεις ζώνες

προϊόντων (1-3 στην εικόνα), που υποδηλώνουν παρουσία του εξωνίου v8. Σε αναλογία με τη χρήση των εκκινητών Fs/Rs για τη βασική μορφή, το αναμενόμενο προϊόν CD44v8 εντοπίζεται σε όλα τα δείγματα βιοψιών (καρκινική και φυσιολογική θέση). Επίσης, οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους ζώνες 1-3 που εντοπίστηκαν στις κυτταρικές σειρές, ταυτοποιήθηκαν με βάση το μοριακό μέγεθος και στα δείγματα των βιοψιών, με εξαίρεση τον καρκινικό ιστό του ζεύγους M16. Επισημαίνεται η πλέον σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των προτύπων εναλλακτικού ματίσματος, καρκινικού και φυσιολογικού ιστού, στην περίπτωση των ζευγών M19 και M20 με υπερέκφραση της hnRNP A1 (μειωμένη παρουσία του προϊόντος 2 και αύξηση του 1 στον καρκινικό ιστό έναντι του φυσιολογικού).

Παρομοίως με χρήση των εκκινητών Fs/Rv6, επιλεγμένων για την ισομορφή CD44v6, παρατηρήθηκαν στις κυτταρικές σειρές τρεις ζώνες προϊόντων (1-3) επιπλέον του προϊόντος CD44v6. Το προϊόν Cd44v6 εντοπίστηκε, με διαφορετική ένταση, και σε όλες τις βιοψίες (καρκινική και φυσιολογική θέση ιστού) (Εικόνα 35).



Εικόνα 35 A: Σχηματική παράσταση της θέσης του ζεύγους εκκινητών Fs/Rv6 στο CD44. Με κόκκινο σημειώνονται τα εξόνια του βασικού ματίσματος, με γαλάζιο τα εξόνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. B: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR σε ολικό RNA από κυτταρικές σειρές του πνεύμονα. Με τα βέλη 1-3 σημειώνονται τα προϊόντα της αντίδρασης επιπλέον της αναμενόμενης μορφής CD44v6. Γ: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης σε ολικό RNA από ζεύγη βιοψιών. Με 1-2 σημειώνονται τα προϊόντα που λόγω μεγέθους ταυτίζονται με αυτά των κυτταρικών σειρών. (K:Καρκινικό Φ:Φυσιολογικό M:Μοριακός δείκτης DNA για σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR A:Αρνητικός μάρτυρας)

Όπως και στην περίπτωση των εκκινητών Fs/Rv8, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος, στα ζεύγη M19 και M20, με το μεγαλύτερο λόγο K/Φ για την πρωτεΐνη hnRNP A1, με την εμφάνιση ενός επιπλέον προϊόντος μεγαλύτερου μοριακού βάρους στη θέση του καρκινικού ιστού έναντι του φυσιολογικού. Σημειώνεται επίσης ότι παρατηρήθηκε ενίσχυση του προϊόντος 1 στον καρκίνο.

Γ1.3.2 Πιθανή σχέση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP A/B και εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων με συμμετοχή στην απόπτωση.

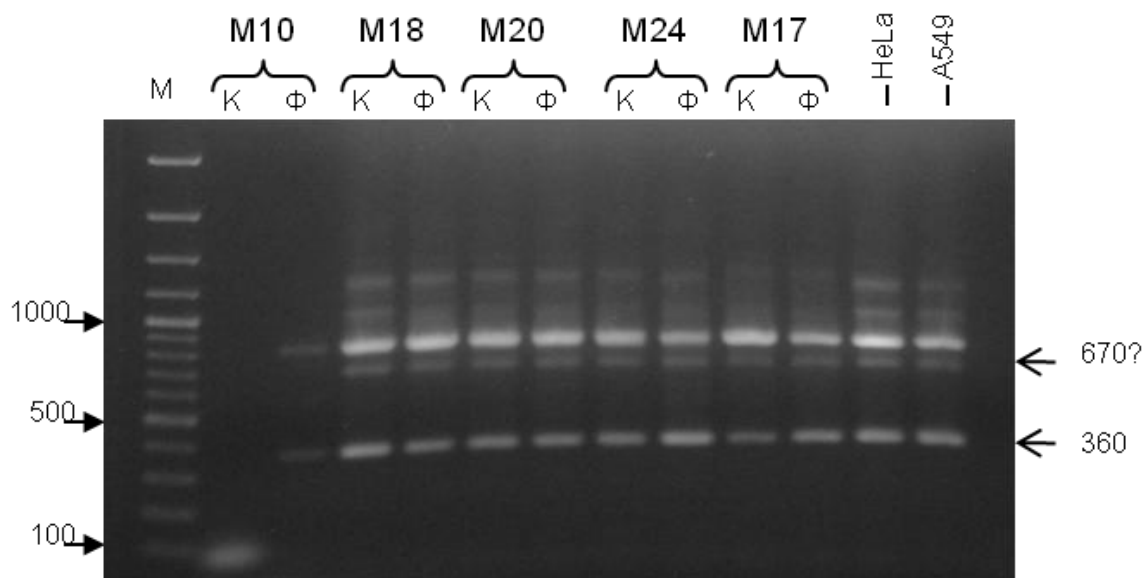
Η διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων πρωτεϊνών hnRNP με τα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος συγκεκριμένων γονιδίων, επεκτάθηκε σε άλλα γονίδια τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα και των οποίων το mRNA διασυνδέεται άμεσα ή έμμεσα με τις πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2. Η μελέτη αυτή στηρίχτηκε στην πρόσφατη δημοσίευση των Venables J. Και συνεργατών [339] στην οποία η έγινε χρήση siRNA για τη σίγηση γονιδίων 14 hnRNP, μεταξύ των οποίων οι πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1. Η μελέτη αφορούσε 3 κυτταρικές σειρές (HeLa, PC-3 - καρκίνος του προστάτη- και BJT αθανатоποιημένη σειρά δέρματος) όπου παρατηρήθηκαν αλλαγές στο πρότυπο του εναλλακτικού ματίσματος μιας σειράς αποπτωτικών γονιδίων. Για τη διενέργεια μεθόδου RT-PCR, οι συγγραφείς σχεδίασαν ειδικούς εκκινητές προκειμένου να ενισχύσουν δύο εναλλακτικές μορφές του mRNA επιλεγμένων γονιδίων. Οι διαφορές μεταξύ των επιπέδων των ισομορφών κάθε γονιδίου, συσχετίστηκαν με τη σίγηση των hnRNP.

Με βάση την παραπάνω αναφορά έγινε μια πιλοτική μελέτη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής με την επιλογή 4 γονιδίων, σε τρία εκ των οποίων τα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος σχετίζονται με την έκφραση της hnRNP A1 και σε ένα με την hnRNP A2. Για την hnRNP A1 επιλέχθηκαν τα αποπτωτικά γονίδια κινάση MAP4K4 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4), φωσφατάση PPP3CB (protein phosphatase 3 catalytic subunit, beta isoform) και η πρωτεΐνη LRDD (leucine-rich repeats and death domain containing), ενώ για την hnRNP A2 το γονίδιο της κασπάσης CASP9 (caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase). Με τη χρήση των αντίστοιχων ζευγών εκκινητών που προτείνονται για κάθε γονίδιο, πραγματοποιήθηκε RT-PCR σε 5 ζεύγη βιοψιών του πνεύμονα (καρκινικός και φυσιολογικός ιστός). Όπως και για το CD44, η επιλογή των βιοψιών έγινε με κριτήριο τους λόγους Κ/Φ των πρωτεϊνικών τους επιπέδων για hnRNP A1 και hnRNP A2/B1 (Πίνακας 9). Επιλέχθηκαν 4 ζεύγη (M10, M18, M20, M24) με υπερέκφραση της hnRNP A1 αλλά και της A2/B1 στον καρκινικό ιστό καθώς και ένα ζευγάρι (M17) χωρίς σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωτεϊνών (λόγος Κ/Φ~1).

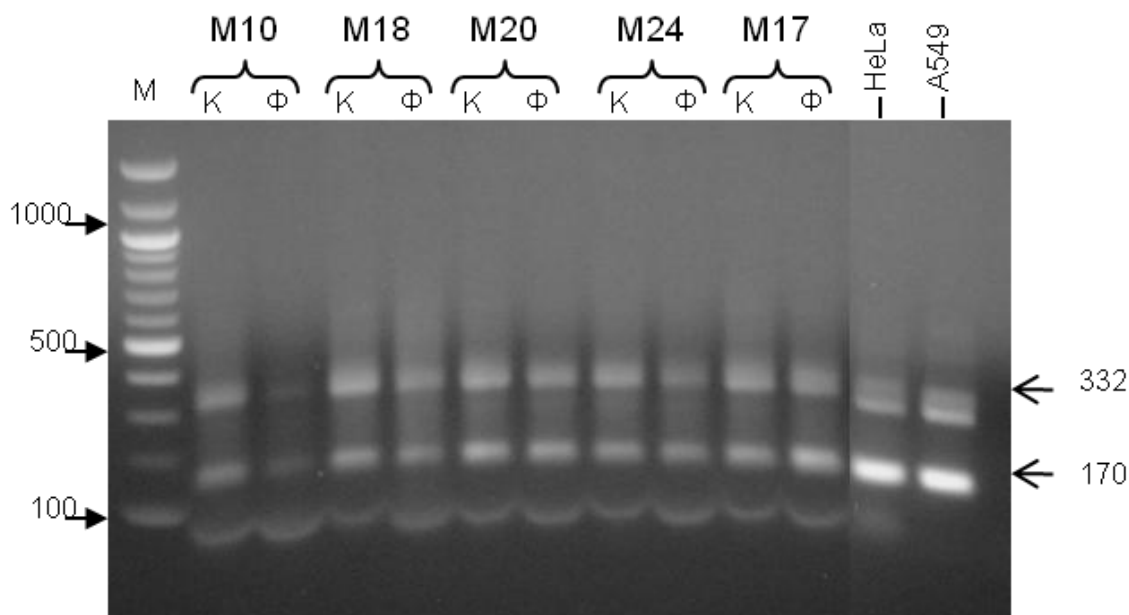
	Λόγος Κ/Φ				
	M10	M17	M18	M20	M24
hnRNP A1	13,2	1,2	30	21,5	21,3
hnRNP A2/B1	4,9	1	4,3	2,2	4

Πίνακας 9 Λόγος Κ/Φ για τις πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 στα επιλεγμένα για διενέργεια RT-PCR ζεύγη βιοψιών.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων RT-PCR, με τους εκκινητές για τα γονίδια που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασε αξιόλογες διαφοροποιήσεις στα πρότυπα ματίσματος μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού στα ζεύγη των βιοψιών που εξετάστηκαν. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των εκκινητών για το γονίδιο της κασπάσης 9 (Εικόνα 36) και της κινάσης MAP4K4 (Εικόνα 37). Σαν αποτέλεσμα, δεν ήταν δυνατή η συσχέτιση των πρωτεϊνικών επίπεδων των hnRNP με τα πρότυπα ματίσματος των γονιδίων.



Εικόνα 36 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR με το ζεύγος των εκκινητών για κασπάση-9 (CASP9), σε ζεύγη βιοψιών (Κ και Φ) καθώς και κύτταρα HeLa και A549. Δηλώνεται η θέση των προϊόντων με τα αναμενόμενα μεγέθη εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία αποτελούν τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης (Κ:Καρκινικό Φ:Φυσιολογικό Μ:DNA δείκτης μοριακού βάρους).



Εικόνα 37 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR με το ζεύγος των εκκινητών για κινάση MAP4K4, σε ζεύγη βιοψιών (Κ και Φ) καθώς και κύτταρα HeLa και A549. Δηλώνεται η θέση των προϊόντων με τα αναμενόμενα μεγέθη εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία αποτελούν τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης (Κ:Καρκινικό Φ:Φυσιολογικό Μ:DNA δείκτης μοριακού βάρους).

Συμπερασματικά η συσχέτιση των προτύπων εναλλακτικού ματίσματος, τόσο του γονιδίου CD44 όσο και των αποπτωτικών γονιδίων που επιλέχθηκαν, με τις καρκινοεξαρτώμενες αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A/B και ASF/SF2, έδωσε μικρής κλίμακας αλλαγές που δεν επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Για το σκοπό αυτό θα χρειαστεί η άμεση ταυτοποίηση του CD44 pre-mRNA στα σύμπλοκα hnRNP. Τέλος δεν παρατηρήθηκε ένα κοινό πρότυπο ματίσματος που να μπορεί να συσχετιστεί με τον τύπο του καρκινικού ιστού (αδενοκαρκίνωμα έναντι πλακώδους επιθηλίου).

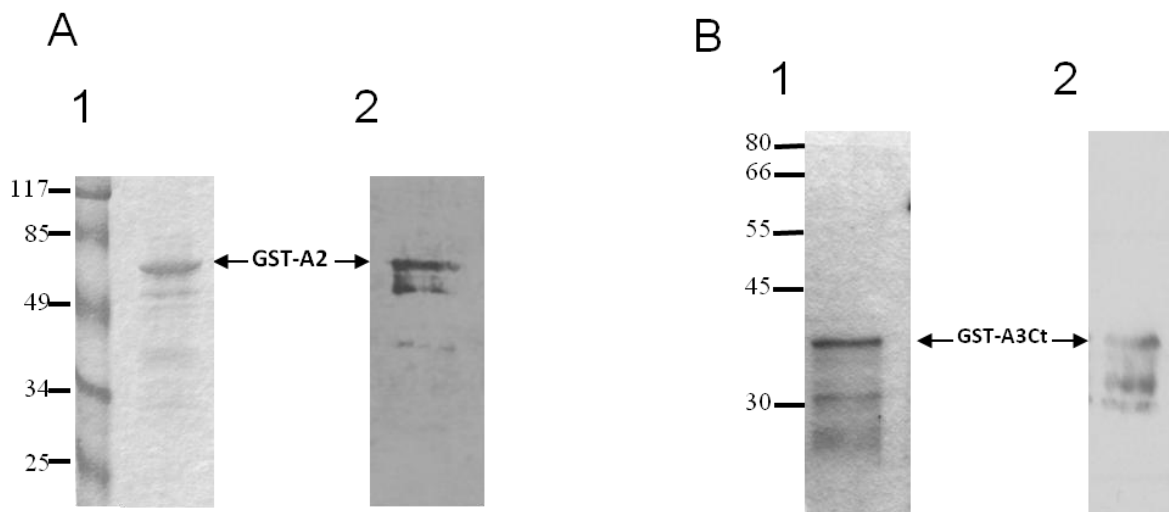
Γ2 Νέα εργαλεία μελέτης των πρωτεϊνών hnRNP και εφαρμογές στον καρκίνο του πνεύμονα

Στα πλαίσια του μοριακού χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B, και της πιθανής εφαρμογής στη μελέτη της καρκινικής εξαλλαγής, έγινε προσπάθεια

για τη δημιουργία ειδικών μοριακών εργαλείων. Αυτό αφορά κυρίως την πρωτεΐνη hnRNP A3, δεδομένου ότι αποτελεί ένα από τα νεότερα μέλη της ομάδας των A/B και υπάρχει γενικότερο ενδιαφέρον για ανάλυση των ιδιοτήτων της σε σχέση με τις πλέον μελετημένες hnRNP A1 και A2/B1.

Γ2.1 Υποκλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A3 και A2

Για την *in vitro* έκφραση των πρωτεϊνών, έγινε υποκλωνοποίηση του cDNA της hnRNP A2 (πλήρους μήκους) και του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης hnRNP A3 σε κατάλληλα οχήματα (πλασμίδια) ώστε να εκφραστούν σε βακτηριακά συστήματα *E.Coli* σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST (ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες rec.GST-A2 και rec.GST-A3Ct). Οι αρχικοί κλώνοι προήλθαν από cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου οστεοσαρκώματος για την hnRNP A2 (pHCA2, προσφορά του Dr. G. Dreyfuss) και από cDNA βιβλιοθήκη ηπατοκυττάρων αρουραίου ο κλώνος pmBx, που είχε απομονωθεί στο εργαστήριό μας, και περιλαμβάνει το τμήμα της hnRNP A3 που αντιστοιχεί στη βοηθητική περιοχή της πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο (hnRNP A3Ct). Τα επιθυμητά ενθέματα αποσπάστηκαν από τους πλασμιδιακούς φορείς με κατάλληλες ενζυμικές πέψεις και εισήχθησαν σε πλασμίδια έκφρασης που φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης GST, τα pGEX4T2 για την hnRNP A2 και pGEX4T3 για την hnRNP A3Ct, έτσι ώστε να παραχθεί πρωτεΐνη σύντηξης με GST μετά από επαγωγή με τον παράγοντα IPTG. Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών ήταν τα BL21(DE3) για την hnRNP A3Ct και ROSSETTA2 για την πρωτεΐνη hnRNP A2. Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα βακτήρια και η πρόσδεση τους σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης λόγω της μεγάλης συγγένειας της GST με τη γλουταθειόνης (Εικόνα 38). Στην ενότητα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι πρώτες εφαρμογές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παρήχθησαν.



Εικόνα 38 Πλαίσια A και B: Έλεγχος της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A2 και GST-A3Ct, αντίστοιχα (επαγωγή της έκφρασης με IPTG) 1: SDS/PAGE με χρώση Coomassie blue 2: Ανοσοαποτύπωση (Western blot) με χρήση αντισωμάτων έναντι της hnRNP A2 και hnRNP A3.

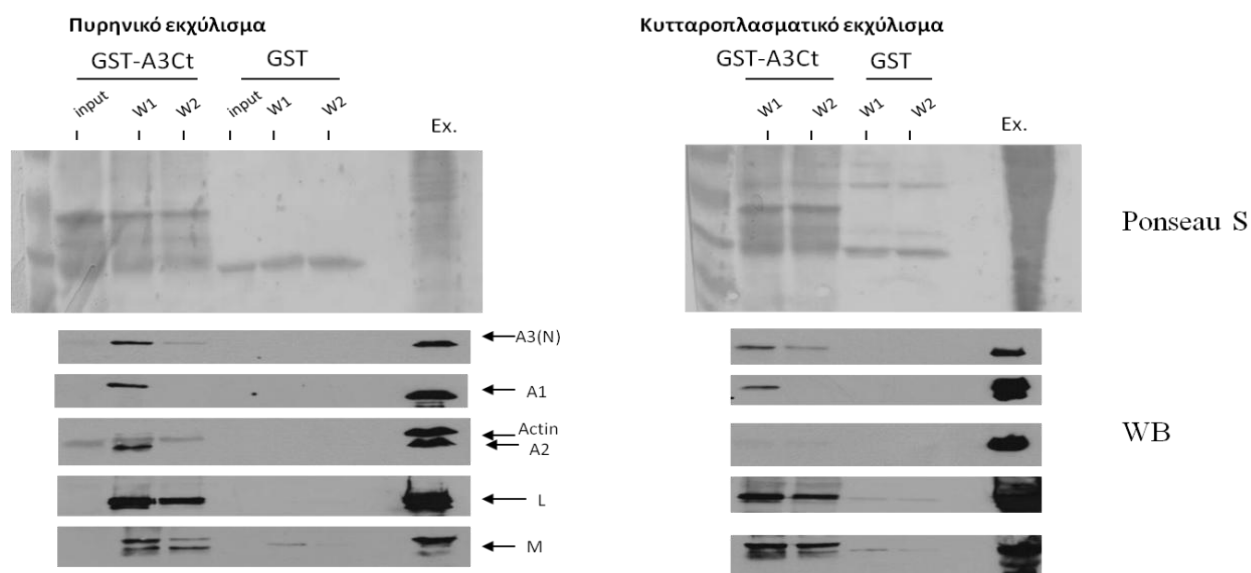
Γ2.2. Πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης (Pull down) μέσω ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κυτταρικά εκχυλίσματα

Οι πρώτες εφαρμογές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως νέων εργαλείων έγιναν προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα διασύνδεσης τους με τις ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP σε *in vitro* πειράματα (λαμβάνοντας υπόψη ότι το καρβοξυτελικό άκρο των hnRNP A/B διαφοροποιεί μεταξύ τους τα μέλη της ομάδας και εμπλέκεται σε διασυνδέσεις με άλλες πρωτεΐνες). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull-down) σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa (προέλευσης καρκίνου μήτρας) και σε εκχυλίσματα A549 (προέλευσης πνεύμονα), τόσο με την rec.GST-A3Ct (και για τις δύο κυτταρικές σειρές) όσο και με την rec.GST-A2 (μόνο για τη σειρά A549).

Επιπλέον στόχο διερεύνησης αποτέλεσε και η φύση των διαφαινόμενων διασυνδέσεων μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση αυξημένης αλατότητας καθώς και η διαμεσολάβηση ή μη RNA, στα πειράματα της πρωτεϊνικής καταβύθισης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πρωτεϊνικής καταβύθισης σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct συνδεδεμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης (Εικόνα 39). Για τον έλεγχο μη ειδικών διασυνδέσεων έγιναν

παράλληλες αντιδράσεις με τη χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST (αρνητικός μάρτυρας). Για κάθε κυτταρικό διαμέρισμα χωριστά, πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις των σφαιριδίων με δύο διαφορετικής αλατότητας διαλύματα, (150 και 300 mM NaCl), ώστε να ελεγχθεί η σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων.

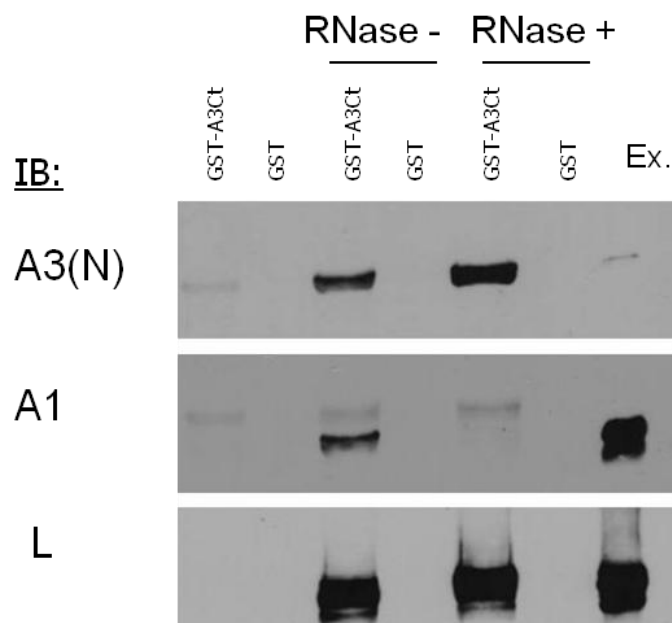


Εικόνα 39 Ανοσοχημική ταυτοποίηση (western blot) πρωτεϊνών hnRNP σε διασύνδεση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct και GST, σε πειράματα καταβύθισης με χρήση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Ανοσοχημικός έλεγχος με αντισώματα κατά των hnRNP A1, A2, A3, L, M και ακτίνης (Εκπλυση σφαιριδίων w1:150 και w2:300 mM NaCl). Ex: Κλάσμα (~1/20) πυρηνικού ή κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Χρώση Ponceau S για τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Έγινε ανοσοεντόπιση των ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B (hnRNP A1 και A2) σε ειδική διασύνδεση με την GST-A3Ct, αλλά όχι μιας γενικής πρωτεΐνης π.χ. β-ακτίνης. Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε ο σχηματισμός ομοδιμερών της hnRNP A3. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εμπορικό αντίσωμα αντι-hnRNP A3(N) που χρησιμοποιήθηκε δεν έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct, καθώς αναγνωρίζει επίτοπο που τοποθετείται στο αμινοτελικό άκρο της hnRNP A3, και επιτρέπει τον εύκολο εντοπισμό της ενδογενούς hnRNP A3. Ισχυρή διασύνδεση με την hnRNP A3Ct, επίσης, παρουσιάστηκε για δύο πρωτεΐνες hnRNP εκτός της ομάδας των A/B, των hnRNP L και hnRNP M. Η διασύνδεση αυτή διατηρείται και σε αυξημένη αλατότητα (300 mM NaCl) σε αντίθεση με την αισθητή μείωση των hnRNP A1, A2 και A3. Οι διασυνδέσεις του καρβοξυτελικού άκρου της

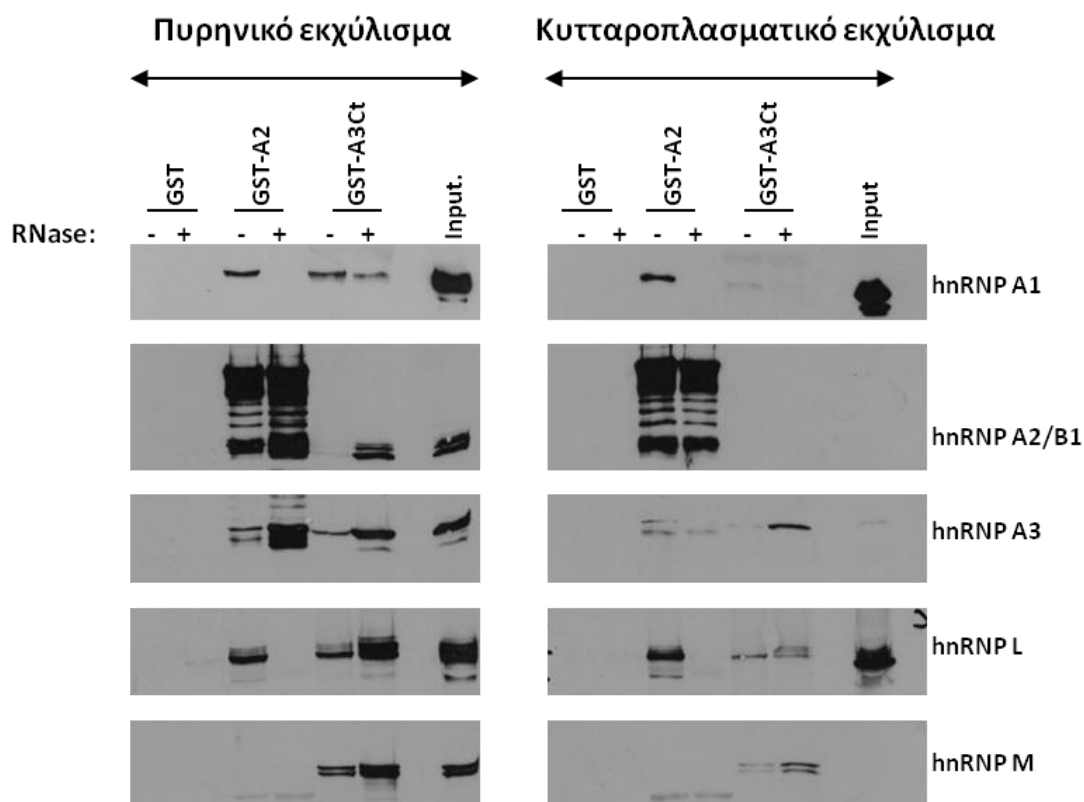
hnRNP A3 (A3Ct), με πρωτεΐνες εκτός της ομάδας A/B (hnRNP L και M) αποτελεί ένα νέο εύρημα που δεν έχει παρατηρηθεί για τις συγγενικές πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 [112, 361]. Όσον αφορά τα διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, παρατηρήθηκαν παρόμοιες διασυνδέσεις με αυτές του πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, με εξαίρεση την αλληλεπίδραση μεταξύ hnRNP A3Ct και hnRNP A2, λόγω δυσκολίας ανοσοεντόπισης της πρωτεΐνης hnRNP A2 στο κυτταρόπλασμα.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε κατά πόσο οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από την παρουσία ή όχι RNA. Πραγματοποιήθηκε νέα αντίδραση πρωτεϊνικής καταβύθισης, σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa με ή χωρίς προηγούμενη επίδραση με RNάση (Εικόνα 40). Το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια GST-A3Ct και σφαιρίδια GST (αρνητικός μάρτυρας), και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση, με χρήση αντισωμάτων έναντι των hnRNP A1, A3 και L. Στο κλάσμα του εκχυλίσματος χωρίς RNάση εμφανίστηκαν οι αναμενόμενες διασυνδέσεις (Εικόνα 40). Με τη χρήση RNάσης δεν επηρεάστηκαν οι διασυνδέσεις GST- A3Ct και hnRNP A3, καθώς και με τη hnRNP L, γεγονός που είναι σε αντιδιαστολή με τη διασύνδεση της hnRNP A1 η οποία ήταν σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη από την παρουσία RNA.



Εικόνα 40 Ανοσοχημική ταυτοποίηση (western blot) πρωτεϊνών hnRNP σε διασύνδεση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct και GST, σε πειράματα καταβύθισης με χρήση πυρηνικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Ανοσοχημικός έλεγχος με αντισώματα κατά των hnRNP A1, A3 και L (RNase-:χωρίς επίδραση RNάσης RNase+:με επίδραση RNάσης) Ex: Κλάσμα πυρηνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Για να εξεταστεί κατά πόσο οι διασυνδέσεις της GST-A3Ct με πρωτεΐνες hnRNP ανιχνεύονται και σε άλλα κυτταρικά συστήματα (εκτός των HeLa), χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης η καρκινική σειρά A549 του πνεύμονα. Επίσης, εκτός από την GST-A3Ct, διερευνήθηκαν και αλληλεπιδράσεις της ανασυνδυασμένης hnRNP A2 (GST-A2) με ενδογενείς πρωτεΐνες. Οι διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών, μελετήθηκαν με βάση την παρουσία ή μη RNA (+/- RNάση) σε εκχυλίσματα από τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Για την ταυτοποίηση των ειδικών αλληλεπιδράσεων, εξετάστηκε παράλληλα η αντίδραση πρωτεϊνικής καταβύθισης με χρήση σφαιριδίων με προσδεμένη την πρωτεΐνη GST. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση ήταν τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά HeLa (αντισώματα έναντι των hnRNP A1, A2/B1, A3, L και M). Το αντίσωμα έναντι της hnRNP A2/B1, σε αντίθεση με αυτό της hnRNP A3 (που προαναφέρθηκε), ανιχνεύει και την ανασυνδυασμένη -πλήρους μήκους- πρωτεΐνη GST-A2, γεγονός που δυσκολεύει τον εντοπισμό της ενδογενούς hnRNP A2 (Εικόνα 41).



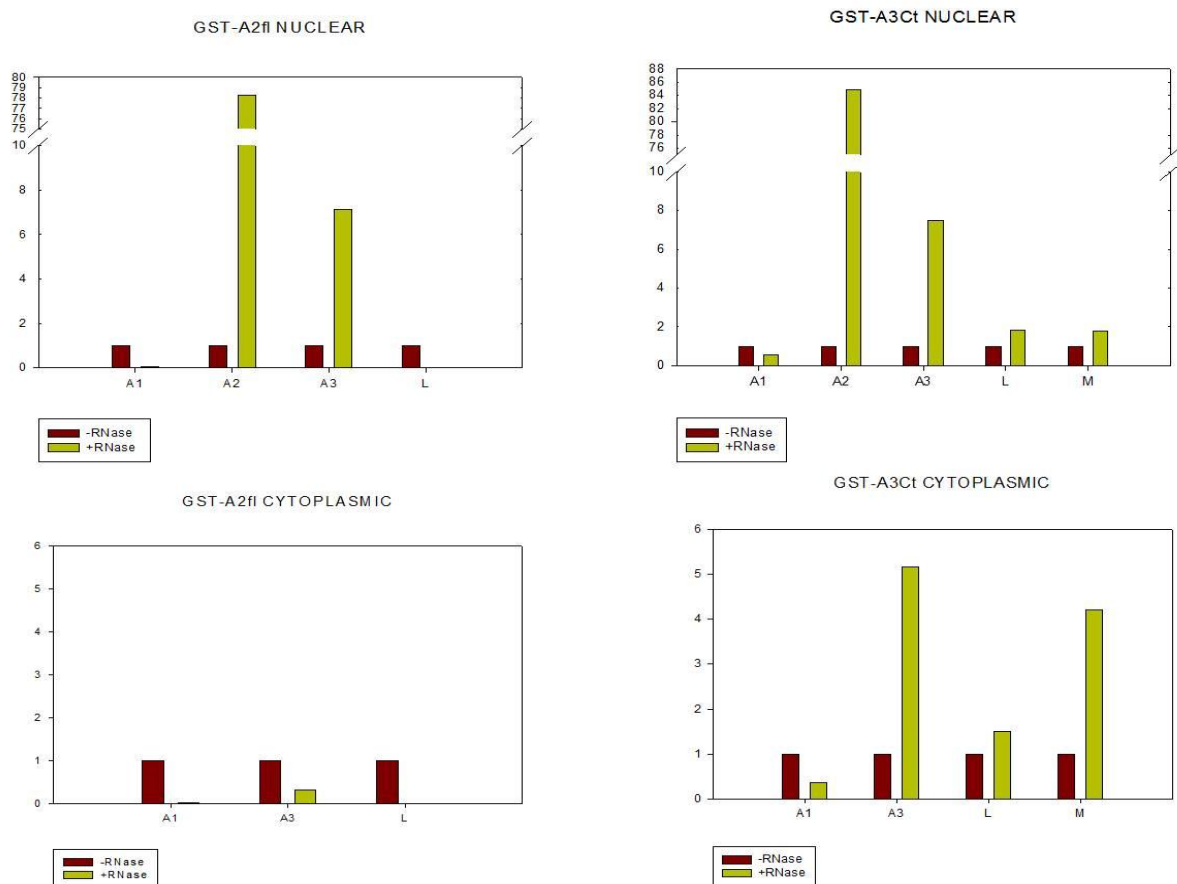
Εικόνα 41 Ανοσοχημική ταυτοποίηση (western blot) πρωτεϊνών hnRNP σε διασύνδεση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct, GST-A2 και GST, σε πειράματα καταβύθισης με χρήση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος κυττάρων A549. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοχημικός έλεγχος με αντισώματα κατά των hnRNP A1, A2/B1, A3, L και M (RNase-:χωρίς επίδραση RNάσης RNase+:με επίδραση RNάσης) Ex: Κλάσμα πυρηνικού ή κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Σε ότι αφορά την GST-A3Ct, οι διασυνδέσεις με ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP που είχαν παρατηρηθεί τόσο στο πυρηνικό όσο και στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα στη κυτταρική σειρά HeLa, ταυτοποιήθηκαν και στην περίπτωση των κυττάρων A549. Επισημαίνεται επίσης η σημαντική ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων με τις hnRNP A2/B1 και A3 μετά τη χρήση RNάσης, όπως και με την hnRNP M στο κυτταρόπλασμα.

Στις αλληλεπιδράσεις της ανασυνδυασμένης GST-A2 με ενδογενείς πρωτεΐνες, παρατηρήθηκε διασύνδεση με τις hnRNP A1, A3, L καθώς και με την ενδογενή hnRNP A2/B1. Λόγω της αντίδρασης του αντισώματος τόσο με την ενδογενή hnRNP A2/B1 όσο και την GST-A2, η ταυτοποίηση της αλληλεπιδράσης

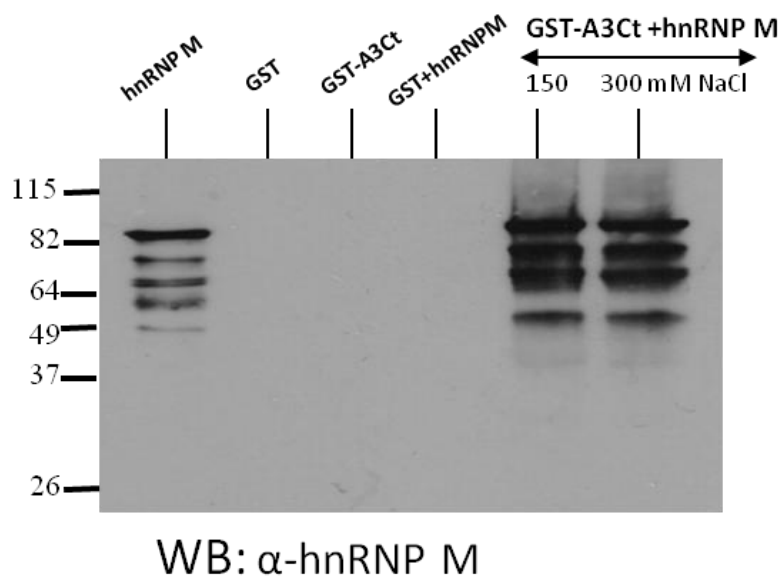
GST-A2 με hnRNP A2 στον πυρήνα έγινε αφαιρώντας ως υπόβαθρο (background) την ένταση το σήματος που μετρήθηκε στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα, με τη σύμβαση ότι η hnRNP A2 δεν ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 41). Με την επίδραση RNάσης παρατηρήθηκε μείωση της διασύνδεσης της GST-A2 με την hnRNP A1 και L τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα.

Οι πρωτεϊνικές ζώνες που προσδιορίστηκαν ανοσοχημικά ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια προγράμματος μέτρησης οπτικής πυκνότητας (ImageQuant) προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα της διασύνδεσης των GST-A3CT και GST-A2 με ενδογενείς πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων παρουσία ή μη του RNA. Στην Εικόνα 42 παρουσιάζεται το εύρος των αλληλεπιδράσεων με και χωρίς επίδραση RNάσης για κάθε πρωτεΐνη χωριστά και με αναγωγή των τιμών χωρίς επίδραση RNάσης στη μονάδα, όπου φαίνεται καθαρά η μεγάλη ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων που αφορούν τις hnRNP A2 και A3 με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με τη χρήση RNάσης (εξάιρεση η διασύνδεση της GST-A2 με την hnRNP A3 στο κυτταρόπλασμα).



Εικόνα 42 Διαγράμματα συσχέτισης αλληλεπιδράσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A2 και GST-A3Ct με ενδογενείς πρωτεΐνες εκχυλίσματος A549 από τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

Με τα πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης σε κυτταρικά εκχυλίσματα, διαπιστώθηκε η ικανότητα διασύνδεσης της GST-A3Ct και με την hnRNP M, για την οποία υπήρχε στη διάθεσή μας ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Το γεγονός αυτό επέτρεψε το χαρακτηρισμό της διασύνδεσης μεταξύ δύο ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, των GST-A3CT και hnRNP M. Μελετήθηκε η ισχύ της διασύνδεσης, σε διαλύματα διαφορετικής αλατότητας (150 mM και 300 mM NaCl), ενώ πραγματοποιήθηκαν παράλληλες αντιδράσεις με πρωτεΐνη GST ως αρνητικό μάρτυρα. Η ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hnRNP M (Εικόνα 43) κατέδειξε την δυνατότητα άμεσης αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών χωρίς τη διαμεσολάβηση άλλης πρωτεΐνης. Συμπεραίνεται ότι η *in vitro* διασύνδεση του καρβοξυτελικού άκρου της hnRNP A3 με την hnRNP M είναι άμεση (διασύνδεση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) και ισχυρή, καθώς δεν επηρεάζεται με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος.



Εικόνα 43 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) πρωτεϊνικής καταβύθισης με χρήση της ανασυνδυασμένης GST-A3Ct σε διάλυμα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης hnRNP M, με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hnRNP M.

Γ2.3 Παραγωγή νέου αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3

Στα πλαίσια της ανάπτυξης ειδικών εργαλείων για τη μελέτη των βιοχημικών/μοριακών χαρακτηριστικών των hnRNP και ιδίως της hnRNP A3, έγινε προσπάθεια για την παραγωγή ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της hnRNP A3 σε κουνέλια, με τη χρήση της ανασυνδυασμένης GST-A3Ct.

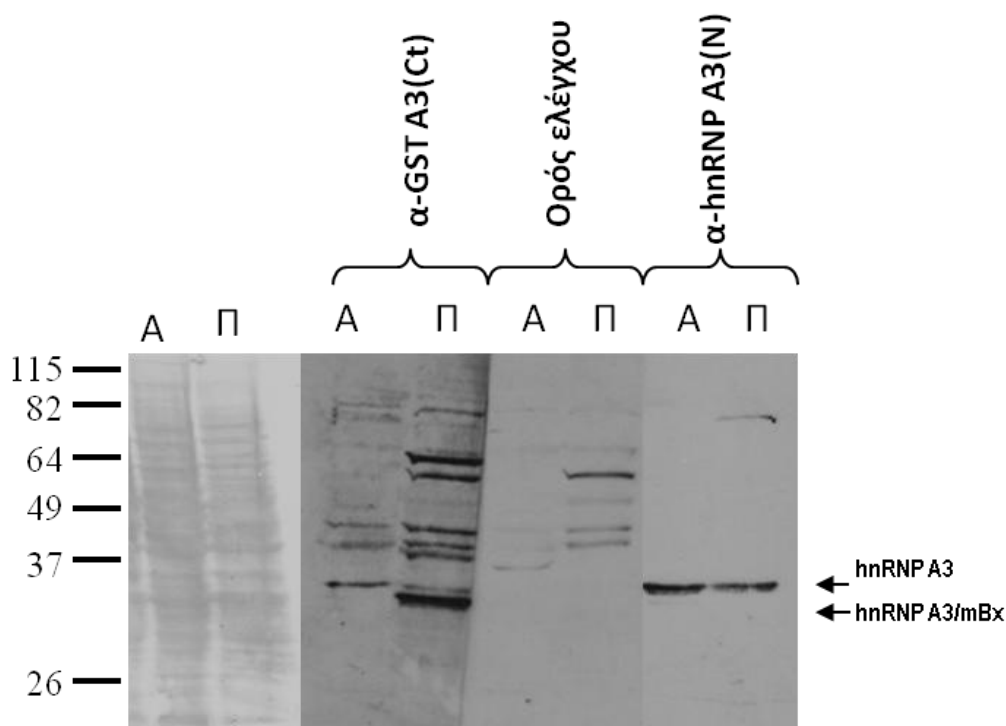
Όπως προαναφέρθηκε, το μοναδικό εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα έναντι της hnRNP A3 (ab50949 Abcam), που χρησιμοποιήθηκε στα παραπάνω πειράματα, είναι πολύκλωνικό αντίσωμα κουνελιού τύπου IgG. Αντιδρά αποκλειστικά με μια ισομορφή της hnRNP A3 μοριακού βάρους περίπου 42 kDa, τόσο σε άνθρωπο όσο και σε ποντίκι. Ο επίτοπος που αναγνωρίζει το αντίσωμα τοποθετείται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και δεν ανιχνεύει την ανασυνδυασμένη GST-A3Ct που αντιστοιχεί στο καρβόξυτελικό άκρο της hnRNP A3, καθώς και άλλες ισομορφές της πρωτεΐνης, όπως την A3/mBx του ποντικού [362], που δεν περιλαμβάνουν τον επίτοπο. Κρίθηκε λοιπόν αναγκαία η παραγωγή νέων αντισωμάτων κατά της hnRNP A3.

Η δοκιμή για την παρασκευή νέων αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3, έγινε με την ανοσοποίηση τριών κουνελιών, χρησιμοποιώντας σαν ανοσογόνο υλικό την ανασυνδυασμένη GST-A3Ct, η οποία απομονώθηκε από πήκτωμα SDS-PAGE και ενέθηκε στα ζώα. Προηγήθηκε αιμοληψία από κάθε ζώο για έλεγχο του ορού για τυχόν ύπαρξη αντισωμάτων (ορός ελέγχου). Ακολουθήθηκε ένα σχήμα 3 ανοσοποιήσεων, με διαφορά 3 εβδομάδων περίπου μεταξύ των ενέσεων με GST-A3Ct. Δέκα ημέρες μετά την τρίτη ένεση πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και έλεγχος του ορού του αίματος για την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της hnRNP A3.

Ένας πρώτος έλεγχος των ορών έγινε με ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε ολικά εκχυλίσματα από κύτταρα προέλευσης ανθρώπου (A549) και ποντικού (HTC). Τα αντισώματα του ορού από το κουνέλι νούμερο 2 (αλλά όχι από τα 1 και 3) αναγνώρισαν ενδογενείς πρωτεΐνες στο μέγεθος που αναμένεται για την hnRNP A3, τόσο στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά όσο και σε αυτήν του ποντικού, με έλλειψη αντίστοιχης αντίδρασης στον ορό ελέγχου.

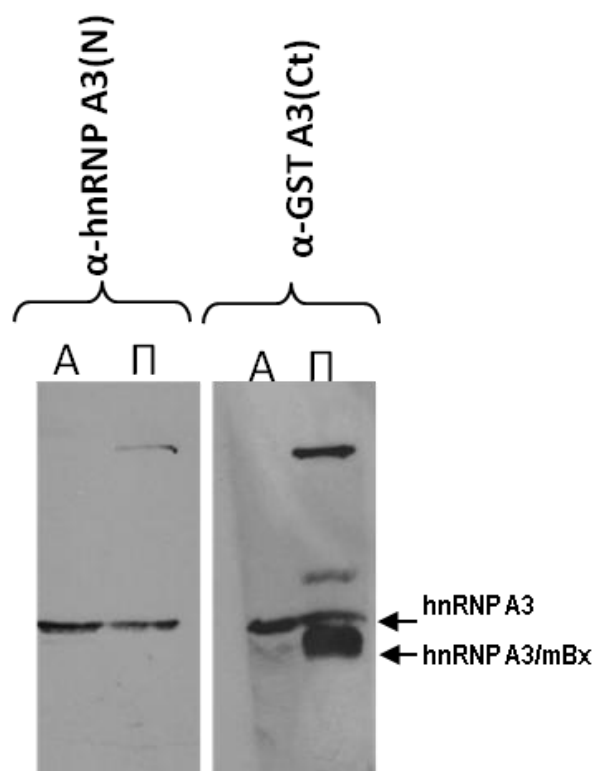
Στο ζώο νούμερο 2, έγινε μια τέταρτη ένεση ανοσογόνου υλικού (boost) και με την παρέλευση δέκα ημερών αφαιμάχθηκε για να ληφθεί ο ορός, οποίος ελέγχθηκε εκ νέου με πείραμα ανοσοαποτύπωσης, σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από ανθρώπινα κύτταρα A549 και κύτταρα αρουραίου Novikoff. Η αναγνώριση

ενδογενούς πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μέγεθος από αντισώματα του ορού, φαίνεται στην Εικόνα 34 όπου η παρουσία της πρωτεΐνης hnRNP A3 στα εκχυλίσματα ταυτοποιήθηκε με την άμεση αντιπαραβολή με το εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα κατά της hnRNP A3 (Abcam), ικανό να δώσει αντίδραση αποκλειστικά με την μεγαλύτερου μοριακού βάρους (42 κDa) ισομορφή της hnRNP A3, τόσο στα ανθρώπινα κύτταρα όσο και στα κύτταρα των τρωκτικών. Από τον έλεγχο αυτό έγινε σαφής η παρουσία, στον νέο ορό, αντισωμάτων και κατά της μικρότερου μοριακού βάρους (38 κDa) ισομορφής A3/mBx, η οποία είναι και η κύρια μορφή της hnRNP A3 στα τρωκτικά, με προφανή την παντελή έλλειψη της στα ανθρώπινα κύτταρα. Ταυτόχρονα, έγινε εμφανής και η παρουσία άλλων αντιδράσεων με τα αντισώματα του ορού, εκ των οποίων οι περισσότερες είναι μη ειδικές εφόσον εμφανίζονται και στον ορό ελέγχου (Εικόνα 44) Με αυτό τον έλεγχο επιβεβαιώθηκε η παρουσία αντισωμάτων έναντι των δύο ισομορφών της hnRNP A3 στον ορό ανοσοποίησης.



Εικόνα 44 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε εκχυλίσματα κυτταρικής σειράς ανθρώπου A549 (A) και αρουραίου Novikoff (Π) (ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης) με ορό από ανοσοποιημένο κουνέλι (α -GSTA3Ct), ορό από το κουνέλι πριν την ανοσοποίηση (ορός ελέγχου) και το εμπορικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3(N). Με βέλη σημειώνονται οι θέσεις των ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP A3 και A3/mBx (ειδική για τρωκτικά).

Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητη η απομόνωση των ειδικών για hnRNP A3 αντισωμάτων, με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. Για τον σκοπό αυτό ο ορός επώαστηκε με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-A3Ct σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε η έκλουση των ειδικά προσδεδεμένων αντισωμάτων με διάλυμα γλυκίνης. Με τη διαδικασία αυτή ενισχύθηκε τόσο ο τίτλος όσο και η ειδικότητα του ορού των αντισωμάτων έναντι της hnRNP A3 (Εικόνα 45). Επισημαίνεται η ικανότητα αναγνώρισης από τα απομονωμένα αντισώματα του ορού και δύο άλλων πρωτεϊνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους της hnRNP A3, στα εκχυλίσματα των κυττάρων αρουραίου αλλά όχι του ανθρώπου. Η ταυτότητα των πρωτεϊνών αυτών δεν έχει επί του παρόντος χαρακτηριστεί. Η εξειδίκευση που παρουσιάζει το νέο αυτό αντίσωμα έναντι του εμπορικού, το καθιστά χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη της βιολογικής σημασίας τόσο της πρωτεΐνης hnRNP A3 όσο και των ισομορφικών τύπων της, στα κύτταρα των θηλαστικών.



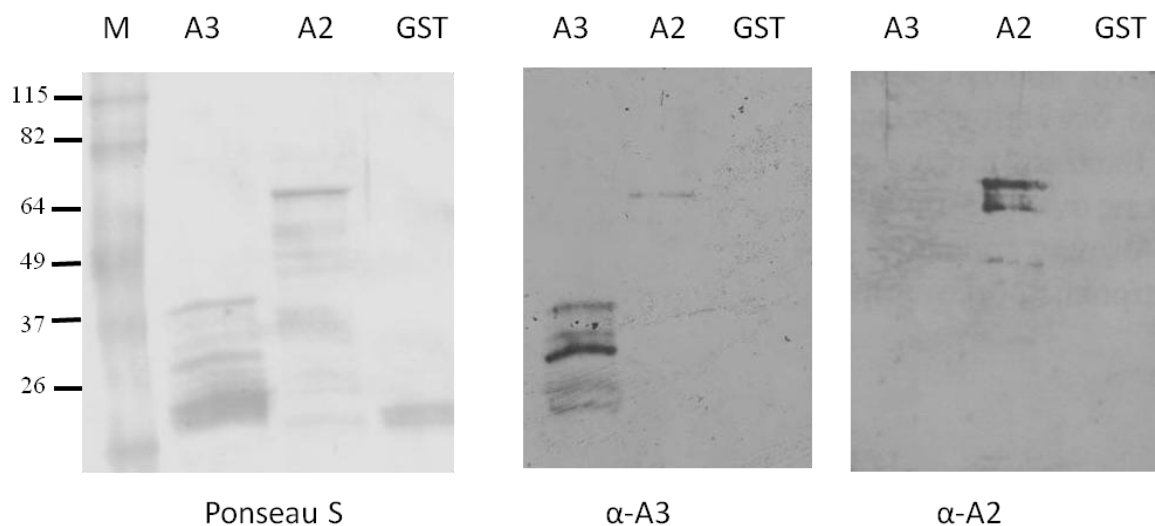
Εικόνα 45 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτταρικής σειράς ανθρώπου A549 (A) και αρουραίου Novikoff (Π) με το καθαρισμένο αντίσωμα -με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας του ορού από το κουνέλι νούμερο. 2- και το εμπορικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3(N). Με βέλη σημειώνονται οι θέσεις των ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP A3 και A3/mBx (ειδική για τρωκτικά).

Γ3 Πρωτεΐνες hnRNP ως πιθανοί βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα - Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σε ορούς αίματος ασθενών

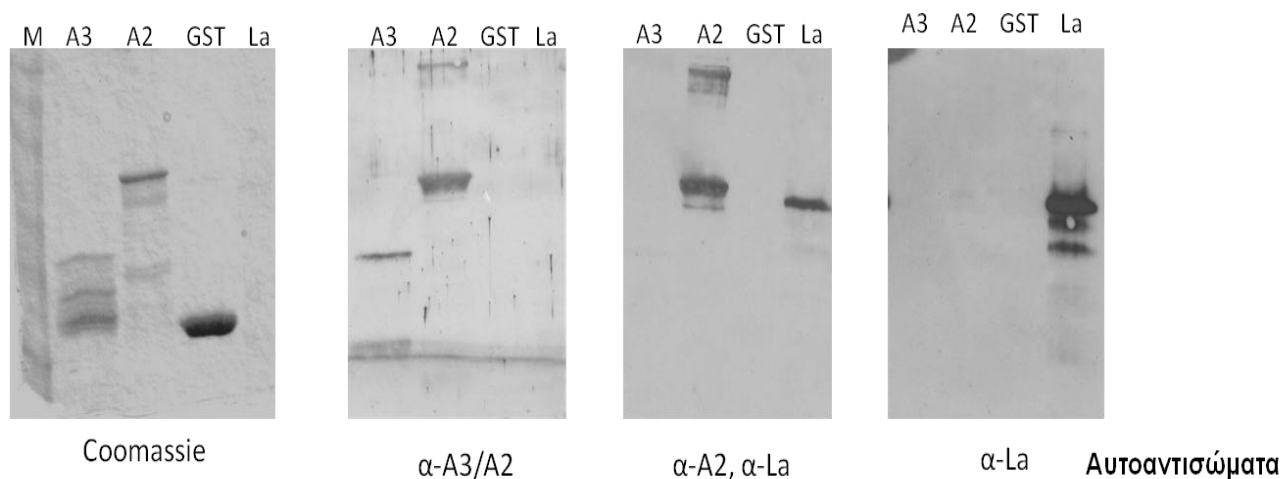
Σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις [320], πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα στον καρκίνο αποτελούν συχνά στόχους αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύονται στον ορό του αίματος των ασθενών. Η ανίχνευση τέτοιων αντισωμάτων μπορεί να αποτελέσει, σε συνδυασμό και με άλλους βιοδείκτες, ένα αξιόπιστο δείκτη για την παρουσία νεοπλασίας και μάλιστα σε πρώιμα στάδια. Λαμβάνοντας υπόψη την παρατηρούμενη υπερέκφραση της hnRNP A2/B1 σε πρώιμα στάδια καρκίνου του πνεύμονα, όπως επίσης και της hnRNP A3 στις δικές μας μελέτες, θεωρήθηκε

σκόπιμη η χρησιμοποίηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A/B (GST-A2 ή -A3) ως ειδικών αντιγονικών πρωτεϊνών με στόχο την διερεύνηση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων στον ορό αίματος ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Παράλληλη διερεύνηση πραγματοποιήθηκε και σε ασθενείς με άλλους τύπους καρκίνου, άλλες παθολογικές καταστάσεις (εκτός καρκίνου) και υγιή άτομα. Ο ορός αίματος ασθενών αποτελεί το πλέον εύληπτο βιολογικό υλικό, που λαμβάνεται με μη παρεμβατικές μεθόδους, και παρέχει άμεσες εφαρμογές διαγνωστικής και προγνωστικής εμβέλειας.

Σε ένα πρώτο στάδιο, διαπιστώθηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western blot) η ικανότητα αναγνώρισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A3Ct και GST-A2, αλλά όχι της GST (αρνητικός μάρτυρας), από διαθέσιμα αντισώματα κατά των hnRNP A3 (νεοπαραχθέν αντίσωμα, Ενότητα 2) και hnRNP A2 (εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα) αντίστοιχα (Εικόνα 46), καθώς και από αυτοαντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP A/B που έχουν ταυτοποιηθεί σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα και έχουν χαρακτηριστεί στο εργαστήριό μας [277] (Εικόνα 47). Παράλληλα εξετάστηκε και η ικανότητα αναγνώρισης ενός γνωστού αυτοαντιγόνου, πρωτεΐνη La, για την οποία υπάρχει διαθέσιμη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

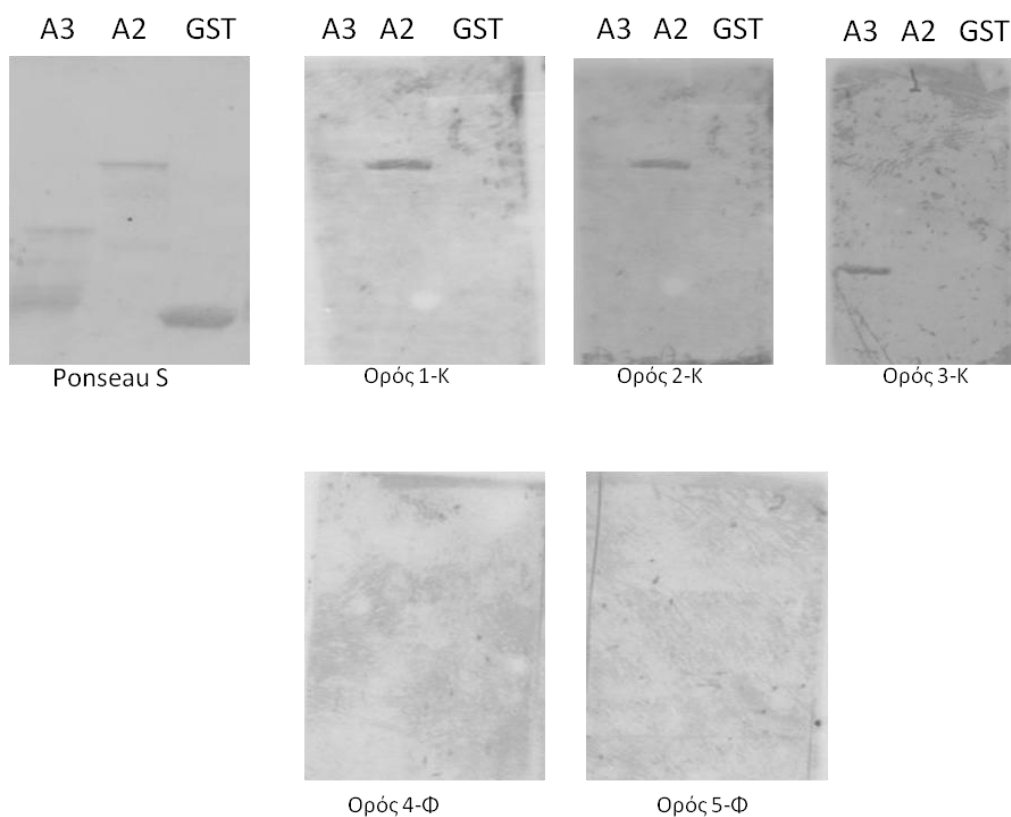


Εικόνα 46 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A3Ct (A3), GST-A2 (A2) και GST με το εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα έναντι της hnRNP A2 και το νέο αντίσωμα έναντι της A3. Με χρώση Ponceau S παρουσιάζονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μετά το διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



Εικόνα 47 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A3Ct (A3), GST-A2 (A2), GST και La με χαρακτηρισμένους ορούς που περιέχουν αυτοαντισώματα γνωστής ειδικότητας (αντι-A3/A2, αντι-A2, αντι-La), από ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Με χρώση του πηκτώματος SDS-PAGE με Coomassie παρουσιάζονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Ακολούθησε η διερεύνηση της πιθανής παρουσίας ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών hnRNPA2 και hnRNPA3 σε ορό αίματος ασθενών. Σε συνεργασία με το Νοσοκομείο «Σωτηρία» ελήφθησαν συνολικά 76 οροί. Οι 33 προήλθαν από ασθενείς με καρκίνο, 24 (ποσοστό 72%) εκ των οποίων με καρκίνο του πνεύμονα. Από τους υπόλοιπους ορούς, οι 37 ήταν από ασθενείς με μη καρκινική παθολογία και 6 από υγιή άτομα. Η διερεύνηση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων στους ορούς έγινε με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης στις οποίες μεταφέρθηκαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-A2 και GST-A3Ct (Εικόνα 48), όπως και στην εικόνα 47.



Εικόνα 48 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνες που φέρουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-A3Ct (A3), GST-A2 (A2) και GST με χρήση ορών αίματος ασθενών με καρκίνο (K) και με μη καρκινική παθολογία (Φ). Με χρώση Ponceau S παρουσιάζονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μετά το διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

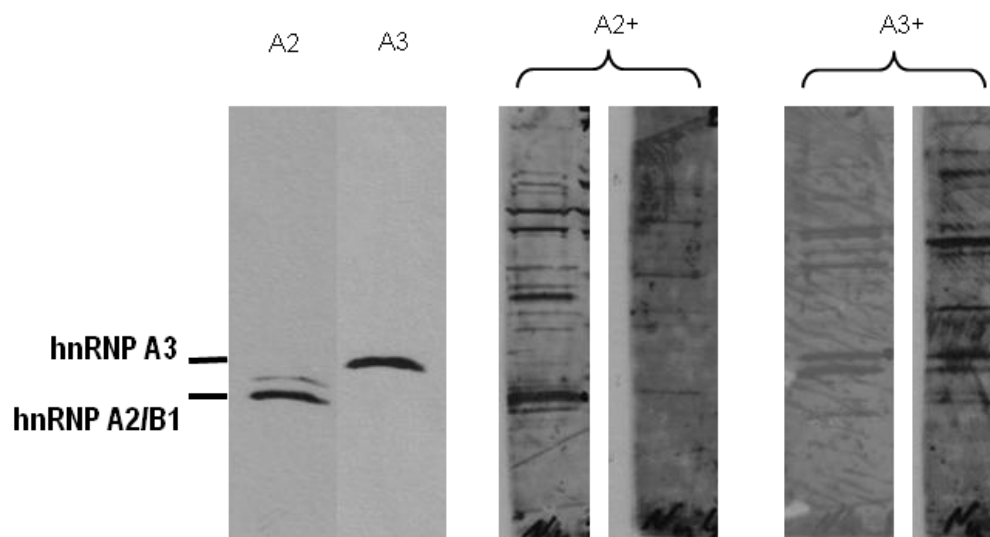
Στο σύνολο των 76 ορών που αναλύθηκαν με αυτή τη μέθοδο, βρέθηκαν θετικοί για παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά της hnRNP A2 και/ή hnRNP A3 19 οροί στο σύνολο των 33 ασθενών με καρκίνο (ποσοστό 58%). Από αυτούς, 15 οροί προήλθαν από τους 24 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (ποσοστό 63%). Επίσης βρέθηκαν θετικοί σε αυτοαντισώματα 7 οροί από τους 37 ασθενείς με μη καρκινική παθολογία (ποσοστό 19%), ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα υγιή άτομα αυτοαντισώματα έναντι των πρωτεϊνών A2 και A3 (Πίνακας 10).

	Αριθμός ορών που εξετάστηκαν	Θετικοί για α-A2 και/ή A3 (ποσοστό)
Ασθενείς με καρκίνο	33	19 (58%)
Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα	24	15 (63%)
Ασθενείς με μη καρκινική παθολογία	37	7 (19%)
Υγιείς	6	0 (0%)
Σύνολο	76	26 (34%)

Πίνακας 10 Αποτελέσματα αντίχνευσης αυτοαντισωμάτων έναντι των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A2 και A3 στον ορό αίματος ασθενών.

Αυτοαντισώματα αποκλειστικά έναντι της hnRNP A2 εμφάνισαν 11 οροί από τους 76 (14,5%) εκ των οποίων οι 4 από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (16,6%), ενώ για hnRNP A3 9 οροί (11,8%), 5 εκ των οποίων ήταν από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (20,8%). Τα ελαφρώς αυξημένα ποσοστά παρουσίας αυτοαντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης hnRNP A3, σε σχέση με την hnRNP A2, για τον καρκίνο του πνεύμονα, είναι σε γενική συμφωνία με τα ποσοστά υπερέκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, όπως μετρήθηκαν στα ζεύγη καρκινικών-φυσιολογικών βιοψιών από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και παρουσιάστηκαν στην Ενότητα Γ1. Σε ποσοστό περίπου 8% (6/76) των ορών εντοπίστηκαν αυτοαντισώματα έναντι και των δύο πρωτεϊνών A2 και A3, οι 5 εκ των οποίων προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (20,8%).

Οι θετικοί οροί για παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3, εξετάστηκαν με στόχο να διερευνηθεί κατά πόσο τα αυτοαντισώματα είναι ικανά να αντιδράσουν και με τις ενδογενείς πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πυρηνικό εκχύλισμα από την καρκινική σειρά του πνεύμονα A549. Ο ανοσολογικός εντοπισμός των πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3 στα κυτταρικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντισωμάτων αναφοράς αντι-hnRNP A2/B1 και αντι-hnRNP A3 (Abcam) και εντοπισμό των ειδικών αντιγόνων (Εικόνα 49).

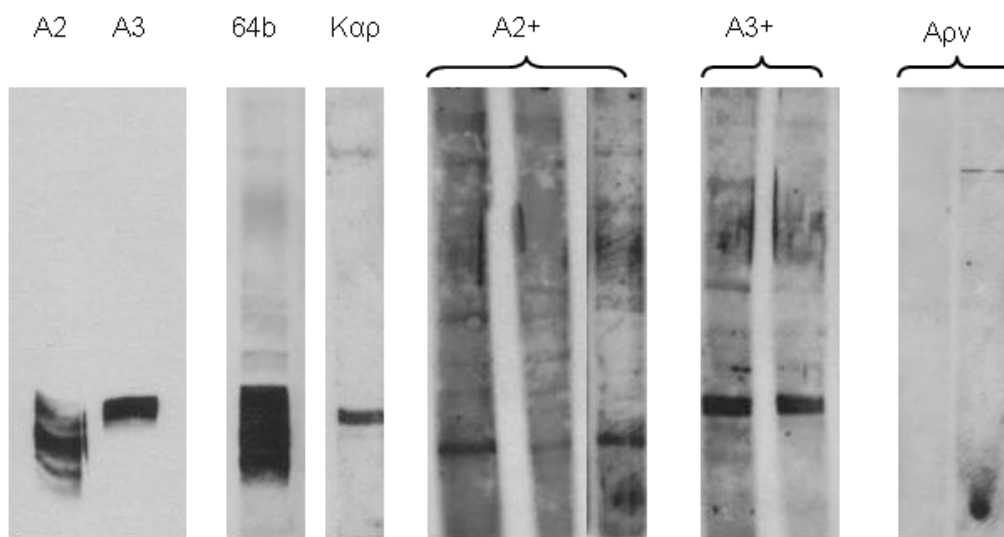


Εικόνα 49 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) πρωτεϊνών από πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων A549 με χρήση ορών από ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί στην ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A3 και A2 (A3+ και A2+), σε άμεση σύγκριση με τη χρήση αντισωμάτων αναφοράς έναντι των hnRNP A2/B1 και A3.

Η παράλληλη ανοσοαποτύπωση των μεμβρανών με τους θετικούς ορούς για παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A2 και A3 έδειξε την παρουσία αντιδράσεων αντίστοιχου μοριακού βάρους με αυτές των αντισωμάτων αναφοράς. Ταυτόχρονα όμως κατέδειξε ότι εμπεριέχονται και αυτοαντισώματα έναντι άλλων πρωτεϊνών του πυρήνα.

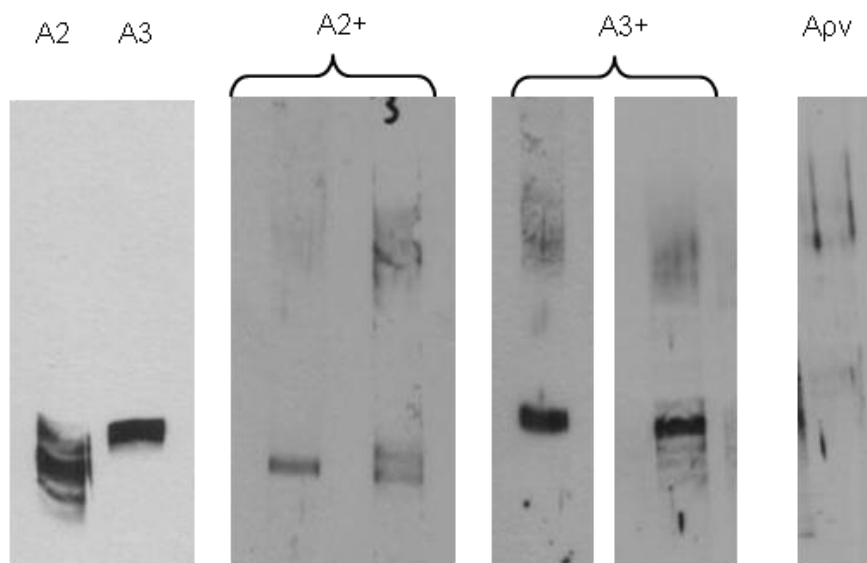
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία αυτοαντισωμάτων ικανών να αντιδράσουν με τις ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP A2/B1 και A3 οι ίδιοι οροί εξετάστηκαν σε μεμβράνες στις οποίες έγινε μεταφορά πρωτεϊνικού υλικού εμπλουτισμένου σε πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA (RBPs) -και κατ' επέκταση πρωτεΐνες hnRNP- που απομονώθηκαν από εκχύλισμα κυττάρων αρουραίου Novikoff με τη μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας σε σφαιρίδια κυτταρίνης-μονώκλωνου DNA. Η επιλογή των κυττάρων Novikoff έγινε προκειμένου να υπάρξει εμπλουτισμός και στις δύο isoμορφές της hnRNP A3. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 50, οι αντιδράσεις έναντι των ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3 με τα αυτοαντισώματα των ορών, ενισχύθηκαν μετά την εφαρμογή του εμπλουτισμένου σε hnRNP A/B κυτταρικού υλικού, καθώς ταυτοποιήθηκε η παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης μονόκλωνου DNA με τα μοριακά βάρη των hnRNP A2 και A3. Επίσης εξετάστηκαν και οροί

αρνητικοί για την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A2 και A3 οι οποίοι δεν αντέδρασαν με το ίδιο πρωτεϊνικό υλικό.



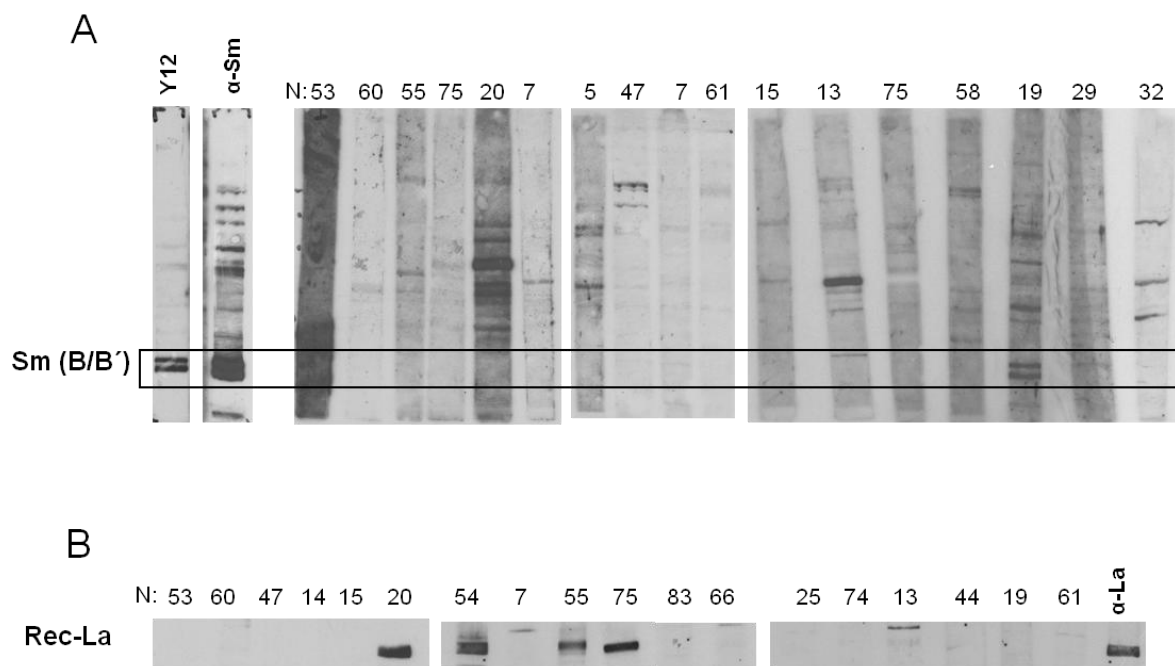
Εικόνα 50 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνες με εμπλουτισμένο σε RBPs πρωτεϊνικό υλικό, με χρήση ορών αίματος από ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για αυτοαντισώματα έναντι των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3, καθώς και αρνητικών ορών. Άμεση σύγκριση με τη χρήση αντισωμάτων αναφοράς (εμπορικά αντισώματα έναντι των hnRNP A2 και A3) και ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα (64b και Kap) που περιέχουν αντίστοιχες ειδικότητες αυτοαντισωμάτων.

Η τελική επιβεβαίωση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων ικανών να αναγνωρίσουν ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP A/B σε ορούς ασθενών με καρκίνο έγινε μετά την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των ειδικών για hnRNP A3 και A2 αυτοαντισωμάτων του ορού με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας. Οι οροί αρχικά επώαστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης που φέρουν σε διασύνδεση πρωτεΐνη GST, για την απομάκρυνση μη ειδικών συστατικών του ορού και στη συνέχεια με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης που φέρουν μείγμα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-hnRNPA3Ct και GST-hnRNPA2. Η έκλυση των ειδικά προσδεδεμένων αυτοαντισωμάτων από τα σφαιρίδια έγινε με την προσθήκη διαλύματος γλυκίνης (Υλικά και Μέθοδοι, B8). Η ανοσοαποτύπωση παρόμοιων μεμβρανών με αυτές της Εικόνας 50 με τα εκλουσμένα αυτοαντισώματα, επιβεβαίωσε την παρουσία αυτοαντισωμάτων ικανών να αντιδράσουν με τις ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP A2 και A3 (Εικόνα 51).



Εικόνα 51 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνες με εμπλουτισμένο σε RBPs πρωτεϊνικό υλικό, με χρήση ορών αίματος από ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για αυτοαντισώματα έναντι των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3, καθώς και αρνητικών ορών. Άμεση σύγκριση με τη χρήση αντισωμάτων αναφοράς (εμπορικά αντισώματα έναντι των hnRNP A2 και A3).

Επειδή είναι γνωστή η σχέση μεταξύ αυτοάνοσων νοσημάτων και αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών hnRNP [277], εξετάστηκε η τυχόν παρουσία δύο εκ των πλέον συχνών αυτοαντισωμάτων, των αντι-Sm και αντι-La (χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα για ερυθρηματώδη λύκο και σύνδρομο Sjogren's αντίστοιχα) στον ορό των ασθενών, ως μια πρώτη ένδειξη τυχόν συνύπαρξης αυτοάνοσου νοσήματος στους ασθενείς με καρκίνο. Το αυτοαντιγόνο La, ή αλλιώς SS-B (Sjogren syndrome antigen B), είναι φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη με μέγεθος 48 kDa, με ικανότητα πρόσδεσης σε RNA, πρόδρομα προϊόντα της πολυμεράσης III (πρόδρομα μόρια 5S και tRNA) [363]. Το αυτοαντιγόνο Sm αποτελείται από το σύνολο 7 πρωτεϊνών (B/B', D1, D2, D3, E, F, G) οι οποίες συγκροτούν τον κοινό πυρήνα των U1, U2, U4 και U5 μικρών πυρηνικών ριβονουκλεϊκών συμπλόκων (snRNP) του ματισματοσώματος και διασυνδέονται με τα snRNA μόρια [364]. Γι' αυτό το σκοπό εξετάστηκε το σύνολο των ορών σε πειράματα ανοσοσύτωσης, με αντιγονικό υλικό πυρηνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς A549, για παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Sm και ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης La (Εικόνα 52).



Εικόνα 52 A: Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνες που φέρουν πυρηνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς A549 με χρήση ορών αίματος από ασθενείς, σε άμεση σύγκριση με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση αντισωμάτων αναφοράς αντι-Sm (Y12, α-Sm). B: Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνες που φέρουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη La με χρήση ορών αίματος από ασθενείς, σε άμεση σύγκριση με τη χρήση αυτοαντισώματος La από ορό ασθενούς με αυτοάνοσο νόσημα (α-La). Με κόκκινο ορίζονται οι θέσεις των αντιγόνων.

Στο σύνολο των 19 ορών με παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των hnRNP A2 και/ή A3, που προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο, αναγνωρίστηκαν 3 οροί (14,2%) θετικοί για την παρουσία αντι-La αυτοαντισωμάτων και 2 οροί (10,5%) θετικοί για την παρουσία αντι-Sm. Ένας τέταρτος ορός που ανιχνεύθηκε θετικός σε αντι-La αυτοαντισώματα, προερχόταν από ασθενή με πνευμονία. Οι 3 θετικοί σε αντι-La αυτοαντισώματα οροί, προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, και μάλιστα ήταν θετικοί για την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι και των δύο hnRNP A/B πρωτεϊνών. Για τους 2 ορούς που εμφάνισαν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Sm, μόνο ο ένας προέρχεται από ασθενή με καρκίνο στον πνεύμονα. Γενικά, η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3, σε ορούς αίματος ασθενών με καρκίνο, δε φάνηκε να συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη αυτοάνοσου νοσήματος, γεγονός όμως που δε μπορεί να αποκλειστεί με βεβαιότητα. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή όχι αυτοάνοσου νοσήματος στους ασθενείς είναι απαραίτητη και η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν οι ασθενείς.

Οι προοπτικές για περαιτέρω επέκταση της μελέτη αφορούν στην εφαρμογή της μεθοδολογίας ELISA για ανάλυση ορών ασθενών σε μεγάλη κλίμακα και ο προσδιορισμός του δείκτη ευαισθησίας και εξειδίκευσης των αυτοαντισωμάτων κατά πρωτεϊνών hnRNP A/B. Στη συνέχεια, και εφόσον διαφαίνεται η αξιοπιστία του νέου βιοδείκτη, θα επιχειρηθεί η συσχέτιση του και με την παρουσία άλλων βιοδεικτών, καθώς και με την εξέταση ορών ασθενών υψηλού κινδύνου (π.χ.καπνιστές).

Παρουσιάζεται συγκεντρωτικός πίνακας όλων των ορών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη με την κλινική διάγνωση κάθε ασθενούς, καθώς και την παρουσία αυτοαντισωμάτων: αντι-hnRNP A2, αντι-hnRNP A3, αντι-La και αντι-Sm.

Πίνακας 11 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για την παρουσία αυτοαντισωμάτων σε ορούς από ασθενείς με καρκίνο.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΟΡΟΥ	αντι-hnRNP A2	αντι-hnRNP A3	αντι-La αντι-Sm	Διάγνωση
2				Καρκινικά Κύτταρα
7	+	+		Καρκίνος πνεύμονα
10				ΜΜΚΠ
12		+		ΜΜΚΠ
13	+			Καρκ. πνεύμονα, Καρκ. τραχήλου
15	+	+		ΜΜΚΠ
16		+		Καρκίνος μαστού
18				Καρκ. πνεύμονα, αναπνευσ. λοίμωξη
19	+		Sm	Σεμίνωμα (Καρκίνος)
25	+			ΜΜΚΠ
28				ΜΜΚΠ
29	+		Sm	Καρκίνος Πνεύμονα
33				Καρκ. μαστού, ΧΑΠ
34				Καρκίνος προστάτη
37				Μεταστατικό ΜΜΚΠ
40		+		Καρκ. στομάχου με ηπατικές μεταστάσεις
44		+		Αδενοκαρκίνωμα
47		+		Καρκ. Μυελού
49				Πνευμονία, Καρκ. προ 2ετίας με λοβοεκτομή
50				ΜΜΚΠ
54	++	+	La	ΜΜΚΠ
55	+	+	La	ΜΜΚΠ
58		+		ΜΜΚΠ
60		+++		Καρκίνος πνεύμονα
61	+			Πλακώδες Καρκ. πνεύμονα

62				Παλιό Καρκ.
64				ΜΜΚΠ
66		+		Καρκίνος
67				Αδενοκαρκίνωμα
68				Πλακώδες καρκ.
73				Καρκ.
75	+	+	La	Καρκίνος πνεύμονα
83		+		Καρκίνος πνεύμονα

Πίνακας 12 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για την παρουσία αυτοαντισωμάτων σε ορούς από ασθενείς με πάθηση εκτός καρκίνου, και υγιή άτομα.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΟΡΟΥ	αντι-hnRNP A2	αντι-hnRNP A3	αντι-La αντι-Sm	Διάγνωση
1				Πνευμονία
3				αιματολογικό
4				ΧΑΠ
5	+			Πνευμονία
6				Φυσιολογικό
8				Πλευριτική συλλογή
9				Εμπύημα
11				Πνευμονία
14	+			Λοίμωξη αναπνευστικού
17				Καλοήθες φύλλωμα
20			La +++	Πνευμονία
21				Αρρυθμίες, Διάμεση πνευμονοπάθεια
22				Φυσιολογικό
23				Φυσιολογικό
24				ΧΑΠ
26	+			ΧΑΠ
30				Φυσιολογικό
32	+			Απόστημα
35				Βρογχ. άσθμα
36				ΧΑΠ-ΧΑΑ , αναπνευστ. λοίμωξη, ρευματοειδής αρθρίτιδα
38				Αναπνευστ. Λοίμωξη, Πολυαξονική νευροπάθεια
39				Έμφραγμα
42				Πνευμ. εμβολή
43				Βρογχικό άσθμα
45				ΧΑΠ

46	+			Αγγειίτιδα
48				Φυσιολογικό
52	+			Πνευμονία- ΧΑΠ
53				Φυσιολογικό
56				Χρόνια βρογχίτιδα, βαρύς καπνιστής
57				Καρδιακό
59				Πνευμονική εμβολή
65				Λοίμωξη
69				Πνευμονία
70				Χρόνια Βρογχίτιδα
71				Βρογχ. άσθμα
72				ΧΑΠ-ΣΝ-ΣΔ Περιφ. αρτηριοπάθεια
74	+	+		ΧΑΠ-ΧΑΑΙ, πεπτικό έλκος, βαρύς καπνιστής 120p/y
78				Πνευμονία AF- Τοξικό Δακτυλ.
79				Σκίαση
80				Πνευμονία
81				ΧΑΠ
84				ΧΑΠ-Πνευμονία-AF-ΣΝ-CT χωρίς καρκίνο

Δ. Συζήτηση

Δ. Συζήτηση

Δ1 Έκφραση πρωτεϊνών hnRNP A/B σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα

Το κύριο πλεονέκτημα της παρούσας διατριβής ήταν η ταυτόχρονη εξέταση καρκινικού και φυσιολογικού ιστού σε ζεύγη βιοψιών από ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) για την εκτίμηση τόσο των πρωτεϊνικών επιπέδων όσο και των επιπέδων του mRNA για τις υπό εξέταση πρωτεΐνες. Η μελέτη βασίστηκε στη συνδυασμένη εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης (Western blotting) για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων, και ποσοτικής ανάλυσης RT-PCR (Real-Time) για ακριβή προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA σε σταθερή κατάσταση στο κύτταρο.

Επί του παρόντος, η απορύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP, κυρίως της hnRNP A2/B1, κατά την καρκινογένεση στον πνεύμονα έχει υποστηριχθεί από μια σειρά βιβλιογραφικών αναφορών. Οι περισσότερες αφορούν την εφαρμογή ανοσοχημικών προσεγγίσεων είτε σε ιστούς χειρουργημένων ασθενών με ΜΜΚΠ είτε σε καρκινικές σειρές του πνεύμονα [305, 308, 365-369]. Αρκετές αναφορές περιελάμβαναν επίσης πειραματικές προσεγγίσεις όπως Western blotting, Northern blotting ή RT-PCR [370-375]. Παρά ταύτα, η παρούσα μελέτη είναι πρωτότυπη σε ότι αφορά την εφαρμογή ζευγών βιοψιών καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του πνεύμονα από τον ίδιο ασθενή και άμεση σύγκριση των επιπέδων πρωτεΐνης και mRNA για κάθε υπό εξέταση πρωτεΐνη hnRNP.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι βιοψίες αποτελούν το πλέον κατάλληλο υλικό για την μελέτη της καρκινογένεσης στον πνεύμονα, σε σύγκριση με την καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (καθιερωμένων ή πρωτογενών), οι οποίες παρουσιάζουν διαφοροποιημένους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα του ιστού προέλευσης. Γενικά, υπάρχει δυσκολία στη διαθεσιμότητα κατάλληλης κυτταρικής σειράς που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσιολογικός μάρτυρας, αφού και οι αθανατοποιημένες, μη-καρκινικές, σειρές παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα πρωτεϊνών hnRNP με αυτά των καρκινικών κυττάρων. Αυτή είναι μια παράμετρος η οποία πρέπει να ληφθεί υπόψη εφόσον είναι γνωστό ότι τα επίπεδα

έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP είναι στενά συνδεδεμένα με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων (κυτταρικός πολλαπλασιασμός) [376].

Οι πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς και αυτές που ακολούθησαν, ανέδειξαν σημαντικές αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA της hnRNP A2/B1 στον καρκίνο του πνεύμονα. Το γεγονός αυτό θεωρήθηκε ως ένα χαρακτηριστικό της κυτταρικής νεοπλασματικής εξαλλαγής το οποίο προηγείται των μορφολογικών διαφοροποιήσεων των ιστών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα [368-370], όπως αναφέρεται και σε μια πρόσφατη αναφορά του εργαστηρίου μας [306]. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης αυξημένης έκφρασης της A2/B1 όπως επίσης και άλλων hnRNP (A1,C1/C2,K), παρατηρήθηκε με ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΚΠ) και ΜΜΚΠ, όπως επίσης και σε βιοψίες ΜΜΚΠ [318]. Στις κυτταρικές σειρές η μέση έκφραση του mRNA της hnRNP A2/B1 και της hnRNP A1 ήταν υψηλότερη σε ΜΚΠ από ότι σε ΜΜΚΠ όπως επίσης και ο λόγος του mRNA της κύριας ισομορφής A2 προς την δευτερεύουσα B1 (μέση τιμή 7,2 και 6,3 σε ΜΚΠ και ΜΜΚΠ αντίστοιχα) [318].

Παρά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η χρησιμότητά της υπερέκφρασης της hnRNP A2/B1 ως διαγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα βρίσκεται επί του παρόντος σε αμφισβήτηση. Και αυτό γιατί νεώτερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ισομορφή B1 παρουσιάζει σημαντικότερη αύξηση τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο του πνεύμονα. Η παραγωγή και χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων αποκλειστικά για την ισομορφή B1 είχε ως αποτέλεσμα την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών προσεγγίσεων που έδειξαν ισχυρή πυρηνική χρώση, κυρίως σε καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου, αλλά όχι του παράπλευρου φυσιολογικού ιστού, των πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων [366, 373]. Σε άλλες μελέτες ανιχνεύτηκε μερική χρώση και των φυσιολογικών κυττάρων (αν και χαμηλότερης έντασης από αυτή των καρκινικών κυττάρων) με τη χρήση δύο διαφορετικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της B1 [301, 372, 375]. Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη με αποκλειστική χρήση ανοσοϊστοχημείας σε αρχειακό υλικό ιστών από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, με παράλληλη διερεύνηση μη-καρκινικών ιστών που προέρχονται από ασθενείς με άλλες παθήσεις του πνεύμονα (που δε σχετίζονται με καρκίνο ως ομάδα ελέγχου), παρατηρήθηκε υπερ-έκφραση της B1 σε συχνότητα 25% και σε καλοήγη βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και

φλεγμονώδη κύτταρα της ομάδας ελέγχου [301]. Παρά τις παραπάνω διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων, παραμένει ότι η υπερ-έκφραση της hnRNP B1 παρατηρείται από τα πρώιμα στάδια της κακοήθους μεταλλαγής (σε μη εμφανή καρκίνο, βρογχική δυσπλασία και πτύελα) και επί του παρόντος θεωρείται ως ο πλέον ειδικός και ευαίσθητος βιοδείκτης (έναντι της hnRNP A2/B1) για την ανίχνευση του πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα [365, 373].

Στα πλαίσια της παραπάνω συζήτησης, πιστεύουμε ότι η παρούσα μελέτη ανέδειξε έναν αριθμό σημαντικών παρατηρήσεων. Μια πρώτη παρατήρηση αφορά τις καρκινοεξαρτώμενες αλλαγές σε πρωτεϊνικό επίπεδο της ομάδας των hnRNP τύπου A/B, της οποίας ως γνωστόν τα μέλη εμφανίζουν υψηλή ομολογία. Εκτός από την απορύθμιση της έκφρασης των hnRNP A2/B1 ή μόνο της B1, υπάρχουν λίγες αναφορές για τις άλλες πρωτεΐνες hnRNP. Η μελέτη μας εστίασε στις 3 κύριες πρωτεΐνες τύπου A/B (τις hnRNP A2/B1, A1 και A3), ενώ μια ακόμη πρωτεΐνη hnRNP (η hnRNP K) προστέθηκε σε μερικές από τις πειραματικές προσεγγίσεις. Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων που βασίστηκε στα αποτελέσματα από Western blotting κατέδειξε την υπεροχή της hnRNP A1 αναφορικά με τον υψηλότερο βαθμό απορύθμισης (συχνότητα και εύρος υπερέκφρασης) στον MMKΠ. Με κατώφλι αλλαγών των πρωτεϊνικών επιπέδων στο λόγο καρκινικού προς φυσιολογικό ιστό στον ίδιο ασθενή $K/\Phi > 2$, οι πλέον σημαντικές αλλαγές προσδιορίστηκαν στην περίπτωση της hnRNP A1 (76%), ενώ ακολουθούν οι hnRNP A3 (52%), hnRNP A2/B1 (43%) και hnRNP K/J (38%). Η υψηλή συχνότητα υπερέκφρασης της A1 στον MMKΠ είναι σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις που έχουν βασιστεί αποκλειστικά σε ανοσοιστοχημικές μελέτες [374]. Αυξημένη έκφραση της hnRNP A1 έχει αναφερθεί και στον καρκίνο του παχέος εντέρου [377] και σε άλλους τύπους καρκίνου [378]. Τα ευρήματα που αφορούν την υπερέκφραση της hnRNP A3 είναι νέα και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της στον καρκίνο του πνεύμονα.

Ο κύριος στόχος της μελέτης μας ήταν η άμεση σύγκριση της hnRNP A1 και A2/B1 σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA, από τον ίδιο ασθενή. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η υψηλή συχνότητα υπερέκφρασης της A1 (76%) σε επίπεδο πρωτεΐνης στον καρκίνο δεν συνοδεύεται από αντίστοιχες αλλαγές στα επίπεδα του mRNA (15% υπερέκφραση). Αντίθετα με την hnRNP A1, παρατηρήθηκε η ίδια γενική συχνότητα υπερέκφρασης (περίπου 40%) σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA για την hnRNP A2/B1. Στη μελέτη μας έγινε εκτίμηση των επιπέδων mRNA αποκλειστικά

για την ισομορφία hnRNP B1, αλλά δεν κατέστη δυνατή η παράλληλη μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, λόγω έλλειψης ειδικών αντισωμάτων αποκλειστικά για τη μορφή B1. Από τα αποτελέσματα των ανοσοαποτυπώσεων στα οποία έγινε χρήση του αντισώματος έναντι και των δύο μορφών hnRNP A2 και B1 οι αλλαγές που προσμετρήθηκαν ήταν σε γενική αναλογία με αυτές της κύριας ισομορφίας hnRNP A2. Επιπλέον, η συχνότητα και το εύρος της αύξησης του mRNA της hnRNP B1 στον καρκινικό ιστό ήταν ανάλογη αυτών του mRNA της hnRNP A2/B1 (αν και μικρότερης έντασης). Από τα παραπάνω συνάγεται ότι τα αποτελέσματά μας δεν βρίσκονται σε συμφωνία με την αναφορά του Sueoka και συνεργατών [373] για αυξημένα επίπεδα του mRNA της B1 σε σχέση με το mRNA της A2/B1 στον καρκίνο του πνεύμονα.

Τα αποτελέσματά μας έδωσαν σημαντικά στοιχεία για την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών υπεύθυνων για απορύθμιση της έκφρασης των συγγενικών πρωτεϊνών hnRNP A/B στον καρκίνο του πνεύμονα, όπως έχει αρχικά προταθεί σε μια προηγούμενη μελέτη [374]. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές από τη συχνότητα των περιπτώσεων (19%) όπου προσμετρείται αντίθετη έκφραση (υπερ- ή υπό-έκφραση) σε μία τουλάχιστον πρωτεΐνη hnRNP A/B (A1, A2/B1 και A3) στην ίδια βιοψία. Η έλλειψη αντιστοιχίας στην απορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των A/B αντικατοπτρίστηκε και στο επίπεδο του mRNA. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της hnRNP A1, η υψηλή συχνότητα της πρωτεϊνικής υπερέκφρασης (76%) στον καρκίνο, δεν συνοδευόταν από παρόμοιες αλλαγές στο επίπεδο του mRNA (15% υπερέκφραση). Θα πρέπει να τονιστεί σε αυτό το σημείο η προφανής χαμηλή συσχέτιση μεταξύ πρωτεΐνης και mRNA στα ευκαρυωτικά συστήματα, καθώς αρκετά συχνά η υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης δε συνοδεύεται από αντίστοιχη αλλαγή στο επίπεδο του mRNA [379, 380].

Αναφορικά με τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 με γνωστό ανταγωνιστικό ρόλο έναντι της A1 στο εναλλακτικό μάτισμα [381], στη μελέτη μας ανιχνεύτηκαν παράλληλες αλλαγές με αυτές της hnRNP A1, τόσο στο πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και στο επίπεδο του mRNA. Σε ένα μοντέλο καρκινογένεσης του πνεύμονα στον ποντικό αναφέρονται παράλληλες αλλαγές στα σχετικά επίπεδα των δύο πρωτεϊνών με την παρατήρηση ότι η hnRNP A1 αυξάνεται συγκριτικά με την ASF/SF2 σε μεγαλύτερο βαθμό στους όγκους (6πλάσια αύξηση του λόγου A1 προς ASF/SF2) [382]. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του ανθρώπινου καρκίνου του πνεύμονα, καθώς στην παρούσα μελέτη η υψηλότερη αναλογία της hnRNP A1 προς την

ASF/SF2 ήταν εμφανής στο 80% των περιπτώσεων (η πλειοψηφία με 3πλάσια τουλάχιστον αλλαγή). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη καρκινοεξαρτώμενων αλλαγών στα επίπεδα του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 και της A1 για τις οποίες χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διαφανεί ο ιδιαίτερος ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα.

Επί του παρόντος δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως η χρησιμότητα της hnRNP A2/B1 ως βιοδείκτη στη διάγνωση του πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα. Η πρόσφατη δημοσίευση των Zech και συνεργατών [383] εξετάζει την διαγνωστική και προγνωστική αξία των hnRNP A2/B1 και B1 αφ' εαυτού στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα. Με την εφαρμογή μεγάλης κλίμακας ανοσοϊστοχημικής μελέτης σε παγωμένους ιστούς (χωρίς μονιμοποίηση σε παραφίνη), σε ζεύγη καρκινικού/φυσιολογικού ιστού στον ίδιο ασθενή με MMKΠ, η συχνότητα υπερέκφρασης της A2/B1 στον καρκίνο ήταν ιδιαίτερος χαμηλή (10%) σε σύγκριση με την υψηλή συχνότητα (91%) της B1 στα καρκινικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, και σε αντίθεση με την αναφορά των Wu και συνεργατών [305], δε διαφαίνεται η προγνωστική αξία της hnRNP B1, ενώ η υπερέκφραση της A2/B1 σχετίστηκε με αρνητική πρόγνωση [383]. Η ύπαρξη αποκλίσεων και αντικρουόμενων αποτελεσμάτων πιθανόν να σχετίζεται με τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων και μεθόδων μονιμοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες. Η παρούσα εργασία έδωσε, αντιθέτως, αρχικά στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν την hnRNP A1 ως ένα πιο αξιόπιστο βιοδείκτη σε σχέση με την A2/B1. Αυτό βασίζεται στην αυξημένη συχνότητα υπερέκφρασης της στον καρκίνο και στα χαμηλά επίπεδα στον παρακαείμενο (με φυσιολογική μορφολογία) ιστό, όπως παρουσιάστηκε στα Αποτελέσματα. Παραμένει ωστόσο η πιθανότητα ότι οι αλλαγές της hnRNP A1 λαμβάνουν χώρα σε ένα μεταγενέστερο στάδιο της κακοήθους εξαλλαγής του πνεύμονα, σε σύγκριση με το πρώιμο στάδιο για την hnRNP A2/B1 ή B1. Σημειώνουμε ότι οι καρκινικοί ιστοί οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από ένα προχωρημένο καρκινικό στάδιο (βιοψίες με χαμηλή ή μεσαία διαφοροποίηση) και ότι δεν παρατηρήθηκε υπερπλασία ή μεταπλασία των κυττάρων στον παρακαείμενο φυσιολογικό ιστό, τουλάχιστον 5 cm μακριά από την περίμετρο του όγκου. Επιπλέον, δεν ήταν δυνατό να συμπεριληφθούν στη μελέτη βιοψίες από ασθενείς με μη-καρκινική παθολογία, ως μια καλύτερη ομάδα ελέγχου. Μολαταύτα, τα αποτελέσματά μας επιτρέπουν να προτείνουμε την υπερέκφραση της hnRNP A1 ως ένα νέο βιοδείκτη, ο οποίος μπορεί να συνδυαστεί με αυτόν της B1

ή/και άλλους πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες (όπως η έκφραση της τελομεράσης, μεταλλάξεις του p53 και K-Ras [365]) στην προσπάθεια για ακριβή διάγνωση πρώιμης καρκινογένεσης στον πνεύμονα.

Η μοριακή βάση της απορύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει επί του παρόντος άγνωστη. Η συμμετοχή μορίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης, και ελέγχουν μεταξύ άλλων και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών hnRNP, είναι αναμενόμενη όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση της υπερέκφρασης της ASF/SF2 στον καρκίνο του στήθους και του παχέος εντέρου [354]. Σύνδεση της υπερέκφρασης των hnRNP A/B με την καρκινογένεση διαφαίνεται από πρόσφατη μελέτη όπου η έκφραση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [165] και από τη σύνδεση της αναστολής της επιδιόρθωσης του DNA με την υπερέκφραση της B1 [149].

Η παρούσα μελέτη έδωσε αρχικές ενδείξεις αναφορικά με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς της απορύθμισης της έκφρασης των hnRNP A/B στο MMKP. Ένας πιθανός μηχανισμός για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A1 με την έλλειψη παράλληλων αλλαγών του mRNA, θα μπορούσε να σχετίζεται με την καταστολή της μετάφρασης του mRNA της A1 σε μη-καρκινικά φυσιολογικά κύτταρα, η οποία ανατρέπεται στα καρκινικά κύτταρα με συνέπεια την συσσώρευση πρωτεΐνης. Ένας τέτοιος μηχανισμός πιθανά να εμπλέκει συγκεκριμένα microRNA τα οποία στοχεύουν το mRNA της hnRNP A1, καθώς η συμμετοχή διαφόρων microRNA έχει ήδη διαφανεί στον καρκίνο του πνεύμονα [384]. Παραμένει προς διερεύνηση το κατά πόσο υφίσταται στην περίπτωση του mRNA της hnRNP A1 ένας τέτοιος μηχανισμός. Να σημειωθεί ότι μια πρώτη σάρωση προγραμμαμάτων που κάνουν χρήση ειδικών αλγόριθμων, εμφάνισε αρκετά microRNA που έχουν πιθανούς στόχους mRNA των πρωτεϊνών hnRNP A/B. Από όλα τα παραπάνω συνάγεται η προσοχή που απαιτείται στην ερμηνεία αποτελεσμάτων που στηρίζονται αποκλειστικά στην έκφραση γονιδίων στο επίπεδο του mRNA, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι αλλαγές στο πρωτεϊνικό επίπεδο. Μελλοντικός στόχος του εργαστηρίου είναι η ταυτοποίηση των mRNA-στόχων των πρωτεϊνών hnRNP A/B με πειράματα κατακρήμισης RNA (RIP assays) ανάμεσα σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα στην κατεύθυνση αυτή έδειξαν την ικανότητα ανοσοκατακρήμισης συμπλόκων RNP μέσω αντισώματος έναντι της hnRNP A1 σε

βιοψίες του πνεύμονα, τα οποία θα αποτελέσουν το υλικό ανάλυσης mRNA στον καρκινικό και παρακαείμενο φυσιολογικό ιστό του πνεύμονα.

Η στενή σχέση ανάμεσα στα πρότυπα εναλλακτικών ματίσματος και καρκίνου επεκτείνεται και στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι πρωτεΐνες hnRNP A/B και ο γνωστός παράγοντας ματίσματος ASF/SF2 συμμετέχουν ενεργά στο εναλλακτικό μάτισμα. Γνωστή είναι επίσης η σχέση μεταξύ του λόγου έκφρασης της hnRNP1 A1 προς ASF/SF2 στον καρκίνο [354, 355]. Λαμβάνοντας υπόψη τις καρκινοεξαρτώμενες αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα έκφρασης των hnRNP A/B, και κυρίως της A1, έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσο οι παρατηρούμενες αυτές αλλαγές, μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από τον ίδιο ασθενή, μπορούν να συσχετιστούν με τα πρότυπα ματίσματος του pre-mRNA γονιδίων που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα και σχετίζονται και με την καρκινογένεση. Η διερεύνηση αυτή έγινε αρχικά σε ένα από τα πιο καλά μελετημένα γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα, το CD44 και εστίασε στην παρουσία των εξονίων v1 – v10 (και κατά κύριο λόγο των v6 και v8), η οποία έχει συσχετιστεί με την καρκινική εξαλλαγή [350, 358, 359]. Τα αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR σε ολικό RNA από τα ζεύγη βιοψιών με τη χρήση ειδικών εκκινητών για τη βασική μορφή CD44s και τις μορφές που περιέχουν εξώνια v6 και v8, με στόχο την ταυτοποίηση των προτύπων εναλλακτικού ματίσματος, δεν οδήγησαν στην αναγνώριση ενός προτύπου ματίσματος το οποίο να συνδέεται με τις αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A/B και ASF/SF2 που μελετήθηκαν, και ειδικότερα με τα αυξημένα επίπεδα (>10x) της hnRNP A1. Η έλλειψη χαρακτηριστικών προτύπων ματίσματος αφορούσε όλους τους συνδυασμούς εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία προϊόντων RT-PCR που περιέχουν τις ισομορφές v8 και κυρίως v6 και στους φυσιολογικούς ιστούς.

Η διερεύνηση της πιθανής σχέσης των αλλαγών των επιπέδων των hnRNP στον καρκίνο του πνεύμονα με παράλληλες αλλαγές στα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος συγκεκριμένων γονιδίων, επεκτάθηκε με την επιλογή γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση και των οποίων τα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP, (σίγηση των πρωτεϊνών με χρήση siRNA [339]). Επιλέγοντας γονίδια που επέδειξαν τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στο εναλλακτικό μάτισμα με την εφαρμογή σίγησης της έκφρασης των πρωτεϊνών A1 και A2/B1 - τα MAP4K4, PPP3CB και LRDD για την A1, και CASP9 για την hnRNP A2- εφαρμόστηκε RT-PCR σε επιλεγμένα ζεύγη

βιοψιών καρκινικού/φυσιολογικού ιστού του πνεύμονα, με τα ίδια ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην προαναφερθείσα μελέτη. Τα αποτελέσματα και από αυτή την ανάλυση δεν στάθηκαν ικανά να υποστηρίξουν την άμεση σύνδεση μεταξύ των παρατηρούμενων αλλαγών στα επίπεδα των A1 και A2/B1 στον καρκίνο του πνεύμονα και στα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος των συγκεκριμένων γονιδίων. Από το γεγονός ότι οι παραπάνω έμμεσες πειραματικές προσεγγίσεις δεν οδήγησαν σε σαφή συμπεράσματα, γίνεται προφανής η ανάγκη για άμεση ταυτοποίηση των στόχων mRNA που βρίσκονται σε διασύνδεση με τις πρωτεΐνες στα σύμπλοκα RNP στον καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του πνεύμονα.

Δ2. Παραγωγή νέων εργαλείων των hnRNP A/B και εφαρμογή 1: στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών hnRNP 2: στη διερεύνηση της καθιέρωσης πρωτεϊνών A/B ως βιοδεικτών στην πρόωμη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα.

Η επιτυχής υποκλωνοποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής της hnRNP A3, από κλώνο που είχε απομονωθεί στο εργαστήριο μας, και της A2 (πλήρους μήκους), σε κατάλληλα οχήματα έκφρασης, επέτρεψε την έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST, δημιουργώντας εργαλεία χρήσιμα για τη διεξαγωγή πειραμάτων ευρείας εφαρμογής.

Οι εφαρμογές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως νέων εργαλείων εστίασαν αρχικά στη μελέτη της ικανότητας διασύνδεσης με ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα προερχόμενα από τις κυτταρικές σειρές HeLa (προέλευσης καρκίνου μήτρας) και A549 (προέλευσης πνεύμονα), μέσω πειραμάτων πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull-down). Μελετήθηκε η ισχύς των παρατηρούμενων διασυνδέσεων, με τη χρήση διαλυμάτων αυξημένης αλατότητας, και η διαμεσολάβηση ή μη RNA με την επίδραση RNase. Από τις αναλύσεις προέκυψαν ενδιαφέροντα βιοχημικά δεδομένα αναφορικά με την ταυτοποίηση νέου τύπου αλληλεπιδράσεων της hnRNP A3 οι οποίες εξετάστηκαν σε άμεση αντιπαραβολή με τις ήδη γνωστές αλληλεπιδράσεις που αφορούν στην hnRNP A2 και A1. Τα νέα δεδομένα για τις αλληλεπιδράσεις της hnRNP A3 αφορούν στην ικανότητα διασύνδεσης εκτός των άλλων hnRNP A/B, και με τις hnRNP M και L (πρωτεΐνες εκτός της ομάδας των A/B), τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και τον χαρακτηρισμό τους ως διασυνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών,

χωρίς διαμεσολάβηση RNA. Επίσης αποδείχτηκε η *in vitro* άμεση διασύνδεση (αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) των hnRNP A3 - hnRNP M, με την εφαρμογή και ανασυνδυασμένης hnRNPM. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά την γενική ενίσχυση των παρατηρούμενων διασυνδέσεων μετά από χρήση RNase, (με εξαίρεση τις διασυνδέσεις με την hnRNP A1). Η ισχυρότερη διασύνδεση ήταν αυτή μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP A3 και A2. Η αλληλεπίδραση της hnRNPA3 με A1, A2 αλλά και ενδογενή A3, φάνηκε να επηρεάζεται από την αυξημένη αλατότητα, στοιχείο που συμφωνεί και με βιβλιογραφικά δεδομένα [112]. Αντίθετα οι διασυνδέσεις με τις hnRNP L και M ήταν ισχυρές και δεν επηρεάστηκαν από την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Επόμενος στόχος, στα πλαίσια της παραπάνω δραστηριότητας, είναι η εφαρμογή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στη συγκριτική μελέτη συμπλόκων hnRNP και mRNP σε κυτταρικά εκχυλίσματα ανθρώπινου πνεύμονα, από υγιή και καρκινικό ιστό.

Μια επιπλέον εφαρμογή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-A3Ct ήταν η ανοσοποίηση κουνελιών με σκοπό την παραγωγή νέων αντισωμάτων κατά της hnRNP A3. Υπενθυμίζεται ότι η hnRNP A3 αποτελεί νεώτερο μέρος της ομάδας των A/B και της οποίας ο βιοχημικός/μοριακός χαρακτηρισμός της υπολείπεται των hnRNP A1 και A2/B1. Η προσπάθεια απέδωσε αποτέλεσμα σε ένα από τα τρία ζώα, όπου ο ορός μετά την ανοσοποίηση περιείχε ειδικά αντισώματα έναντι της A3 ικανά να αντιδράσουν με ενδογενείς πρωτεΐνες, τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι. Ο έλεγχος των νέων αντισωμάτων, σε άμεση αντιπαραβολή με το εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα κατά της hnRNP A3 το οποίο αντιδρά αποκλειστικά με την μεγαλύτερου μοριακού βάρους (42 kDa) ισομορφή της A3 [120], έδειξε επιπλέον αντίδραση κατά της ισομορφής A3/mBx [385]. Η ισομορφή αυτή είναι μικρότερου μοριακού βάρους (38 kDa) και αποτελεί την κύρια μορφή της hnRNP A3 στα τρωκτικά ενώ φαίνεται να εκλείπει από τα ανθρώπινα κύτταρα. Ο καθαρισμός του ορού, με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας, ενίσχυσε τον τίτλο και την ειδικότητα των νέων αντισωμάτων, εξαλείφοντας μη ειδικά αντισώματα που παρατηρήθηκαν στον αρχικό ορό του ζώου. Τα απομονωμένα αντισώματα παρουσιάζουν μια επιπλέον αντίδραση κατά μιας πρωτεΐνης μεγαλύτερου μοριακού βάρους (περίπου 50 kDa) που εμφανίζεται σε κυτταρικά εκχυλίσματα προέλευσης ποντικού αλλά όχι ανθρώπου. Η εφαρμογή των αντισωμάτων αυτών ως εργαλείων στην μελέτη της βιολογικής σημασίας των ισομορφικών τύπων της hnRNP A3 στα κύτταρα των θηλαστικών αποτελεί άμεση προοπτική.

Η διερεύνηση για τη δυνατότητα καθιέρωσης των πρωτεϊνών hnRNP A/B ως βιοδεικτών στο καρκίνο του πνεύμονα παραμένει στο επίκεντρο πολλών ερευνών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η υπερέκφραση των A/B, με τα νέα δεδομένα για τις A1 αλλά και A3, παρέχουν επιπλέον ενισχυτικά στοιχεία. Στα πλαίσια αυτά εξετάστηκε κατά πόσο η παρατηρούμενη υπερέκφραση των hnRNP A/B μπορεί να αποτελέσει νέο αξιόπιστο βιοδείκτη για πρόωμη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα, πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων, και να ενταχθεί σε ένα ευρύτερο σχεδιασμό με τη χρήση πολλαπλών βιοδεικτών. Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα σε διάφορους τύπους καρκίνου αποτελούν συχνά και στόχους αυτοαντισωμάτων [320, 321] τα οποία ανιχνεύονται στον ορό του αίματος ασθενών. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων έναντι των A2 και A3 στον ορό αίματος ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, υλικό που λαμβάνεται εύκολα με μη παρεμβατικές μεθόδους, με τη χρήση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A/B (GST-A2 ή -A3) ως ειδικών αντιγονικών πρωτεϊνών.

Τα αρχικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western), έδειξαν την ικανότητα αναγνώρισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-A3Ct και GST-A2 από τα εμπορικά αντισώματα κατά των hnRNP A3 και A2, καθώς και από αυτοαντισώματα κατά των ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP A/B που ανιχνεύονται σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα. Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης στα οποία φάνηκε ότι είναι δυνατή η αναγνώριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και από αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Συνολικά αναλύθηκαν 76 οροί που προέκυψαν από ασθενείς είτε με καρκίνο του πνεύμονα, είτε με καρκίνο άλλου τύπου καθώς και ασθενείς με άλλη παθολογία εκτός καρκίνου και από 6 υγιή άτομα. Βρέθηκαν θετικοί για παρουσία αντι-A2 και/ή αντι-A3 αυτοαντισωμάτων, 15 οροί (ποσοστό 63%) από τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Το ποσοστό των θετικών σε αυτοαντισώματα ορών από το σύνολο των ασθενών με καρκίνο (καρκίνο του πνεύμονα ή άλλου τύπου) ήταν 58%. Στους ασθενείς με καρκίνο άλλου τύπου (εκτός του πνεύμονα) το ποσοστό ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έναντι των A2 και A3 έφτασε το 45% (4 στους 9), γεγονός το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη στην δυνητική αξιοποίηση των αυτοαντισωμάτων κατά των A/B ως βιοδεικτών στον καρκίνο. Αντίθετα τα μικρά ποσοστά που αφορούσαν τους ορούς ασθενών με άλλη παθολογία (ποσοστό 19%) και η αδυναμία

ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στους ορούς υγιών ατόμων, ενισχύουν την πιθανότητα τα αυτοαντισώματα έναντι των A/B να σχετίζονται με την καρκινική παθολογία. Εκτός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, τα αυτοαντισώματα των ορών των ασθενών έχουν ικανότητα αναγνώρισης των αντίστοιχων ενδογενών πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3.

Λόγο της γνωστής διασύνδεσης των αυτοαντισωμάτων έναντι των hnRNP A/B με την αυτοανοσία [269], είναι απαραίτητη η παράλληλη διερεύνησή της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων στους υπό εξέταση ορούς λόγο τυχόν συνύπαρξης αυτοάνοσου νοσήματος στους ασθενείς με καρκίνο. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε το σύνολο των ασθενών για τυχόν παρουσία στους ορούς δύο εκ των πλέον κοινών αυτοαντισωμάτων, των αντι-Sm και αντι-La που είναι χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα για ύπαρξη ερυθρηματώδη λύκου και συνδρόμου Sjogren's, αντίστοιχα. Στους 19 ορούς ασθενών με καρκίνο και με αντι-A2 και/ή αντι-A3 αυτοαντισώματα, βρέθηκαν 2 περιπτώσεις με ταυτόχρονη παρουσία αντι-La αυτοαντισώματα και μία με αντι-Sm αυτοαντισώματα. Από τα παραπάνω ευρήματα διαφαίνεται η ανάγκη να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή εκδήλωση αυτοάνοσου νοσήματος στους ασθενείς με καρκίνο.

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι των A/B σε ορούς ασθενών με καρκίνο ανοίγει προοπτικές για περαιτέρω επέκταση της μελέτης των πρωτεϊνών ως βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα. Για παράδειγμα η εφαρμογή της μεθοδολογίας ELISA για ανάλυση ορών ασθενών σε μεγάλη κλίμακα αποτελεί ένα πρώτο βήμα στην κατεύθυνση αυτή. Προκαταρκτικά πειράματα, που έγιναν στην παρούσα μελέτη με τη χρήση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A2 και A3 σε πειράματα ELISA, με τους ορούς των ασθενών που δοκιμάστηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, κατέδειξαν την παρουσία τεχνικών προβλημάτων που πρέπει να ξεπεραστούν (π.χ. καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως αντιγονικό υλικό καθώς και των αυτοαντισωμάτων για μείωση μη ειδικών αντιδράσεων). Επιπλέον θέματα προς διερεύνηση αποτελούν και ο προσδιορισμός του δείκτη ευαισθησίας και εξειδίκευσης των αυτοαντισωμάτων κατά πρωτεϊνών hnRNP A/B για τον καρκίνο του πνεύμονα. Τελικό στόχο αποτελεί η συσχέτιση των νέων αυτών βιοδεικτών με την παρουσία και άλλων βιολογικών δεικτών που θα ενισχύσουν την διαγνωστική ή και προγνωστική αξία τους στον καρκίνο του πνεύμονα. Για το σκοπό αυτό χρειάζονται πειράματα μεγάλης κλίμακας

με την εξέταση ορών ασθενών από άτομα που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου (π.χ. καπνιστές).

Περίληψη

Βασικός στόχος της παρούσας Διατριβής ήταν ο μοριακός χαρακτηρισμός της απορύθμισης στην έκφραση πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης RNA (πρωτεΐνες RBP) στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, σε ζεύγη βιοψιών καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Η μελέτη αφορούσε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP που ανήκουν στην ομάδα των hnRNP A/B (A1, A2/B1 και A3), άλλες hnRNP (hnRNP K/J), καθώς και τον παράγοντα μάλιστα ASF/SF2 με γνωστή ανταγωνιστική δράση στο εναλλακτικό μάλιστα έναντι των πρωτεϊνών hnRNP A/B. Συνολικά εξετάστηκαν 21 ζεύγη βιοψιών ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (συνεργασία με τον Δρ. Χ. Βαλαβάνη, Νοσοκομείο “Μεταξα”, στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ). Έγινε εφαρμογή πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων, σε συνδυασμό με την ποσοτική μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Real-Time RT-PCR) για προσδιορισμό των αντίστοιχων επιπέδων του mRNA. Προσδιορίστηκαν τα πρότυπα έκφρασης πρωτεΐνης και mRNA, με την άμεση σύγκριση Καρκινικού/Φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Συνοπτικά, η σύγκριση των καρκινοεξαρτώμενων αλλαγών των hnRNP και του παράγοντα ASF/SF2 κατέδειξε την έλλειψη γενικής αντιστοιχίας μεταξύ των επιπέδων πρωτεΐνης και mRNA, με εξαίρεση την αναφορά στην hnRNP A2/B1. Ειδικότερα, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και ASF/SF2 στον καρκινικό ιστό δεν συνοδεύεται από αντίστοιχες αλλαγές στο επίπεδο του mRNA. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την εμπλοκή διαφορετικών μοριακών μηχανισμών ελέγχου της έκφρασης των συγγενικών μεταξύ τους πρωτεϊνών hnRNP A/B.

Στην πορεία του έργου έγινε εφικτή η παραγωγή νέων εργαλείων των hnRNP A/B, που αφορούσε την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A2 και A3. Οι εφαρμογές που προέκυψαν από πειράματα καταβύθισης σε εκχυλίσματα κυτταρικών σειρών του πνεύμονα οδήγησαν στην ταυτοποίηση νέων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP σε σύμπλοκα hnRNP και mRNA. Η διαθεσιμότητα των νέων εργαλείων επέτρεψε να διερευνηθεί η δυνατότητα καθιέρωσης των πρωτεϊνών hnRNP A/B ως βιοδεικτών στην πρόωμη διάγνωση

καρκίνου του πνεύμονα. Πειράματα με την χρησιμοποίηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hnRNP A/B, ως ειδικών αντιγόνων, παρείχαν σαφής ενδείξεις για παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών αυτών στον ορό αίματος ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, γεγονός που ανοίγει προοπτικές για πιθανή εφαρμογή τους, σε συνδυασμό και με άλλους βιοδείκτες, ως έναν αξιόπιστο δείκτη παρουσίας νεοπλασίας και μάλιστα σε πρώιμα στάδια καρκίνου του πνεύμονα.

Abstract

The main goal of the present Thesis was to determine the molecular characteristics of the deregulated expression of RNA binding proteins (RBPs), in the human lung cancer, in paired biopsies taken from cancerous and normal adjacent tissue from the same patient. The study focused in members of hnRNP proteins family belonging to the hnRNP A/B subtype (A1, A2/B1 and A3), along with other hnRNPs (hnRNP K/J) as well as the splicing factor ASF/SF2 with a known antagonistic role to hnRNPs in the alternative splicing. In total, 21 biopsy pairs were examined from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) (in collaboration with Dr.Ch. Valavanis, “Metaxa” hospital, in the frame of the PENED program). Western blotting and quantitative Real-Time PCR were applied for the semi-quantitative estimation of protein levels in combination with the quantitative estimation of mRNA levels, respectively. This approach allowed the direct comparison of protein and mRNA patterns of expression in cancer/normal tissue from the same patient. To summarize the results, the comparison of cancer related alterations of hnRNP proteins and ASF/SF2 pointed to the lack of correlation between protein and mRNA levels, with the exception of the hnRNP A2/B1. Moreover, the level of overexpression detected for hnRNP A1 and ASF/SF2 in the cancerous tissue, did not correlate with changes in the mRNA level. The results support the existence of distinct molecular mechanisms regulating the expression of closely related hnRNP A/B subtype proteins.

In the course of this project new tools, useful in study of hnRNPs, were produced, referring to the expression of recombinant hnRNP A2 and A3 proteins. The application of these new tools, in a series of pull-down experiments performed in lung cell lines extracts, led to the identification of new interactions among hnRNP proteins, in hnRNP and mRNP complexes. The use of these tools also allowed us to investigate the possibility of establishing the hnRNP proteins as biomarker for the

early detection of lung cancer. Experiments applying the recombinant proteins hnRNP A/B, as specific antigens, gave clear evidence for the presence of autoantibodies targeting those proteins, in the blood serum of patients with cancer, a finding that rises the perspective of using these proteins, in combination with other biomarkers, as a reliable marker for malignant detection in early stages of lung cancer.

Βιβλιογραφία

1. WHO. *Causes of death (.xls)*. 2004 [cited 2009 13/4]; Available from: <http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbdddeathdalyestimates.xls>.
2. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. 2005, Eur Soc Med Oncology. p. 481-488.
3. Bosetti, C., F. Levi, F. Lucchini, et al., *Lung cancer mortality in European women: recent trends and perspectives*. Annals of Oncology, 2005. **16**(10): p. 1597-1604.
4. Zatonski, W., M. Manczuk, J. Powles, et al., *Convergence of male and female lung cancer mortality at younger ages in the European Union and Russia*. The European Journal of Public Health, 2007. **17**(5): p. 450.
5. Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of Lung Cancer**. 2003, Am Coll Chest Phys. p. 21-49.
6. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, *Lung cancer in never smokers? a different disease*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(10): p. 778-790.
7. Hecht, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(14): p. 1194-210.
8. Witschi, H., *A short history of lung cancer*. Toxicol Sci, 2001. **64**(1): p. 4-6.
9. Doll, R. and A.B. Hill, *Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report*. Br Med J, 1950. **2**(4682): p. 739-48.
10. Wynder, E.L., *Tobacco as a cause of lung cancer, with special reference to the infrequency of lung cancer among non-smokers*. Pa Med J, 1954. **57**(11): p. 1073-83.
11. Taylor, R., F. Najafi, and A. Dobson, *Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent*. Int. J. Epidemiol., 2007. **36**(5): p. 1048-1059.
12. Simon, G.R. and H. Wagner, *Small Cell Lung Cancer**. Chest, 2003. **123**(1 suppl): p. 259S-271S.
13. Osterlind, K., *Chemotherapy in small cell lung cancer*. Eur Respir J, 2001. **18**(6): p. 1026-1043.
14. Molina, J.R., P. Yang, S.D. Cassivi, et al., *Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship*. Mayo Clinic Proceedings, 2008. **83**(5): p. 584-594.
15. NCI, <http://cancer.net.nci.nih.gov/cancertopics/types/lung>. 2005, National Cancer Institute.
16. Travis, W.D., J. Linder, and B. Mackay, *Classification, histology, cytology, and electron microscopy*. Pass, HI Mitchell, JB Johnson, DHet al eds. Lung cancer, principles and practice, 2000: p. 453-495.
17. Brambilla, E., W.D. Travis, T.V. Colby, et al., *The new World Health Organization classification of lung tumours*. Eur Respir J, 2001. **18**(6): p. 1059-1068.
18. McDuffie, H.H., D.J. Klaassen, and J.A. Dosman, *Characteristics of patients with primary lung cancer diagnosed at age of 50 years or younger*. Chest, 1989. **96**(6): p. 1298-301.
19. Taylor, A.B., N.K. Shinton, and J.A. Waterhouse, *Histology of bronchial carcinoma in relation to prognosis*. Thorax, 1963. **18**: p. 178-81.

20. Valaitis, J., S. Warren, and D. Gamble, *Increasing incidence of adenocarcinoma of the lung*. *Cancer*, 1981. **47**(5): p. 1042-6.
21. Weiss, W., K.R. Boucot, and D.A. Cooper, *The histopathology of bronchogenic carcinoma and its relation to growth rate, metastasis, and prognosis*. *Cancer*, 1970. **26**(5): p. 965-70.
22. Gazdar, A.F. and R.I. Linnoila, *The pathology of lung cancer--changing concepts and newer diagnostic techniques*. *Semin Oncol*, 1988. **15**(3): p. 215-25.
23. Hammar, S.P., *Common neoplasms*, in *Pulmonary Pathology--tumors: Tumors*, D. Dail, S.P. Hammar, and T. Colby, Editors. 1995, Springer-Verlag: New York. p. 1-156.
24. Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, et al., *Cancer Statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 71-96.
25. Wardwell, N.R. and P.P. Massion, *Novel strategies for the early detection and prevention of lung cancer*. *Semin Oncol*, 2005. **32**(3): p. 259-68.
26. Hirsch, F., W. Franklin, A. Gazdar, et al., *Early Detection of Lung Cancer: Clinical Perspectives of Recent Advances in Biology and Radiology 1*. *Clinical Cancer Research*, 2001. **7**(1): p. 5-22.
27. Bonner, J.A., *Non-small cell lung cancer - Introduction*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2000. **10**(4): p. 263-266.
28. Mulshine, J.L., S. Hong, A. Martinez, et al., *Moving to the routine management of pre symptomatic lung cancer*. *Lung Cancer*, 2001. **34 Suppl 2**: p. S1-5.
29. Gohagan, J.K., P.M. Marcus, R.M. Fagerstrom, et al., *Final results of the Lung Screening Study, a randomized feasibility study of spiral CT versus chest X-ray screening for lung cancer*. *Lung Cancer*, 2005. **47**(1): p. 9-15.
30. Behzadi, A., Y. Ung, V. Lowe, et al., *The role of positron emission tomography in the management of non-small cell lung cancer*. *Can J Surg*, 2009. **52**(3): p. 235-42.
31. Bunyaviroch, T. and R.E. Coleman, *PET Evaluation of Lung Cancer*. *J Nucl Med*, 2006. **47**(3): p. 451-469.
32. Erasmus, J.J., E. Rohren, and S.G. Swisher, *Prognosis and reevaluation of lung cancer by positron emission tomography imaging*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. **6**(2): p. 171-9.
33. Hung, J., S. Lam, J.C. LeRiche, et al., *Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue*. *Lasers Surg Med*, 1991. **11**(2): p. 99-105.
34. Palcic, B., S. Lam, J. Hung, et al., *Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques*. *Chest*, 1991. **99**(3): p. 742-3.
35. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. *Cancer*, 1953. **6**(5): p. 963-8.
36. Mulshine, J.L., L.M. De Luca, R.L. Dedrick, et al., *Considerations in developing successful, population-based molecular screening and prevention of lung cancer*. *Cancer*, 2000. **89**(11 Suppl): p. 2465-7.
37. Auer, G., J. Ono, M. Nasiell, et al., *Reversibility of bronchial cell atypia*. *Cancer Res*, 1982. **42**(10): p. 4241-7.
38. Topping, D.C., R.A. Griesemer, and P. Nettesheim, *Quantitative assessment of generalized epithelial changes in tracheal mucosa following exposure to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene*. *Cancer Res*, 1979. **39**(12): p. 4823-8.

39. Keith, R.L., *Chemoprevention of lung cancer*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(2): p. 187-93.
40. Virtamo, J., P. Pietinen, J.K. Huttunen, et al., *Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up*. JAMA, 2003. **290**(4): p. 476-85.
41. Hirsch, F.R., D.T. Merrick, and W.A. Franklin, *Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention*. Eur Respir J, 2002. **19**(6): p. 1151-8.
42. Kelloff, G.J., S.M. Lippman, A.J. Dannenberg, et al., *Progress in Chemoprevention Drug Development: The Promise of Molecular Biomarkers for Prevention of Intraepithelial Neoplasia and Cancer--A Plan to Move Forward*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(12): p. 3661-3697.
43. Merrick, D.T., J. Kittelson, R. Winterhalder, et al., *Analysis of c-ErbB1/epidermal growth factor receptor and c-ErbB2/HER-2 expression in bronchial dysplasia: evaluation of potential targets for chemoprevention of lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2281-8.
44. Lynch, T.J., A.A. Adjei, P.A. Bunn, et al., *Summary statement: Novel agents in the treatment of lung cancer: Advances in epidermal growth factor receptor-targeted agents*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(14): p. 4365S-4371S.
45. Freitag, L., *Interventional endoscopic treatment*. Lung Cancer, 2004. **45 Suppl 2**: p. S235-8.
46. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
47. Rom, W.N., J.G. Hay, T.C. Lee, et al., *Molecular and genetic aspects of lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1355-67.
48. Niklinski, J., W. Niklinska, L. Chyczewski, et al., *Molecular genetic abnormalities in premalignant lung lesions: biological and clinical implications*. Eur J Cancer Prev, 2001. **10**(3): p. 213-26.
49. Hirsch, F.R., E. Brambilla, N. Gray, et al., *Prevention and early detection of lung cancer-clinical aspects*. Lung Cancer, 1997. **17**(1): p. 163-74.
50. Hilbe, W., S. Dirnhofer, R. Greil, et al., *Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention*. European Journal of Cancer Prevention, 2004. **13**(5): p. 425.
51. Greenberg, A.K. and M.S. Lee, *Biomarkers for lung cancer: clinical uses*. Curr Opin Pulm Med, 2007. **13**(4): p. 249-55.
52. Cherneva, R., O. Georgiev, and D. Petrova, *Early detection of lung cancer: A call for novel biomarkers-review*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2007. **21**(2): p. 145-150.
53. Chorostowska-Wynimko, J. and A. Szpechcinski, *The impact of genetic markers on the diagnosis of lung cancer: A current perspective*. Journal of Thoracic Oncology, 2007. **2**(11): p. 1044-1051.
54. Borczuk, A.C., R.L. Toonkel, and C.A. Powell, *Genomics of lung cancer*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(2): p. 152-8.
55. Kim, B., H. Lee, H. Choi, et al., *Clinical Validity of the Lung Cancer Biomarkers Identified by Bioinformatics Analysis of Public Expression Data*. Cancer Research, 2007. **67**(15): p. 7431.

56. Zhang, X.Y., K.T. Zhang, F. Tian, et al., *Integrative analysis and validation of robust gene signature in lung cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **358**(3): p. 710-5.
57. Hofmann, H.S., B. Bartling, A. Simm, et al., *Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(3): p. 587-95.
58. Raponi, M., Y. Zhang, J. Yu, et al., *Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung*. *Cancer Research*, 2006. **66**(15): p. 7466-7472.
59. Chen, G., T.G. Gharib, C.C. Huang, et al., *Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas*. *Mol Cell Proteomics*, 2002a. **1**(4): p. 304-13.
60. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 683-92.
61. Wulfkuhle, J.D., L.A. Liotta, and E.F. Petricoin, *Proteomic applications for the early detection of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(4): p. 267-75.
62. Massion, P.P. and R.M. Caprioli, *Proteomic strategies for the characterization and the early detection of lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2006. **1**(9): p. 1027-39.
63. Yildiz, P.B., Y. Shyr, J.S. Rahman, et al., *Diagnostic accuracy of MALDI mass spectrometric analysis of unfractionated serum in lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2007. **2**(10): p. 893-901.
64. Gao, W.M., R. Kuick, R.P. Orzechowski, et al., *Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis*. *BMC Cancer*, 2005. **5**: p. 110.
65. Yang, F., Z.Q. Xiao, X.Z. Zhang, et al., *Identification of tumor antigens in human lung squamous carcinoma by serological proteome analysis*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(2): p. 751-8.
66. Tockman, M.S., J.L. Mulshine, S. Piantadosi, et al., *Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(12 Pt 1): p. 2237-46.
67. Dreyfuss, G., M.J. Matunis, S. Pinol-Roma, et al., *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA*. *Annu Rev Biochem*, 1993. **62**: p. 289-321.
68. Pinol-Roma, S., Y.D. Choi, M.J. Matunis, et al., *Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins*. *Genes Dev*, 1988. **2**(2): p. 215-27.
69. Lewin, B., *Genes*. 1997, New York, USA: Oxford University Press.
70. Dreyfuss, G., V. Kim, and N. Kataoka, *Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**: p. 195-205.
71. Beyer, A.L., M.E. Christensen, B.W. Walker, et al., *Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles*. *Cell*, 1977. **11**(1): p. 127-38.
72. Lothstein, L., H.P. Arenstorff, S.Y. Chung, et al., *General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles*. *J Cell Biol*, 1985. **100**(5): p. 1570-81.

73. Idriss, H., A. Kumar, J.R. Casas-Finet, et al., *Regulation of in vitro nucleic acid strand annealing activity of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein A1 by reversible phosphorylation*. *Biochemistry*, 1994. **33**(37): p. 11382-90.
74. Pype, S., H. Slegers, L. Moens, et al., *Tyrosine phosphorylation of a M(r) 38,000 A/B-type hnRNP protein selectively modulates its RNA binding*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(50): p. 31457-65.
75. Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss, *Cell cycle-regulated phosphorylation of the pre-mRNA-binding (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) C proteins*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(9): p. 5762-70.
76. Pinol-Roma, S., M.S. Swanson, J.G. Gall, et al., *A novel heterogeneous nuclear RNP protein with a unique distribution on nascent transcripts*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2575-87.
77. Wagner, B.J., C.T. DeMaria, Y. Sun, et al., *Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms*. *Genomics*, 1998. **48**(2): p. 195-202.
78. Honore, B., H. Vorum, and U. Baandrup, *hnRNPs H, H' and F behave differently with respect to posttranslational cleavage and subcellular localization*. *FEBS Lett*, 1999. **456**(2): p. 274-80.
79. Honore, B., H.H. Rasmussen, H. Vorum, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28780-9.
80. Choi, Y.D. and G. Dreyfuss, *Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(23): p. 7471-5.
81. Choi, Y.D. and G. Dreyfuss, *Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells*. *J Cell Biol*, 1984. **99**(6): p. 1997-204.
82. Matunis, M.J., W.M. Michael, and G. Dreyfuss, *Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(1): p. 164-71.
83. Leser, G.P., J. Escara-Wilke, and T.E. Martin, *Monoclonal antibodies to heterogeneous nuclear RNA-protein complexes. The core proteins comprise a conserved group of related polypeptides*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(3): p. 1827-33.
84. Kay, B.K., R.K. Sawhney, and S.H. Wilson, *Potential for two isoforms of the A1 ribonucleoprotein in Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(4): p. 1367-71.
85. Preugschat, F. and B. Wold, *Isolation and characterization of a Xenopus laevis C protein cDNA: structure and expression of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein core protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9669-73.
86. Marcu, A., B. Bassit, R. Perez, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes from Xenopus laevis oocytes and somatic cells*. *Int J Dev Biol*, 2001. **45**(5-6): p. 743-52.
87. Good, P.J., M.L. Rebbert, and I.B. Dawid, *Three new members of the RNP protein family in Xenopus*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(4): p. 999-1006.

88. Burd, C., M. Swanson, M. Gorlach, et al., *Primary Structures of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2, B1, and C2 Proteins: A Diversity of RNA Binding Proteins is Generated by Small Peptide Inserts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(24): p. 9788-9792.
89. Kamma, H., H. Horiguchi, L. Wan, et al., *Molecular characterization of the hnRNP A2/B1 proteins: tissue-specific expression and novel isoforms*. Exp Cell Res, 1999. **246**(2): p. 399-411.
90. Matunis, E.L., M.J. Matunis, and G. Dreyfuss, *Characterization of the major hnRNP proteins from Drosophila melanogaster*. J Cell Biol, 1992. **116**(2): p. 257-69.
91. Matunis, M.J., E.L. Matunis, and G. Dreyfuss, *Isolation of hnRNP complexes from Drosophila melanogaster*. J Cell Biol, 1992. **116**(2): p. 245-55.
92. Haynes, S.R., D. Johnson, G. Raychaudhuri, et al., *The Drosophila Hrb87F gene encodes a new member of the A and B hnRNP protein group*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(1): p. 25-31.
93. Haynes, S.R., G. Raychaudhuri, and A.L. Beyer, *The Drosophila Hrb98DE locus encodes four protein isoforms homologous to the A1 protein of mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 316-23.
94. Burd, C.G. and G. Dreyfuss, *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. Science, 1994. **265**(5172): p. 615-21.
95. Bandziulis, R.J., M.S. Swanson, and G. Dreyfuss, *RNA-binding proteins as developmental regulators*. Genes Dev, 1989. **3**(4): p. 431-7.
96. Birney, E., S. Kumar, and A.R. Krainer, *Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(25): p. 5803-16.
97. Dreyfuss, G., M.S. Swanson, and S. Pinol-Roma, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation*. Trends Biochem Sci, 1988. **13**(3): p. 86-91.
98. Kenan, D.J., C.C. Query, and J.D. Keene, *RNA recognition: towards identifying determinants of specificity*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(6): p. 214-20.
99. Nagai, K., C. Oubridge, N. Ito, et al., *The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(6): p. 235-40.
100. Lutz, C.S. and J.C. Alwine, *Direct interaction of the U1 snRNP-A protein with the upstream efficiency element of the SV40 late polyadenylation signal*. Genes Dev, 1994. **8**(5): p. 576-86.
101. Nagai, K., C. Oubridge, T.H. Jessen, et al., *Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 515-20.
102. Hoffman, D.W., C.C. Query, B.L. Golden, et al., *RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2495-9.
103. Wittekind, M., M. Gorlach, M. Friedrichs, et al., *¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins*. Biochemistry, 1992. **31**(27): p. 6254-65.

104. Kiledjian, M. and G. Dreyfuss, *Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2655-64.
105. Fournier, M.J. and E.S. Maxwell, *The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(4): p. 131-5.
106. Tollervey, D., H. Lehtonen, R. Jansen, et al., *Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly*. Cell, 1993. **72**(3): p. 443-57.
107. Siomi, H., M.J. Matunis, W.M. Michael, et al., *The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(5): p. 1193-8.
108. Siomi, H., M.C. Siomi, R.L. Nussbaum, et al., *The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein*. Cell, 1993. **74**(2): p. 291-8.
109. Gibson, T.J., P.M. Rice, J.D. Thompson, et al., *KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(9): p. 331-3.
110. Kumar, A. and S.H. Wilson, *Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1*. Biochemistry, 1990. **29**(48): p. 10717-22.
111. Siomi, H., *A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein*. Journal of Cell Biology, 1995. **129**(3): p. 551-560.
112. Cartegni, L., M. Maconi, E. Morandi, et al., *hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins*. J Mol Biol, 1996. **259**(3): p. 337-48.
113. Weighardt, F., *Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1*. Journal of Cell Science, 1995. **108**(2): p. 545-555.
114. Weighardt, F., G. Biamonti, and S. Riva, *The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism*. Bioessays, 1996. **18**(9): p. 747-56.
115. Michael, W., M. Choi, and G. Dreyfuss, *A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway*. Cell, 1995. **83**(3): p. 415-22.
116. Swanson, M.S., T.Y. Nakagawa, K. LeVan, et al., *Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(5): p. 1731-9.
117. Mitchell, P.J. and R. Tjian, *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. Science, 1989. **245**(4916): p. 371-8.
118. Myer, V.E. and J.A. Steitz, *Isolation and characterization of a novel, low abundance hnRNP protein: A0*. RNA, 1995. **1**(2): p. 171-82.
119. Burd, C.G., M.S. Swanson, M. Gorlach, et al., *Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 9788-92.

120. Ma, A., K. Moran-Jones, J. Shan, et al., *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3, a Novel RNA Trafficking Response Element-binding Protein*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(20): p. 18010-18020.
121. Michael, W.M., M. Choi, and G. Dreyfuss, *A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway*. Cell, 1995. **83**(3): p. 415-22.
122. Nichols, R.C., X.W. Wang, J. Tang, et al., *The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization*. Exp Cell Res, 2000. **256**(2): p. 522-32.
123. Hatfield, J.T., J.A. Rothnagel, and R. Smith, *Characterization of the mouse hnRNP A2/B1/B0 gene and identification of processed pseudogenes*. Gene, 2002. **295**(1): p. 33-42.
124. Mayeda, A., S.H. Munroe, J.F. Caceres, et al., *Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins*. EMBO J, 1994. **13**(22): p. 5483-95.
125. Biamonti, G., M. Ruggiu, S. Saccone, et al., *Two homologous genes, originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(11): p. 1996-2002.
126. Kozu, T., B. Henrich, and K.P. Schafer, *Structure and expression of the gene (HNRPA2B1) encoding the human hnRNP protein A2/B1*. Genomics, 1995. **25**(2): p. 365-71.
127. Michelson, R.J., M.W. Collard, A.J. Ziemba, et al., *Nuclear DEAF-1-related (NUDR) protein contains a novel DNA binding domain and represses transcription of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 promoter*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30510-9.
128. Garayoa, M., Y.G. Man, A. Martinez, et al., *Downregulation of hnRNP A2/B1 expression in tumor cells under prolonged hypoxia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(1): p. 80-5.
129. Saccone, S., G. Biamonti, S. Maugeri, et al., *Assignment of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene (HNRPA1) to chromosome 12q13.1 by cDNA competitive in situ hybridization*. Genomics, 1992. **12**(1): p. 171-4.
130. Biamonti, G., M. Buvoli, M.T. Bassi, et al., *Isolation of an active gene encoding human hnRNP protein A1. Evidence for alternative splicing*. J Mol Biol, 1989. **207**(3): p. 491-503.
131. Biamonti, G., M.T. Bassi, L. Cartegni, et al., *Human hnRNP protein A1 gene expression. Structural and functional characterization of the promoter*. J Mol Biol, 1993. **230**(1): p. 77-89.
132. Frankfort, B.J. and I.H. Gelman, *Identification of novel cellular genes transcriptionally suppressed by v-src*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(3): p. 916-26.
133. Makeyev, A.V., C.B. Kim, F.H. Ruddle, et al., *HnRNP A3 genes and pseudogenes in the vertebrate genomes*. J Exp Zool A Comp Exp Biol, 2005. **303**(4): p. 259-71.
134. Camacho-Vanegas, O., F. Weighardt, C. Ghigna, et al., *Growth-dependent and growth-independent translation of messengers for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(19): p. 3950-4.
135. Pioli, P.A. and W.F. Rigby, *The von Hippel-Lindau protein interacts with heteronuclear ribonucleoprotein a2 and regulates its expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40346-52.

136. Carpenter, B., C. MacKay, A. Alnabulsi, et al., *The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression*. BBA-Reviews on Cancer, 2006. **1765**(2): p. 85-100.
137. He, Y. and R. Smith, *Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(7): p. 1239-56.
138. Pontius, B.W. and P. Berg, *Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8403-7.
139. Fukuda, H., M. Katahira, N. Tsuchiya, et al., *Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12685-90.
140. Han, H., R.J. Bennett, and L.H. Hurley, *Inhibition of unwinding of G-quadruplex structures by Sgs1 helicase in the presence of N,N'-bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide, a G-quadruplex-interactive ligand*. Biochemistry, 2000. **39**(31): p. 9311-6.
141. Kan, Z.Y., Y. Lin, F. Wang, et al., *G-quadruplex formation in human telomeric (TTAGGG)₄ sequence with complementary strand in close vicinity under molecularly crowded condition*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(11): p. 3646-53.
142. Nakagama, H., K. Higuchi, E. Tanaka, et al., *Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures*. Mutat Res, 2006. **598**(1-2): p. 120-31.
143. Khateb, S., P. Weisman-Shomer, I. Hershcó, et al., *Destabilization of tetraplex structures of the fragile X repeat sequence (CGG)_n is mediated by homolog-conserved domains in three members of the hnRNP family*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(14): p. 4145-54.
144. Kumar, A., K.R. Williams, and W. Szer, *Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins*. J Biol Chem, 1986. **261**(24): p. 11266-73.
145. Williams, K.R., K.L. Stone, M.B. LoPresti, et al., *Amino acid sequence of the UP1 calf thymus helix-destabilizing protein and its homology to an analogous protein from mouse myeloma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5666-70.
146. Chai, Q., L. Zheng, M. Zhou, et al., *Interaction and stimulation of human FEN-1 nuclease activities by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in alpha-segment processing during Okazaki fragment maturation*. Biochemistry, 2003. **42**(51): p. 15045-52.
147. Vera, J., M. Jaumot, J.M. Estanyol, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor*. Oncogene, 2006. **25**(2): p. 260-70.
148. Trzcinska-Daneluti, A.M., A. Gorecki, A. Czubaty, et al., *RRM proteins interacting with the cap region of topoisomerase I*. J Mol Biol, 2007. **369**(4): p. 1098-112.
149. Iwanaga, K., N. Sueoka, A. Sato, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 protein impairs DNA repair mediated through the inhibition of DNA-dependent protein kinase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 888-95.

150. Lee, S.Y., J.H. Park, S. Kim, et al., *A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks*. *Biochem J*, 2005. **388**(Pt 1): p. 7-15.
151. Zhang, S., B. Schlott, M. Gorlach, et al., *DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) phosphorylates nuclear DNA helicase II/RNA helicase A and hnRNP proteins in an RNA-dependent manner*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(1): p. 1-10.
152. Smith, J.R. and O.M. Pereira-Smith, *Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression*. *Science*, 1996. **273**(5271): p. 63-7.
153. Liu, L., S. Lai, L.G. Andrews, et al., *Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease*. *Gene*, 2004. **340**(1): p. 1-10.
154. Eversole, A. and N. Maizels, *In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(15): p. 5425-32.
155. Ford, L.P., J.M. Suh, W.E. Wright, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(23): p. 9084-91.
156. Ishikawa, F., M.J. Matunis, G. Dreyfuss, et al., *Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(7): p. 4301-10.
157. LaBranche, H., S. Dupuis, Y. Ben-David, et al., *Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase*. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 199-202.
158. Kamma, H., M. Fujimoto, M. Fujiwara, et al., *Interaction of hnRNP A2/B1 isoforms with telomeric ssDNA and the in vitro function*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **280**(3): p. 625-630.
159. Fiset, S. and B. Chabot, *hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(11): p. 2268-75.
160. Ford, L.P., W.E. Wright, and J.W. Shay, *A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation*. *Oncogene*, 2002. **21**(4): p. 580-3.
161. McKay, S.J. and H. Cooke, *hnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat TTAGGG_n*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(24): p. 6461-4.
162. Moran-Jones, K., L. Wayman, D.D. Kennedy, et al., *hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere*. *Nucleic Acids Research*, 2005. **33**(2): p. 486-496.
163. Tanaka, E., H. Fukuda, K. Nakashima, et al., *HnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **358**(2): p. 608-14.
164. Huang, P., S. Tsai, K. Hsieh, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 binds single-stranded telomeric DNA and inhibits telomerase extension in vitro*. *BBA-Molecular Cell Research*, 2008. **1783**(2): p. 193-202.
165. Patry, C., L. Bouchard, P. Labrecque, et al., *Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins*

- induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines.* Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 7679-88.
166. Ritchie, S.A., M.K. Pasha, D.J. Batten, et al., *Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(5): p. 1502-13.
 167. Michelotti, E.F., G.A. Michelotti, A.I. Aronsohn, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2350-60.
 168. Ostrowski, J., Y. Kawata, D.S. Schullery, et al., *Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): p. 3954-62.
 169. Lee, M.H., S. Mori, and P. Raychaudhuri, *trans-Activation by the hnRNP K protein involves an increase in RNA synthesis from the reporter genes.* J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3420-7.
 170. Miao, L.H., C.J. Chang, B.J. Shen, et al., *Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a repressor of C/EBPbeta-mediated gene activation.* J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10784-91.
 171. Kim, M.K. and V.M. Nikodem, *hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIH and represses RNA polymerase II elongation.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6833-44.
 172. Kukalev, A., Y. Nord, C. Palmberg, et al., *Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II.* Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(3): p. 238-44.
 173. Bagga, P.S., G.K. Arhin, and J. Wilusz, *DSEF-1 is a member of the hnRNP H family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation in vitro.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(23): p. 5343-50.
 174. Veraldi, K.L., G.K. Arhin, K. Martincic, et al., *hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1228-38.
 175. Moreira, A., Y. Takagaki, S. Brackenridge, et al., *The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms.* Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2522-34.
 176. Castelo-Branco, P., A. Furger, M. Wollerton, et al., *Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4174-83.
 177. DeMaria, C.T. and G. Brewer, *AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation.* J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12179-84.
 178. Sirenko, O.I., A.K. Lofquist, C.T. DeMaria, et al., *Adhesion-dependent regulation of an A+U-rich element-binding activity associated with AUF1.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3898-906.
 179. Loflin, P., C.Y. Chen, and A.B. Shyu, *Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element.* Genes Dev, 1999. **13**(14): p. 1884-97.
 180. Kiledjian, M., C.T. DeMaria, G. Brewer, et al., *Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4870-6.

181. Wang, Z., N. Day, P. Trifillis, et al., *An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(7): p. 4552-60.
182. Kong, J., X. Ji, and S.A. Liebhaber, *The KH-domain protein alpha CP has a direct role in mRNA stabilization independent of its cognate binding site*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(4): p. 1125-34.
183. Griffin, M.E., B.J. Hamilton, K.M. Roy, et al., *Post-transcriptional regulation of glucose transporter-1 by an AU-rich element in the 3'UTR and by hnRNP A2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **318**(4): p. 977-82.
184. Hamilton, B.J., R.C. Nichols, H. Tsukamoto, et al., *hnRNP A2 and hnRNP L bind the 3'UTR of glucose transporter 1 mRNA and exist as a complex in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **261**(3): p. 646-51.
185. Fahling, M., R. Mrowka, A. Steege, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 modulate collagen prolyl 4-hydroxylase, alpha (I) mRNA stability*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9279-86.
186. Rajagopalan, L.E., C.J. Westmark, J.A. Jarzembowski, et al., *hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(14): p. 3418-23.
187. Shih, S.C. and K.P. Claffey, *Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1359-65.
188. Nakielny, S., G. Dreyfuss, and G. Ran, *Transport of Proteins and RNAs Review in and out of the Nucleus*. *Cell*, 1999. **99**: p. 677-690.
189. Mili, S., H.J. Shu, Y. Zhao, et al., *Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(21): p. 7307-19.
190. Gorlich, D. and U. Kutay, *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999. **15**: p. 607-60.
191. Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss, *Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 730-2.
192. Visa, N., A.T. Alzhanova-Ericsson, X. Sun, et al., *A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 253-64.
193. Munro, T.P., R.J. Magee, G.J. Kidd, et al., *Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 34389-95.
194. Shan, J., K. Moran-Jones, T.P. Munro, et al., *Binding of an RNA trafficking response element to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1 and A2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(49): p. 38286-95.
195. Fridell, R.A., R. Truant, L. Thorne, et al., *Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta*. *J Cell Sci*, 1997. **110 (Pt 11)**: p. 1325-31.
196. Pollard, V.W., W.M. Michael, S. Nakielny, et al., *A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 985-94.
197. Rebane, A., A. Aab, and J.A. Steitz, *Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR*. *RNA*, 2004. **10**(4): p. 590-9.
198. Lichtenstein, M., W. Guo, and A.M. Tartakoff, *Control of nuclear export of hnRNP A1*. *Traffic*, 2001. **2**(4): p. 261-7.

199. Bonifaci, N., J. Moroianu, A. Radu, et al., *Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5055-60.
200. Siomi, M.C., P.S. Eder, N. Kataoka, et al., *Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1181-92.
201. Pinol-Roma, S., *HnRNP proteins and the nuclear export of mRNA*. Semin Cell Dev Biol, 1997. **8**(1): p. 57-63.
202. Vautier, D., P. Chesne, C. Cunha, et al., *Transcription-dependent nucleocytoplasmic distribution of hnRNP A1 protein in early mouse embryos*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 8): p. 1521-31.
203. Friend, L.R., S.P. Han, J.A. Rothnagel, et al., *Differential subnuclear localisation of hnRNPs A/B is dependent on transcription and cell cycle stage*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(10): p. 1972-80.
204. Stutz, F., A. Bachi, T. Doerks, et al., *REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export*. RNA, 2000. **6**(4): p. 638-50.
205. Pan, H., C. Luo, R. Li, et al., *Cyclophilin A is required for CXCR4-mediated nuclear export of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, activation and nuclear translocation of ERK1/2, and chemotactic cell migration*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 623-37.
206. Cammas, A., S.M. Lewis, S. Vagner, et al., *Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1395-403.
207. Xie, J., J.A. Lee, T.L. Kress, et al., *Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8776-81.
208. Ma, S., G. Liu, Y. Sun, et al., *Relocalization of the polypyrimidine tract-binding protein during PKA-induced neurite growth*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(6): p. 912-23.
209. Cobianchi, F., C. Calvio, M. Stoppini, et al., *Phosphorylation of human hnRNP protein A1 abrogates in vitro strand annealing activity*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(4): p. 949-55.
210. Municio, M.M., J. Lozano, P. Sanchez, et al., *Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta*. J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15884-91.
211. Buxade, M., J.L. Parra, S. Rousseau, et al., *The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 177-89.
212. Ostrowski, J., D.S. Schullery, O.N. Denisenko, et al., *Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3619-28.
213. Kim, J.H., K.Y. Paek, K. Choi, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(2): p. 708-20.
214. Evans, J.R., S.A. Mitchell, K.A. Spriggs, et al., *Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8012-20.

215. Ostareck, D.H., A. Ostareck-Lederer, M. Wilm, et al., *mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end*. Cell, 1997. **89**(4): p. 597-606.
216. Persson, P.B., A. Skalweit, R. Mrowka, et al., *Control of renin synthesis*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(3): p. R491-7.
217. Thiele, B.J., A. Doller, T. Kahne, et al., *RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis*. Circ Res, 2004. **95**(11): p. 1058-66.
218. Xiao, X., Y.S. Tang, J.Y. Mackins, et al., *Isolation and characterization of a folate receptor mRNA-binding trans-factor from human placenta. Evidence favoring identity with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41510-7.
219. Bonnal, S., F. Pileur, C. Orsini, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4144-53.
220. Kwon, S., E. Barbarese, and J.H. Carson, *The cis-acting RNA trafficking signal from myelin basic protein mRNA and its cognate trans-acting ligand hnRNP A2 enhance cap-dependent translation*. J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 247-56.
221. Kosturko, L.D., M.J. Maggipinto, G. Korza, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(8): p. 3521-33.
222. Nilsen, T.W., *The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?* Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1147-9.
223. Blaustein, M., F. Pelisch, and A. Srebrow, *Signals, pathways and splicing regulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(11): p. 2031-48.
224. Maniatis, T. and B. Tasic, *Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 236-43.
225. Hanamura, A., J.F. Caceres, A. Mayeda, et al., *Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors*. RNA, 1998. **4**(4): p. 430-44.
226. Smith, C.W. and J. Valcarcel, *Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 381-8.
227. Matlin, A.J., F. Clark, and C.W. Smith, *Understanding alternative splicing: towards a cellular code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 386-98.
228. Mayeda, A., D.M. Helfman, and A.R. Krainer, *Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(5): p. 2993-3001.
229. Dreyfuss, G., *Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles*. Annu Rev Cell Biol, 1986. **2**: p. 459-98.
230. Choi, Y.D., P.J. Grabowski, P.A. Sharp, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing*. Science, 1986. **231**(4745): p. 1534-9.
231. Mayeda, A. and A.R. Krainer, *Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2*. Cell, 1992. **68**(2): p. 365-75.
232. Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, et al., *hnRNP proteins and splicing control*. Adv Exp Med Biol, 2007. **623**: p. 123-47.

233. Sreaton, G.R., J.F. Caceres, A. Mayeda, et al., *Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors*. EMBO J, 1995. **14**(17): p. 4336-49.
234. Krainer, A.R., G.C. Conway, and D. Kozak, *The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites*. Cell, 1990. **62**(1): p. 35-42.
235. Krainer, A.R., G.C. Conway, and D. Kozak, *Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells*. Genes Dev, 1990. **4**(7): p. 1158-71.
236. Ge, H. and J.L. Manley, *A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro*. Cell, 1990. **62**(1): p. 25-34.
237. Sun, Q., A. Mayeda, R.K. Hampson, et al., *General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer*. Genes Dev, 1993. **7**(12B): p. 2598-608.
238. Rooke, N., V. Markovtsov, E. Cagavi, et al., *Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1874-84.
239. Marchand, V., A. Mereau, S. Jacquenet, et al., *A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding*. J Mol Biol, 2002. **323**(4): p. 629-52.
240. Zhu, D., G. Xu, S. Ghandhi, et al., *Modulation of the expression of p16INK4a and p14ARF by hnRNP A1 and A2 RNA binding proteins: implications for cellular senescence*. J Cell Physiol, 2002. **193**(1): p. 19-25.
241. Del Gatto, F. and R. Breathnach, *Exon and intron sequences, respectively, repress and activate splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 4825-34.
242. Hutchison, S., C. LeBel, M. Blanchette, et al., *Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29745-52.
243. Zhu, J., A. Mayeda, and A.R. Krainer, *Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1351-61.
244. Bilodeau, P.S., J.K. Domsic, A. Mayeda, et al., *RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8487-97.
245. Caputi, M., A. Mayeda, A.R. Krainer, et al., *hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 4060-7.
246. Kashima, T. and J.L. Manley, *A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 460-3.
247. Hua, Y., T.A. Vickers, H.L. Okunola, et al., *Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 834-48.
248. Dirksen, W.P., X. Li, A. Mayeda, et al., *Mapping the SF2/ASF binding sites in the bovine growth hormone exonic splicing enhancer*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 29170-7.

249. Zahler, A.M., C.K. Damgaard, J. Kjems, et al., *SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10077-84.
250. Eperon, I.C., O.V. Makarova, A. Mayeda, et al., *Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(22): p. 8303-18.
251. Tange, T.O., C.K. Damgaard, S. Guth, et al., *The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5748-58.
252. Blanchette, M. and B. Chabot, *Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1939-52.
253. Chabot, B., M. Blanchette, I. Lapierre, et al., *An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 1776-86.
254. Nasim, F.U., S. Hutchison, M. Cordeau, et al., *High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism*. RNA, 2002. **8**(8): p. 1078-89.
255. Simard, M.J. and B. Chabot, *Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7353-62.
256. Wollerton, M.C., C. Gooding, E.J. Wagner, et al., *Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 91-100.
257. Bothwell, A.L., D.W. Ballard, W.M. Philbrick, et al., *Murine polypyrimidine tract binding protein. Purification, cloning, and mapping of the RNA binding domain*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24657-63.
258. Mulligan, G.J., W. Guo, S. Wormsley, et al., *Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25480-7.
259. Chou, M.Y., J.G. Underwood, J. Nikolic, et al., *Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing*. Mol Cell, 2000. **5**(6): p. 949-57.
260. Southby, J., C. Gooding, and C.W. Smith, *Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2699-711.
261. Min, H., R.C. Chan, and D.L. Black, *The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event*. Genes Dev, 1995. **9**(21): p. 2659-71.
262. Chou, M.Y., N. Rooke, C.W. Turck, et al., *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 69-77.
263. Mayrand, S.H. and T. Pederson, *Crosslinking of hnRNP proteins to pre-mRNA requires U1 and U2 snRNPs*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(11): p. 3307-18.
264. Swanson, M.S. and G. Dreyfuss, *RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns*. EMBO J, 1988. **7**(11): p. 3519-29.

265. Buvoli, M., F. Cobianchi, and S. Riva, *Interaction of hnRNP A1 with snRNPs and pre-mRNAs: evidence for a possible role of A1 RNA annealing activity in the first steps of spliceosome assembly*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5017-25.
266. Buvoli, M., F. Cobianchi, G. Biamonti, et al., *Recombinant hnRNP protein A1 and its N-terminal domain show preferential affinity for oligodeoxynucleotides homologous to intron/exon acceptor sites*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(22): p. 6595-600.
267. van der Houven van Oordt, W., M.T. Diaz-Meco, J. Lozano, et al., *The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation*. J Cell Biol, 2000. **149**(2): p. 307-16.
268. Tan, E.M., *Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology*. Adv Immunol, 1989. **44**: p. 93-151.
269. Caporali, R., S. Bugatti, E. Bruschi, et al., *Autoantibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*. Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 25-32.
270. Dangli, A., A. Gualis, E. Vretou, et al., *Autoantibodies to the core proteins of hnRNPs*. FEBS Lett, 1988. **231**(1): p. 118-24.
271. Steiner, G., K. Hartmuth, K. Skrinier, et al., *Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1061-6.
272. Steiner, G., K. Skrinier, and J.S. Smolen, *Autoantibodies to the A/B proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex: novel tools for the diagnosis of rheumatic diseases*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **111**(4): p. 314-9.
273. Steiner, G., K. Skrinier, W. Hassfeld, et al., *Clinical and immunological aspects of autoantibodies to RA33/hnRNP-A/B proteins--a link between RA, SLE and MCTD*. Mol Biol Rep, 1996. **23**(3-4): p. 167-71.
274. Biamonti, G., C. Ghigna, R. Caporali, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs): an emerging family of autoantigens in rheumatic diseases*. Clin Exp Rheumatol, 1998. **16**(3): p. 317-26.
275. Hayer, S., M. Tohidast-Akrad, S. Haralambous, et al., *Aberrant expression of the autoantigen heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2 (RA33) and spontaneous formation of rheumatoid arthritis-associated anti-RA33 autoantibodies in TNF-alpha transgenic mice*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8327-36.
276. Montecucco, C., R. Caporali, F. Cobianchi, et al., *Identification of autoantibodies to the I protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(10): p. 1669-76.
277. Siapka, S., M. Patrinoiu-Georgoula, P.G. Vlachoyiannopoulos, et al., *Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen*. Autoimmunity, 2007. **40**(3): p. 223-33.
278. Heegaard, N.H., M.R. Larsen, T. Muncrief, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 identified as autoantigens by biochemical and mass spectrometric methods*. Arthritis Res, 2000. **2**(5): p. 407-14.

279. Stanek, D., J. Vencovsky, J. Kafkova, et al., *Heterogeneous nuclear RNP C1 and C2 core proteins are targets for an autoantibody found in the serum of a patient with systemic sclerosis and psoriatic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(12): p. 2172-7.
280. Kamma, H., D.S. Portman, and G. Dreyfuss, *Cell type-specific expression of hnRNP proteins*. *Exp Cell Res*, 1995. **221**(1): p. 187-96.
281. Calvio, C., G. Neubauer, M. Mann, et al., *Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry*. *RNA*, 1995. **1**(7): p. 724-33.
282. Aman, P., D. Ron, N. Mandahl, et al., *Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11)*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992. **5**(4): p. 278-85.
283. Ichikawa, H., K. Shimizu, Y. Hayashi, et al., *An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation*. *Cancer Res*, 1994. **54**(11): p. 2865-8.
284. Crozat, A., P. Aman, N. Mandahl, et al., *Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma*. *Nature*, 1993. **363**(6430): p. 640-4.
285. Gouble, A., S. Grazide, F. Meggetto, et al., *A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice*. *Cancer Res*, 2002. **62**(5): p. 1489-95.
286. He, Y., M. Brown, J. Rothnagel, et al., *Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation*. *Journal of Cell Science*, 2005. **118**(14): p. 3173-3183.
287. He, Y., J.A. Rothnagel, M.R. Epis, et al., *Downstream targets of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 mediate cell proliferation*. *Mol Carcinog*, 2009. **48**(2): p. 167-79.
288. Zhu, J. and X. Chen, *MCG10, a novel p53 target gene that encodes a KH domain RNA-binding protein, is capable of inducing apoptosis and cell cycle arrest in G(2)-M*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(15): p. 5602-18.
289. Holcik, M., B.W. Gordon, and R.G. Korneluk, *The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 280-8.
290. Garneau, D., T. Revil, J.F. Fiset, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22641-50.
291. Patry, C., B. Lemieux, R.J. Wellinger, et al., *Targeting heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and A2 proteins by RNA interference promotes cell death in transformed but not in normal mouse cell lines*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(10): p. 1193-9.
292. de Hoog, C.L., L.J. Foster, and M. Mann, *RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers*. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 649-62.
293. Mulshine, J.L., F. Cuttitta, M. Bibro, et al., *Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer*. *J Immunol*, 1983. **131**(1): p. 497-502.

294. Zhou, J., S.M. Jensen, S.M. Steinberg, et al., *Expression of early lung cancer detection marker p31 in neoplastic and non-neoplastic respiratory epithelium*. Lung Cancer, 1996. **14**(1): p. 85-97.
295. Zhou, J., J.L. Mulshine, E.J. Unsworth, et al., *Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody 703D4*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10760-6.
296. Tockman, M.S., P.K. Gupta, J.D. Myers, et al., *Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection*. J Clin Oncol, 1988. **6**(11): p. 1685-93.
297. Fielding, P., L. Turnbull, W. Prime, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 4048-52.
298. Fujiki, H., M. Suganuma, S. Okabe, et al., *Cancer prevention with green tea and monitoring by a new biomarker, hnRNP B1*. Mutat Res, 2001. **480-481**: p. 299-304.
299. Fujimoto, N., N. Sueoka, E. Sueoka, et al., *Lung cancer prevention with (-)-epigallocatechin gallate using monitoring by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1*. Int J Oncol, 2002. **20**(6): p. 1233-9.
300. Sueoka, E., N. Sueoka, Y. Goto, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as early cancer biomarker for occult cancer of human lungs and bronchial dysplasia*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1896-902.
301. Snead, D.R.J., B. Perunovic, N. Cullen, et al., *hnRNP B1 expression in benign and malignant lung disease*. Journal of Pathology, 2003. **200**(1): p. 88-94.
302. Sueoka, E., N. Sueoka, K. Iwanaga, et al., *Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction*. Lung Cancer, 2005. **48**(1): p. 77-83.
303. Sato, A., N. Sueoka-Aragane, J. Saitoh, et al., *Establishment of a new method, transcription-reverse transcription concerted reaction, for detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a biomarker of lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008.
304. Hiraki, A., T. Murakami, K. Aoe, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 expression in malignant mesothelioma*. Cancer Science, 2006. **97**(11): p. 1175-1181.
305. Wu, S.L., M. Sato, C. Endo, et al., *hnRNP B1 protein may be a possible prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung*. Lung Cancer, 2003. **41**(2): p. 179-186.
306. Katsimpoula, S., M. Patrino-Georgoula, N. Makrilia, et al., *Overexpression of hnRNPA2/B1 in bronchoscopic specimens: a potential early detection marker in lung cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(4): p. 1373-82.
307. Zhou, J., L. Nong, M. Wloch, et al., *Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2001b. **34**(3): p. 341-50.
308. Zech, V., M. Dlaska, A. Tzankov, et al., *Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer*. Cancer Detection and Prevention, 2006. **30**(5): p. 395-402.

309. Tani, H., K. Ohshima, S. Haraoka, et al., *Overexpression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 in lymphoproliferative disorders: high expression in cells of follicular center origin*. *Int J Oncol*, 2002. **21**(5): p. 957-63.
310. Yan-Sanders, Y., G.J. Hammons, and B.D. Lyn-Cook, *Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells*. *Cancer Lett*, 2002. **183**(2): p. 215-20.
311. Zhou, J., D.C. Allred, I. Avis, et al., *Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2001a. **66**(3): p. 217-24.
312. Peebles, K.A., L.D. Dwyer-Nield, and A.M. Malkinson, *Altered expression of splicing factor, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, in mouse lung neoplasia*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**(11): p. 887-900.
313. Zhou, J., J.L. Mulshine, J.Y. Ro, et al., *Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in bronchial epithelium of chronic smokers*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(7): p. 1631-40.
314. Satoh, H., H. Ishikawa, H. Kamma, et al., *HnRNP A2/B1 proteins in nontumorous alveolar cells*. *Lung*, 2003. **181**(4): p. 219-225.
315. Garayoa, M., Y.-G. Man, A. Martinez, et al., *Downregulation of hnRNP A2/B1 Expression in Tumor Cells under Prolonged Hypoxia*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003. **28**(1): p. 80-85.
316. Montuenga, L.M., J. Zhou, I. Avis, et al., *Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 changes with critical stages of mammalian lung development*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. **19**(4): p. 554-62.
317. Man, Y.G., A. Martinez, I.M. Avis, et al., *Phenotypically different cells with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression show similar genetic alterations*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. **23**(5): p. 636-45.
318. Pino, I., R. Pio, G. Toledo, et al., *Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer*. *Lung Cancer*, 2003. **41**(2): p. 131-43.
319. Sheu, C.C., M.Y. Chang, H.C. Chang, et al., *Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer*. *Oncology*, 2006. **70**(3): p. 203-11.
320. Nesterova, M., N. Johnson, C. Cheadle, et al., *Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis*. *BBA-Molecular Basis of Disease*, 2006. **1762**(4): p. 398-403.
321. Nesterova, M.V., N. Johnson, C. Cheadle, et al., *Autoantibody cancer biomarker: extracellular protein kinase A*. *Cancer Res*, 2006. **66**(18): p. 8971-4.
322. Cho-Chung, Y.S., *Autoantibody biomarkers in the detection of cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(6): p. 587-91.
323. Belousov, P.V., D.V. Kuprash, A.Y. Sazykin, et al., *Cancer-associated antigens and antigen arrays in serological diagnostics of malignant tumors*. *Biochemistry (Mosc)*, 2008. **73**(5): p. 562-72.

324. Caron, M., G. Choquet-Kastylevsky, and R. Joubert-Caron, *Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(7): p. 1115-22.
325. Tan, E.M. and J. Zhang, *Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 328-40.
326. Soussi, T., *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1777-88.
327. Fernandez-Madrid, F., P. VandeVord, X. Yang, et al., *Antinuclear Antibodies as Potential Markers of Lung Cancer 1*. Clinical Cancer Research, 1999. **5**(6): p. 1393-1400.
328. Fernandez Madrid, F., R.L. Karvonen, J. Ensley, et al., *Spectra of antinuclear antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the lung and of the head and neck*. Cancer Detect Prev, 2005. **29**(1): p. 59-65.
329. Murray, P.V., T. Soussi, M.E. O'Brien, et al., *Serum p53 antibodies: predictors of survival in small-cell lung cancer?* Br J Cancer, 2000. **83**(11): p. 1418-24.
330. Nakanishi, T., T. Takeuchi, K. Ueda, et al., *Detection of eight antibodies in cancer patients' sera against proteins derived from the adenocarcinoma A549 cell line using proteomics-based analysis*. Journal of Chromatography B, 2006. **838**(1): p. 15-20.
331. Chapman, C., A. Murray, J. McElveen, et al., *Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure*. Thorax, 2008. **63**(3): p. 228.
332. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
333. Fritz, A., R. Parisot, D. Newmeyer, et al., *Small nuclear U-ribonucleoproteins in Xenopus laevis development. Uncoupled accumulation of the protein and RNA components*. J Mol Biol, 1984. **178**(2): p. 273-85.
334. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
335. Harlow, E. and D. Lane, *Antibodies : a laboratory manual*. 1988, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. xiii, 726 p.
336. Bas, A., G. Forsberg, S. Hammarstrom, et al., *Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2004. **59**(6): p. 566-73.
337. Tokunaga, K., Y. Nakamura, K. Sakata, et al., *Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers*. Cancer Res, 1987. **47**(21): p. 5616-9.
338. Zhong, H. and J.W. Simons, *Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(3): p. 523-6.
339. Venables, J.P., C.S. Koh, U. Froehlich, et al., *Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(19): p. 6033-43.
340. Caballero, O.L., S.J. de Souza, R.R. Brentani, et al., *Alternative spliced transcripts as cancer markers*. Dis Markers, 2001. **17**(2): p. 67-75.

341. Tölg, C., M. Hofmann, P. Herrlich, et al., *Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability*. Nucleic Acids Research, 1993. **21**(5): p. 1225-1229-1225-1229.
342. Sneath, R.J. and D.C. Mangham, *The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia*. Molecular Pathology: MP, 1998. **51**(4): p. 191-200.
343. Suzuki, H. and K. Yamashiro, *Reduced expression of CD44 v3 and v6 is related to invasion in lung adenocarcinoma*. Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands), 2002. **38**(2): p. 137-41.
344. Wimmel, A., E. Kogan, A. Ramaswamy, et al., *Variant expression of CD44 in preneoplastic lesions of the lung*. Cancer, 2001. **92**(5): p. 1231-6.
345. Takahashi, K., F. Takahashi, M. Hirama, et al., *Restoration of CD44S in non-small cell lung cancer cells enhanced their susceptibility to the macrophage cytotoxicity*. Lung Cancer, 2003. **41**(2): p. 145-53.
346. Matsubara, Y., S. Katoh, H. Taniguchii, et al., *Expression of CD44 variants in lung cancer and its relationship to hyaluronan binding*. J Int Med Res, 2000. **28**(2): p. 78-90.
347. Washimi, O., R. Ueda, Y. Ariyoshi, et al., *Expression of CD44 variant isoforms in normal and neoplastic cells of the lung*. Jpn J Cancer Res, 1994. **85**(11): p. 1112-6.
348. Penno, M.B., J.T. August, S.B. Baylin, et al., *Expression of CD44 in human lung tumors*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1381-7.
349. Hirata, T., T. Fukuse, H. Naiki, et al., *Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1108-10.
350. Fasano, M., M.T. Sabatini, R. Wieczorek, et al., *CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis?* Cancer, 1997. **80**(1): p. 34-41.
351. Kondo, K., T. Miyoshi, N. Hino, et al., *High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers*. J Surg Oncol, 1998. **69**(3): p. 128-36.
352. Pind, M.T. and P.H. Watson, *SR protein expression and CD44 splicing pattern in human breast tumours*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **79**(1): p. 75-82.
353. Stickeler, E., F. Kittrell, D. Medina, et al., *Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis*. Oncogene, 1999. **18**(24): p. 3574-82.
354. Ghigna, C., M. Moroni, C. Porta, et al., *Altered expression of heterogenous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas*. Cancer Res, 1998. **58**(24): p. 5818-24.
355. Zerbe, L.K., I. Pino, R. Pio, et al., *Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing*. Mol Carcinog, 2004. **41**(4): p. 187-96.
356. Matter, N., M. Marx, S. Weg-Remers, et al., *Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35353-60.

357. Salles, G., M. Zain, W. Jiang, et al., *Alternatively spliced CD44 transcripts in diffuse large-cell lymphomas: characterization and comparison with normal activated B cells and epithelial malignancies*. *Blood*, 1993. **82**(12): p. 3539.
358. Kondo, K., T. Miyoshi, N. Hino, et al., *High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers*. *Journal of Surgical Oncology*, 1998. **69**(3): p. 128-36.
359. Tran, T.A., B.V. Kallakury, C.E. Sheehan, et al., *Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas*. *Human Pathology*, 1997. **28**(7): p. 809-14.
360. Miyoshi, T., K. Kondo, N. Hino, et al., *The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer*. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 1997. **3**(8): p. 1289-97.
361. Kim, J.H., B. Hahm, Y.K. Kim, et al., *Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm*. *J Mol Biol*, 2000. **298**(3): p. 395-405.
362. Plomaritoglou, A., T. Choli-Papadopoulou, and A. Guialis, *Molecular characterization of a murine, major A/B type hnRNP protein: mBx*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2000. **1490**(1-2): p. 54-62.
363. Franceschini, F. and I. Cavazzana, *Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies*. *Autoimmunity*, 2005. **38**(1): p. 55-63.
364. Migliorini, P., C. Baldini, V. Rocchi, et al., *Anti-Sm and anti-RNP antibodies*. *Autoimmunity*, 2005. **38**(1): p. 47-54.
365. Sueoka, E., N. Sueoka, Y. Goto, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as early cancer biomarker for occult cancer of human lungs and bronchial dysplasia*. *Cancer Research*, 2001. **61**(5): p. 1896-1902.
366. Tominaga, M., N. Sueoka, K. Irie, et al., *Detection and discrimination of preneoplastic and early stages of lung adenocarcinoma using hnRNP B1 combined with the cell cycle-related markers p16, cyclin D1, and Ki-67*. *Lung Cancer*, 2003. **40**(1): p. 45-53.
367. Snead, D.R., B. Perunovic, N. Cullen, et al., *hnRNP B1 expression in benign and malignant lung disease*. *J Pathol*, 2003. **200**(1): p. 88-94.
368. Zhou, J., J.L. Mulshine, J.Y. Ro, et al., *Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in bronchial epithelium of chronic smokers*. *Clinical Cancer Research*, 1998. **4**(7): p. 1631-1640.
369. Fielding, P., L. Turnbull, W. Prime, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: A clinical marker of early lung cancer detection*. *Clinical Cancer Research*, 1999. **5**(12): p. 4048-4052.
370. Zhou, J., J.L. Mulshine, E.J. Unsworth, et al., *Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer - Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody 703D4*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(18): p. 10760-10766.

371. Zhou, J., L. Nong, M. Wloch, et al., *Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2001. **34**(3): p. 341-350.
372. Satoh, H., H. Kamma, H. Ishikawa, et al., *Expression of hnRNP A2/B1 proteins in human cancer cell lines*. International Journal of Oncology, 2000. **16**(4): p. 763-767.
373. Sueoka, E., Y. Goto, N. Sueoka, et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers*. Cancer Research, 1999. **59**(7): p. 1404-1407.
374. Pino, I., R. Pio, G. Toledo, et al., *Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer*. Lung Cancer, 2003. **41**(2): p. 131-143.
375. Hamasaki, M., H. Kamma, W.W. Wu, et al., *Expression of hnRNP B1 in four major histological types of lung cancers*. Anticancer Research, 2001. **21**(2A): p. 979-984.
376. He, Y.W., M.A. Brown, J.A. Rothnagel, et al., *Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(14): p. 3173-3183.
377. Ushigome, M., T. Ubagai, H. Fukuda, et al., *Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers*. International Journal of Oncology, 2005. **26**(3): p. 635-640.
378. Patry, C., L. Bouchard, P. Labrecque, et al., *Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines*. Cancer Research, 2003. **63**(22): p. 7679-7688.
379. Gygi, S.P., Y. Rochon, B.R. Franza, et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
380. Mazan-Mamczarz, K. and R.B. Gartenhaus, *Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1*. Cancer Genomics Proteomics, 2007. **4**(3): p. 233-9.
381. Hanamura, A., J.F. Caceres, A. Mayeda, et al., *Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors*. Rna-a Publication of the Rna Society, 1998. **4**(4): p. 430-444.
382. Zerbe, L.K., I. Pino, R. Pio, et al., *Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: Implications for pre-mRNA processing*. Molecular Carcinogenesis, 2004. **41**(4): p. 187-196.
383. Zech, V.F.E., M. Dlaska, A. Tzankov, et al., *Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer*. Cancer Detection and Prevention, 2006. **30**(5): p. 395-402.
384. Ortholan, C., M.P. Puissegur, M. Ilie, et al., *MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets*. Curr Med Chem, 2009. **16**(9): p. 1047-61.
385. Plomaritoglou, A., T. Choli-Papadopoulou, and A. Guialis, *Molecular characterization of a murine, major A/B type hnRNP protein: mBx*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1490**(1-2): p. 54-62.