



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ  
ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ hnRNA ΚΑΙ mRNA ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ, ΕΞΕΛΙΞΗ  
ΚΑΙ ΚΑΘΙΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ>>**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ  
ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ hnRNA ΚΑΙ mRNA ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ, ΕΞΕΛΙΞΗ  
ΚΑΙ ΚΑΘΙΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ>>**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**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)>>

*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, υπό την επίβλεψη της Δρ. Α. Γκιάλη. 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*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ

Προεξέχουσα θέση ανάμεσα στους ανθρώπους που θέλω να ευχαριστήσω κατέχει η Δρ. Αποστολία Γκιάλη. Την ευχαριστώ ολόψυχα καταρχήν για την υπομονή και επιμονή που έδειξε σε όλα τα βήματα της ερευνητικής μου πορείας. Αποτέλεσε για μένα αστείρευτη πηγή γνώσεων, έμπνευσης και ηθικής υποστήριξης και μου δίδαξε τον τρόπο να αξιοποιώ με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τις δεξιότητές μου. Η συμβολή της ξεπέρασε τα όρια της απλής συνεργασίας, δίνοντάς μου την ευκαιρία να αποκτήσω μια πιο βαθιά και ανθρώπινη σχέση μαζί της. Την ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια, που πίστεψε σε εμένα και που μου έδειξε τον τρόπο να αγαπώ αυτό που κάνω.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Δρ. Μερóπη Πατρινού-Γεωργούλα, Ερευνήτρια στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ι.Β.Ε.Β. Η συμβολή, οι ιδέες και παρατηρήσεις της ήταν καθοριστικής σημασίας για την πρόοδο και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις συμβουλές και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε απλόχερα στις δύσκολες στιγμές αυτών των χρόνων.

Ευχαριστώ τον Δρ. Δ. Κοντογιάννη από το Ε.ΚΕ.ΒΕ Φλέμινγκ για την βοήθεια και την συνεργασία του σχετικά με την διαθεσιμότητα των ιστολογικών δειγμάτων και των μελών της εργαστηριακής του ομάδας που συντέλεσαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να παρευρίσκονται ως κριτές στην παρουσίαση της Διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση και την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, για την σημαντική τους επιστημονική καθοδήγηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ρ. Τσουνή, την κ. Ε. Κολοντή και την Β. Γκάνου για την πολύτιμη βοήθεια στο εργαστήριο και την φιλία τους, καθώς και την Α. Κορύλλου και τον Γ. Μπουκάκη για την συμπαράστασή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Την ανεξάντλητη αγάπη και ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στους γονείς μου Κώστα και Δήμητρα, αλλά και στα αδέρφια μου, Βαλεντίνα και Γιώργο, για την στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα και που με βοήθησαν να φτάσω ως εδώ.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό μου Ηλία καθώς και στους γονείς του Ειρήνη και Αντρέα, οι οποίοι με την συμπαράσταση και την απέραντη υπομονή τους διευκόλυναν σε μεγάλο βαθμό την διεκπεραίωση της Διδακτορικής μου Διατριβής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A.1 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ mRNA ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ.....	1
A.1.1 <u>Μεταγραφή</u> .....	2
A.1.1.1 Μηχανισμός μεταγραφής : Έναρξη-Επιμήκυνση-Λήξη.....	2
A.1.2 <u>Μετα-μεταγραφικός έλεγχος-ωρίμανση του pre-RNA</u> .....	4
A.1.2.1 Κάλυψη (capping).....	4
A.1.2.2 Μάτισμα (splicing).....	5
A.1.2.3 Εσόνια πυρηνικών pre-mRNA.....	5
A.1.2.4 Cis-στοιχεία των pre-mRNA.....	6
A.1.2.5 Μηχανισμός του ματίσματος των pre-mRNA.....	7
A.1.2.6 Στάδια συγκρότησης του ματισματοσώματος (spliceosome).....	9
A.1.2.7 Συμμετοχή άλλων trans-στοιχείων στο μάτισμα.....	10
A.1.2.8 Εναλλακτικό μάτισμα (Alternative splicing).....	11
A.1.2.9 Πολυαδενυλίωση ( Ωρίμανση του 3' άκρου).....	13
A.1.3 <u>Μεταφορά mRNA στο κυτταρόπλασμα</u> .....	14
A.1.3.1 Σταθεροποίηση/αποσταθεροποίηση του mRNA.....	17
A.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΟ RNA (RBPs).....	18
A.2.1 <u>Πρωτεΐνες hnRNP</u> .....	19
A.2.1.1 Μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP.....	19
A.2.1.2 Δομή των πρωτεϊνών hnRNP.....	23
A.2.1.3 <u>Κυτταρικές λειτουργίες των πρωτεϊνών hnRNP</u> .....	26
A.2.1.3.1 Πρωτεΐνες hnRNP ως ρυθμιστές ματίσματος.....	27
A.2.1.3.2 Συμμετοχή των hnRNPs στην πολυαδενυλίωση.....	28
A.2.1.3.3 Μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα με την διαμεσολάβηση πρωτεϊνών hnRNP.....	29
A.2.1.3.4 Ρόλος πρωτεϊνών hnRNP στη σταθεροποίηση/αποσταθεροποίηση του mRNA γονιδίων-στόχων.....	30
A.2.2 <u>Συμμετοχή άλλων πρωτεϊνών RBP στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο του mRNA</u> .....	31
A.2.2.1 Πρωτεΐνη HuR.....	32
A.2.2.2 Πρωτεΐνη TIA-1.....	34



A.3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	35
A.3.1 <u>Απορρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP σε διάφορους τύπους καρκίνου</u> .....	39
A.3.2 <u>Ρόλος της πρωτεΐνης HuR στον καρκίνο</u> .....	40
A.3.3 <u>Καρκίνος του πνεύμονα</u> .....	41
A.3.4 <u>Επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα σε ζωικά μοντέλα ποντικού</u> .....	44
A.3.5 <u>Έκφραση πρωτεϊνών RBP σε πειραματικά πρότυπα ποντικού</u> .....	46
A.4 <u>ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u> .....	47
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
B.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	49
B.1.1 Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών ποντικού με siRNA κατά του γονιδίου της πρωτεΐνης hnRNP A3.....	50
B.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ.....	51
B.2.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών.....	51
B.2.2 Παρασκευή πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών.....	52
B.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	53
B.3.1 Ολικό εκχύλισμα ιστών ποντικού στελέχους CD1.....	53
B.3.2 Διαλυτά και μη διαλυτά κλάσματα πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους CD1 και A/J.....	54
B.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	54
B.4.1 Απομόνωση RNA από διαλυτά κλάσματα πνευμονικού ιστού ποντικού στελέχους A/J.....	54
B.4.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.....	55
B.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.....	56
B.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	56
B.5.1 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμίδης (SDS/PAGE).....	57
B.5.2 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE).....	58

B.5.3 Μεταφορά πρωτεϊνών ( Western Transfer).....	59
B.5.4 RT-PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	59
B.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBPs..	61
B.6.1 Απομόνωση πρωτεϊνών RBP μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με μονόκλωνο DNA (ssDNA).....	61
B.6.2 Πειράματα καταβύθισης με χρήση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών.....	62
B.7 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
B.7.1 Ανοσοστύπωση (immunoblotting).....	64
B.7.2 Ανοσοκατακρήμνιση.....	65
B.7.3 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση πνευμονικού ιστού ποντικού.....	67
B.7.3.1 Προετοιμασία τομών.....	67
B.7.3.2 Μορφολογία πνεύμονα ποντικού μέσω χρώσης αιματοξυλίνης/εοσίνης.....	67
B.7.3.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)- Χρώση με DAB.....	68
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
Γ.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ RNP.....	70
Γ.1.1 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για την μελέτη συμπλόκων RNP.....	70
Γ.1.2 χρωματογραφία συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης.....	74
Γ.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΣΤΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ..	76
Γ.2.1. Σύγκριση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών RBPs μεταξύ ανθρώπου και τρωκτικών.....	77
Γ.2.2. <u>Προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών RBPs σε πειραματικά ζωικά μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα</u> .....	83
Γ.2.2.1 <u>Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με ουρεθάνη σε ποντικούς στελέχους A/J</u> .....	85
Γ.2.2.1.1 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική μελέτη φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους A/J.....	86
Γ.2.2.1.2 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP και HuR στον πνεύμονα ποντικών A/J.....	90
Γ.2.2.2 <u>Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με ουρεθάνη σε ποντικούς στελέχους B6/129</u> .....	95

Γ.2.2.2.1 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική μελέτη φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους B6/129.....	95
Γ.2.2.2.2 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP και HuR στον πνεύμονα ποντικών στελέχους B6/129 μετά από χορήγηση ουρεθάνης.....	99
Γ.2.2.3 Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) σε ποντικούς στελέχους CD-1.....	100
Γ.2.2.3.1 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP στον πνεύμονα ποντικών CD1.....	101
Γ.2.2.4 Έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP και HuR σε ανθρώπινες βιοψίες του πνεύμονα.....	102
Γ.2.3 <u>Μείωση των επιπέδων της hnRNPA3 με siRNA σε κυτταρικές σειρές ποντικού.</u> .....	104
Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ hnRNP ΚΑΙ HuR.....	109
Γ.3.1 Η παρουσία της πρωτεΐνης HuR σε σύμπλοκα hnRNP και mRNP που απομονώθηκαν από ανθρώπινα κυτταρικά εκχυλίσματα.....	110
Γ.3.2 Η διασύνδεση της HuR, ανεξάρτητη της παρουσίας RNA, με το βοηθητικό μοτίβο της hnRNP A3, in vitro.....	118
Γ.3.3 Κυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών HuR και hnRNP και ικανότητα διασύνδεσης σε διακριτά υπο-πυρηνικά κλάσματα (επίδραση του θερμικού στρες).....	121
Γ.3.4 Επίδραση θερμικού στρες στην κατανομή και αλληλεπίδραση HuR-hnRNPs.....	124
Γ.3.5. Διαφαινόμενη ειδική διασύνδεση hnRNP C1/C2 με HuR.....	129
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
Δ.1 Συγκριτική ανάλυση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών RBP στον άνθρωπο και στα τρωκτικά .....	134
Δ.2 Έκφραση πρωτεϊνών hnRNP/mRNP στον χημικά επαγόμενο καρκίνο του πνεύμονα του ποντικού.....	137
Δ.3 Συμμετοχή της πρωτεΐνης HuR σε σύμπλοκα hnRNP και mRNP.....	142

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	150
SUMMARY.....	152
Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	154

## A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ mRNA ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες περιλαμβάνει το στάδιο της μεταγραφής του DNA σε mRNA και την απευθείας μετάφρασή του σε πρωτεϊνικά μόρια. Αντίθετα, στα ευκαρυωτικά συστήματα και ιδιαίτερα στα θηλαστικά, η διαδικασία της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Συγκεκριμένα, ανάμεσα στο στάδιο της μεταγραφής και της μετάφρασης του ώριμου mRNA παρεμβάλλεται το στάδιο του μετα-μεταγραφικού ελέγχου που αφορά πολύπλοκες διεργασίες ωρίμανσης των πρόδρομων RNA (pre-mRNA) για παραγωγή των ώριμων μορίων του mRNA. Τα κύρια στάδια της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής ρύθμισης περιλαμβάνουν: την κάλυψη (capping) του 5' άκρου του νεοσυντιθέμενου pre-mRNA, το ιδιότυπο ή βασικό μάτισμα (splicing), την πολυαδενυλίωση, την μεταφορά του ώριμου mRNA στο κυτταρόπλασμα και τέλος την σταθερότητα ή/και αποικοδόμησή του πριν την μετάφραση.

Κατά την διάρκεια της μεταγραφής, τα νεοσυντιθέμενα πρόδρομα μόρια RNA (pre-mRNAs ή hnRNAs) συνδέονται με μια πληθώρα πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης στο RNA (RBPs) σχηματίζοντας δυναμικά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (hnRNPs) τα οποία αποτελούν τα φυσικά υποστρώματα των πυρηνικών διεργασιών ωρίμανσης του mRNA. Οι πρωτεΐνες που προσδέουν hnRNA και οι οποίες δεν αποτελούν σταθερά συστατικά άλλων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (π.χ. των μικρών πυρηνικών RNPs: snRNPs) ονομάζονται πρωτεΐνες hnRNP (Dreyfuss et al., 1988). Μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNPs, εκτός από τον βασικό τους ρόλο στην ωρίμανση του pre-mRNA, συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως στον σχηματισμό τελομερών, στην απόπτωση και στην κυτταρική σηματοδότηση και έχουν την ικανότητα να παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992).

### A.1.1 Μεταγραφή

Η μεταγραφή του DNA σε RNA που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες (pre-mRNA ή hnRNA) αποτελεί μια πυρηνική διεργασία η οποία καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις RNA πολυμεράσες, και εξαρτάται από πολλούς άλλους παράγοντες που αποτελούν στοιχεία του ίδιου του DNA (cis-αλληλουχίες) με πρωτεϊνικούς παράγοντες που δρουν in trans.

Οι RNA πολυμεράσες είναι σύνθετα μόρια που αποτελούνται από πολλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν τρία διαφορετικά ένζυμα RNA πολυμεράσης (I, II και III) τα οποία συνθέτουν τους διαφορετικούς τύπους RNA. Συγκεκριμένα, η πρόδρομη μορφή του mRNA (pre-mRNA ή hnRNA) συντίθεται από την RNA πολυμεράση II στο πυρηνόπλασμα. Το μεταφορικό RNA (tRNA) και ριβοσωμικό 5SRNA είναι προϊόντα της RNA πολυμεράσης III, ενώ τα είδη του ριβοσωμικού RNA 5.8S, 18S και 28S μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση I. Τέλος, όλα τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNA) U1, U2, U4, και U5, μόρια που συμμετέχουν ενεργά στο μάτισμα του pre-mRNA και αναφέρονται συχνά ως U-snRNA, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II εκτός του U6 snRNA που είναι προϊόν της RNA πολυμεράσης III. Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στα μετάγραφα της πολυμεράσης II των ευκαρυωτικών κυττάρων γνωστά ως pre-mRNA ή ετερογενή πυρηνικά RNA (hnRNA) λόγω της ετερογένειας των μεγεθών που παρουσιάζουν (2000-20000 νουκλεοτίδια) και της πυρηνικής τους εντόπισης, μεταφέροντας την αποθηκευμένη στο DNA γενετική πληροφορία από τον πυρήνα στα ριβοσώματα για την σύνθεση των πρωτεϊνών.

#### A.1.1.1.Μηχανισμός μεταγραφής : Έναρξη-Επιμήκυνση-Λήξη

Η **έναρξη** της μεταγραφής ξεκινάει με την συγκρότηση του συμπλόκου προέναρξης PIC στον υποκινητή. Το σύμπλοκο PIC αποτελείται από την RNA πολυμεράση II (Pol II) και ένα σύνολο πρωτεϊνών γνωστών ως γενικών παραγόντων μεταγραφής (GTFs: general transcription factors) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II στον υποκινητή και ορίζουν το ακριβές σημείο για την έναρξη της μεταγραφής. Στα περισσότερα γονίδια, ο υποκινητής της RNA πολυμεράσης II

περιλαμβάνει μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή πλούσια σε AT (TATA box) η οποία βρίσκεται 20-30 ζεύγη βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής, καθώς και λιγότερο συντηρημένες αλληλουχίες περίπου 80 νουκλεοτίδια πριν από το σημείο έναρξης (CAAT box). Στους γενικούς παράγοντες μεταγραφής ανήκει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο TFIID, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη TBP που προσδένεται στο TATA box καθώς και από οκτώ τουλάχιστον παράγοντες που συνδέονται με την πρωτεΐνη TBP. Ωστόσο στην έναρξη της μεταγραφής συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες όπως οι TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFIIF. Αρχικά, οι παράγοντες TFIIA, TFIIB και TFIID συνδέονται με τον υποκινητή ενώ ακολουθεί η πρόσδεση των υπόλοιπων παραγόντων της μεταγραφής και της πολυμεράσης II, με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής από το σημείο έναρξης +1 με την σύνθεση των πρώτων ριβονουκλεοτιδίων και με κατεύθυνση 5'→3'. Ακολουθεί η **επιμήκυνση** του νεοσυντιθέμενου RNA (elongation). Καθοριστικό ρόλο για την μετάβαση από την έναρξη στο στάδιο επιμήκυνσης παίζει το καρβοξυτελικό μοτίβο (CTD) της RNA πολυμεράσης II που αποτελεί και την μεγαλύτερη από τις δώδεκα υπομονάδες της (Dahmus, 1996). Η περιοχή CTD λειτουργεί ως "σκαλωσιά" για πολλούς ειδικούς παράγοντες. Στο σύμπλοκο έναρξης, η περιοχή CTD της πολυμεράσης II είναι υπο-φωσφορυλιωμένη (Pol IIA) ενώ η ακόλουθη φωσφορυλίωση της περιοχής CTD μετατρέπει την πολυμεράση II στην μορφή Pol IIO με αποτέλεσμα την ικανότητα επιμήκυνσης του πρόδρομου mRNA (Akhtar et al., 1996).

Στον **τερματισμό** της μεταγραφής ενέχεται η αλληλουχία λήξης (terminator), μια μη σαφώς καθορισμένη περιοχή DNA. Η αλληλεπίδραση της περιοχής CTD της πολυμεράσης με παράγοντες της πολυαδενυλίωσης (Bentley, 1999) σε συνδιασμό με την αλληλουχία λήξης οδηγούν στον τερματισμό της μεταγραφής, όπου το σύμπλοκο της Pol IIO απελευθερώνει την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα RNA και αποφωσφορυλιώνεται σε Pol IIA. Αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα στάδια της μεταγραφής συνδέονται με τις διεργασίες ωρίμανσης μέσω των trans-πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν σε αυτές. Παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι η λήξη της μεταγραφής είναι σε άμεση σύζευξη με την ωρίμανση του 3' άκρου του mRNA (Rosonina et al., 2006).

### **A.1.2. Μετα-μεταγραφικός έλεγχος-ωρίμανση του pre-RNA**

Παράλληλα με την μεταγραφή, ξεκινά η διεργασία του μετα-μεταγραφικού ελέγχου δηλαδή της ωρίμανσης των νεοσυντιθέμενων μορίων mRNA (RNA processing). Καθ' όλη τη διάρκεια σύνθεσης και παραμονής του στον πυρήνα, το pre-mRNA υπόκειται σε μια σειρά τροποποιήσεων και πολύπλοκων επεξεργασιών και συνδέεται με έναν μεγάλο αριθμό πυρηνικών πρωτεϊνών σχηματίζοντας τα ετερογενή πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (hnRNP). Στις διεργασίες ωρίμανσης του pre-mRNA σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως τα μικρά πυρηνικά RNAs συνδεδεμένα με πρωτεΐνες (snRNPs), με κύριο ρόλο το μάτισμα πρόδρομων RNA μεταγράφων.

Τα σημαντικότερα στάδια ωρίμανσης των πυρηνικών pre-mRNA είναι η κάλυψη του 5' άκρου (capping), το ιδιότυπο μάτισμα (splicing) και ο σχηματισμός του 3' άκρου.

#### **A.1.2.1. Κάλυψη (capping)**

Με την έναρξη της μεταγραφής τα νεοσυντιθέμενα μόρια pre-mRNA μήκους 20-30 νουκλεοτιδίων υφίστανται την κάλυψη του 5' άκρου τους (Salditt-Georgieff et al., 1980; Rasmussen & Lis, 1993). Σε αυτό το πρώτο στάδιο ωρίμανσης του pre-mRNA, πραγματοποιείται η σύνδεση της πρώτης βάσης του μεταγράφου με μια ανεστραμμένη 7-μεθυλο-γουανοσίνη με την διαμεσολάβηση μιας 5'-5' τριφωσφορικής γέφυρας. Ο σπάνιος αυτός 5'-5' φωσφοτριεστερικός δεσμός καταλύεται από το ένζυμο τριφωσφατάση-γουανιλύλο-τρανσφεράση ενώ η μεθυλίωση στη θέση 7 της γουανοσίνης καταλύεται από μια μεθυλοτρανσφεράση. Έτσι, δημιουργείται το χαρακτηριστικό κάλυμμα 7-μονομεθυλογουανοσίνη [  $m^7G(5')ppp(5')N$  ή αλλιώς  $m^7G$  cap]. Η δράση των ενζύμων κάλυψης πραγματοποιείται μέσω πρόσδεσής τους στη φωσφορυλιωμένη περιοχή CTD της πολυμεράσης II (Mc Cracken et al., 1997b). Όπως προ-αναφέρθηκε, η περιοχή CTD της πολυμεράσης II είναι υποφωσφορυλιωμένη κατά την έναρξη της μεταγραφής και φωσφορυλιώνεται όταν το μετάγραφο έχει μήκος >25 βάσεων. Τα ένζυμα της κάλυψης προσδένονται μόνο στη φωσφορυλιωμένη CTD και εν συνεχεία καθοδηγούνται στο 5' άκρο των νεοσυντιθέμενων pre-mRNA.



Μετά την αντίδραση κάλυψης, απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση της δομής κάλυψης αποτελεί η σύνδεση σε αυτήν του πυρηνικού πρωτεϊνικού συμπλόκου CBC (cap-binding protein complex) που αποτελούν οι δύο πρωτεΐνες CBP80 και CBP20 (Izaurralde et al., 1994; Izaurralde et al., 1995; Lewis et al., 1996). Η δομή του καλύμματος CBC έχει πολλαπλούς ρόλους στην πορεία του mRNA από τον πυρήνα έως το κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα, συμμετέχει στο μάτισμα, στην πολυαδενυλίωση και στην μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα όπου και αποτελεί βασικό στοιχείο για την σύνδεση του mRNA στα ριβοσώματα κατά την μετάφραση (Rhoads 1985). Επιπλέον, συμμετέχει στην πυρηνική και κυτταροπλασματική σταθερότητα του mRNA (Furuichi et al., 1977) καθώς επίσης και στην έναρξη αποικοδόμησης ορισμένων mRNA

#### **A.1.2.2 Μάτισμα (splicing)**

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η μεγάλη πλειοψηφία των μεταγράφων της RNA πολυμεράσης II διακόπτεται από παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες ή εσώνια (introns) οι οποίες απομακρύνονται από το pre-mRNA με την διαδικασία του ματίσματος (splicing). Το μάτισμα του pre-mRNA αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια ωρίμανσης των αρχικών μεταγράφων και κατά συνέπεια του μετα-μεταγραφικού ελέγχου. Περιλαμβάνει μια σειρά ενδονουκλεολυτικών δομών (cleavages) και επανασυνδέσεων (ligations) που χρησιμεύουν στην αποκοπή/απομάκρυνση των εσωνίων και επανένωση των εξωνίων (exons), που αποτελούν τις κωδικεύουσες αλληλουχίες, για την παραγωγή του ώριμου mRNA. Η παρουσία των εσωνίων στα πρόδρομα mRNAs προσφέρει την δυνατότητα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω του ματίσματος και του εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) κατά το οποίο από ένα και μόνο pre-mRNA μπορούν να παραχθούν διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το πρωτεϊνικό ρεπερτόριο ενός δεδομένου γονιδίου.

#### **A.1.2.3 Εσώνια πυρηνικών pre-mRNA**

Ο αριθμός των εσωνίων σε ένα pre-mRNA, στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως και περισσότερα από 50. Τα εξώνια

αποτελούν μικρά τμήματα RNA με μέγεθος μεταξύ 10-400 νουκλεοτιδίων (μέσος όρος 150 νουκλεοτίδια) ενώ, αντίθετα, τα εσώνια είναι σε γενικές γραμμές πολύ μεγαλύτερα με μέσο όρο 3.500 νουκλεοτίδια και σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να φτάσουν το μέγεθος των 200.000 νουκλεοτιδίων. Οι αλληλουχίες-cis στοιχεία που είναι σημαντικές για την απομάκρυνση των εσωνίων περιορίζονται στα όρια μεταξύ εξωνίων/εσωνίων (Stephens & Schneider 1992).

Η αντίδραση του ματίσματος περιλαμβάνει δύο διαδοχικά στάδια trans-εστεροποίησης με το ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή θηλιάς. Τα στάδια αυτά προϋποθέτουν την παρουσία και συμμετοχή cis-στοιχείων στο pre-mRNA καθώς και τον σχηματισμό ενός ενεργού ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου με συντελεστή καθίζησης 50-60S, που ονομάζεται σωμάτιο ματίσματος ή ματισματόσωμα (spliceosome) και αποτελεί τον τόπο των χημικών αντιδράσεων για την απομάκρυνση των εσωνίων. Το ματισματόσωμα περιλαμβάνει, εκτός του pre-mRNA και πλήθος trans-παραγόντων (όπως τα σύμπλοκα snRNP και άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ματίσματος) που συγκροτούνται πάνω στο pre-mRNA με ακριβή και δυναμικό τρόπο.

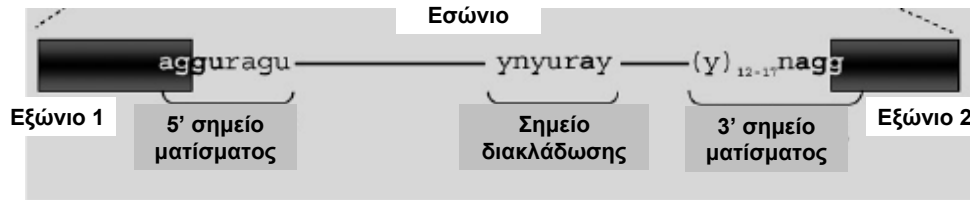
#### A.1.2.4 Cis-στοιχεία των pre-mRNA

Η εξειδίκευση της αντίδρασης ματίσματος καθορίζεται από συγκεκριμένα στοιχεία της πρωτοταγούς δομής του RNA (cis-στοιχεία) τα οποία βρίσκονται στα όρια εσωνίου/εξωνίου όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 1. Αποτελούνται από:

α) Το 5' σημείο τομής (5'splice site) το οποίο στα ανώτερα ευκαρυωτικά χαρακτηρίζεται από την χαλαρή συναινετική αλληλουχία AG | GURAGU [το σημείο τομής σημειώνεται ως κάθετη γραμμή ενώ υπογραμμίζεται το αυστηρά συντηρημένο ζεύγος νουκλεοτιδίων GU (R=πουρίνη, Y=πυριμιδίνη, N=οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο)].

β) Το 3' σημείο τομής (3'splice site) χαρακτηρίζεται στα ανώτερα ευκαρυωτικά από την παρουσία της συναινετικής αλληλουχίας YAG | G, με συντηρημένο το ζεύγος AG, και του οποίου προηγείται μια σειρά από πυριμιδίνες (πολυπυριμιδινική περιοχή, polypyrimidine tract).

γ) Το σημείο διακλάδωσης (branch site), το οποίο βρίσκεται συνήθως 18 με 40 νουκλεοτίδια ανοδικά του 3' σημείου τομής, αποτελείται από την συναινετική αλληλουχία YNYURAY (Το A αντιπροσωπεύει το νουκλεοτίδιο Αδενοσίνη, σημείο όπου σχηματίζεται η θηλιά).



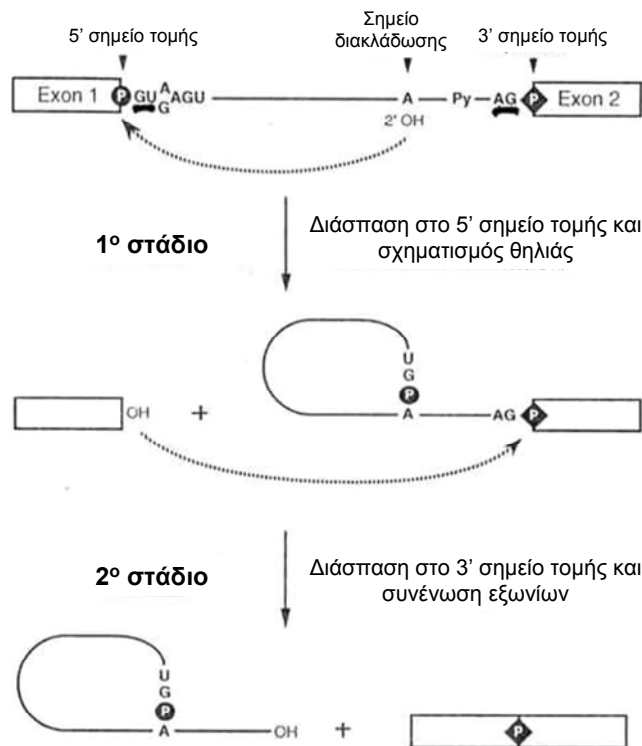
**Εικόνα 1.** Συντηρημένες cis-αλληλουχίες που καθορίζουν την αντίδραση ματίσματος. Οι αλληλουχίες εσώνιων προβάλλονται με μαύρο, ενώ των εξώνιων με άσπρο. 5' και 3' σημεία ματίσματος, σημείο διακλάδωσης (προσαρμοσμένη από Blaustein, et. al., 2007)

Σημαντικό ρόλο για την αναγνώριση των σημείων τομής από τον μηχανισμό ματίσματος έχουν ορισμένες αλληλουχίες του μετάγραφου οι οποίες περιλαμβάνουν τους ενισχυτές ματίσματος εξώνιων ή εσώνιων (exonic or intronic splicing enhancers: ESEs or ISEs) καθώς και τους καταστολείς ματίσματος εξώνιων ή εσώνιων (exonic or intronic silencers: ESSs or ISSs). Βασικός ρόλος αυτών των αλληλουχιών είναι να προάγουν ή να παρεμποδίζουν την αναγνώριση των εξώνιων από το ματισματόσωμα (Matlin et al., 2005). Αυτά τα cis-στοιχεία είναι μικρές αλληλουχίες (~10 νουκλεοτίδια) ευρέως καταναμημένες πάνω στο μεταγραφόμενο γονιδίωμα, οι οποίες απαντούν ως μεμονωμένες δομές ή σχηματίζουν συμπλέγματα (clusters). Οι ενισχυτές και οι καταστολείς λειτουργούν με την βοήθεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών, κατά κύριο λόγο τις πρωτεΐνες SR και τις hnRNPs, οι οποίες προσδέονται ειδικά πάνω σε αυτές τις αλληλουχίες και λειτουργούν ανταγωνιστικά (Dreyfuss et al., 1993; Graveley 2000; Manley & Tacke, 1996). Ωστόσο, ορισμένοι καταστολείς επιδρούν σχηματίζοντας μια συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή στο pre-mRNA η οποία παρεμποδίζει την αναγνώριση ενός γειτονικού ενισχυτή ματίσματος (splicing enhancer) από πρωτεΐνες SR (Buratti & Baralle 2004).

#### A.1.2.5 Μηχανισμός του ματίσματος των pre-mRNA

Η αποκοπή των εσώνιων πραγματοποιείται σε δύο διακριτά και διαδοχικά στάδια (Padgett et al., 1984). Το μάτισμα αρχίζει με μία πυρηνόφιλη προσβολή από το 2'

υδροξύλιο της αδενοσίνης του σημείου διακλάδωσης, στον 3'-5'-φωσφοδιεστερικό δεσμό του 5' σημείου τομής. Αφού γίνει η διάσπαση, η γουανοσίνη στο 5' άκρο του εσώνιου συνδέεται ομοιοπολικά με την αδενοσίνη στο σημείο διακλάδωσης, μέσω ενός 2'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμού. Τα ενδιάμεσα προϊόντα που σχηματίζονται στο σημείο αυτό είναι το 5' εξώνιο και το τμήμα του pre-mRNA που αντιστοιχεί στο 3' εξώνιο-εσώνιο σε διαμόρφωση θηλιάς. Στο δεύτερο στάδιο, το 3' υδροξύλιο του 5' εξωνίου προσβάλλει το φωσφοδιεστερικό δεσμό του 3' σημείου τομής, με αποτέλεσμα την απόσπαση του εσώνιου με τη μορφή θηλιάς και την ακόλουθη συνένωση των δύο εξωνίων (εικόνα 2) (Kramer, 1995).

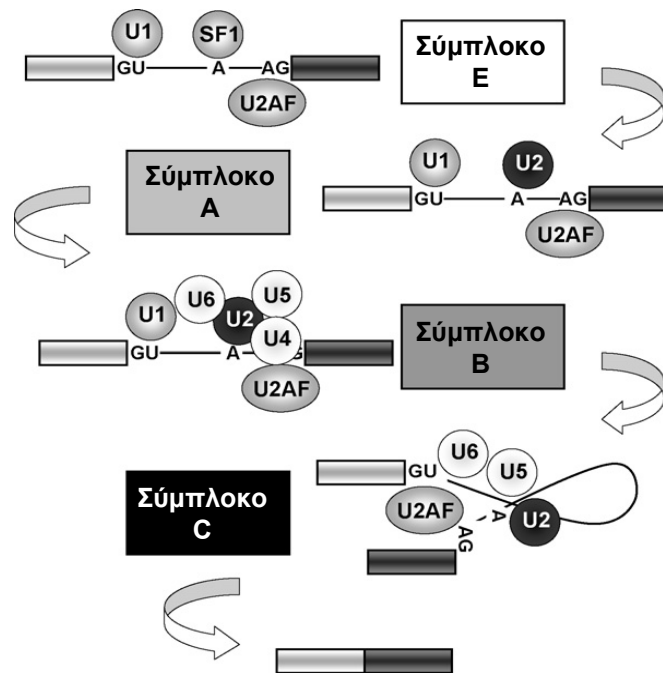


**Εικόνα 2.** Τα καταλυτικά στάδια του ματίσματος των πυρινηκών pre-mRNA. Τα εξώνια παρουσιάζονται ως κουτιά και τα εσώνια ως γραμμές. Τα διακεκομμένα βέλη αναπαριστούν την πυρηνόφιλη προσβολή των ομάδων υδροξυλίου στα σημεία τομής. (προσαρμοσμένη από Kramer, 1995)

### A.1.2.6 Στάδια συγκρότησης του ματισματοσώματος (spliceosome)

Η αντίδραση ματίσματος ξεκινά όταν οι ειδικές αλληλουχίες των σημείων ματίσματος που βρίσκονται στα όρια εσωνίων-εξωνίων αναγνωρίζονται από τη “μηχανή” ματίσματος, το ματισματοσώμα (spliceosome) συντελώντας στην αποκοπή των εσωνίων. Θεωρείται το πιο σύνθετο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο αφού συγκροτείται από περίπου 300 πρωτεϊνικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων που ανήκουν στα μικρά πυρηνικά U-snRNPs που είναι και τα βασικά συστατικά του ματισματοσώματος (Nilsen, 2003). Συγκεκριμένα, οι κύριες υπομονάδες του ματισματοσώματος είναι τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-RNA των U1, U2, U4, U5 και U6 snRNPs τα οποία μέσω αλληλεπιδράσεων με το pre-mRNA συντελούν στην αναγνώριση και στην αποκοπή του εσωνίου. Σημαντικό ρόλο στην συγκρότηση και λειτουργία του ματισματοσώματος παίζουν και οι άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες ματίσματος, σε συνδιασμό με πρωτεΐνες hnRNP προσδίδοντας εξαιρετική πολυπλοκότητα στη δομή του συμπλόκου ματίσματος (Chen, et. al., 2007).

Το ματισματοσώμα ενεργεί στην πλειοψηφία των εσωνίων (μεταγράφων της πολυμεράσης II) και αναγνωρίζει ένα 5' σημείο τομής που αρχίζει με ένα GU δινουκλεοτίδιο και ένα 3' σημείο τομής που τελειώνει με ένα AG δινουκλεοτίδιο (κανόνας GU-AG). Η διεργασία του ματίσματος απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας με την μορφή ATP και την σταδιακή συγκρότηση του ματισματοσώματος, εικόνα 3. Το αρχικό στάδιο (σύμπλοκο E), απουσία ATP, περιλαμβάνει την αναγνώριση του 5' σημείου τομής από το U1 snRNP, του σημείου διακλάδωσης από τον παράγοντα ματίσματος SF1 και την αναγνώριση του 3' σημείου τομής από τον παράγοντα U2AF (U2snRNP auxiliary factor). Με την μετέπειτα παρουσία ATP, ακολουθεί η συγκρότηση του συμπλόκου A με την πρόσδεση και του U2snRNP στο τμήμα μεταξύ του σημείου διακλάδωσης και της πολυπυριμιδικής περιοχής στο 3' άκρο των εσωνίων, μέσω του παράγοντα U2AF στο σημείο διακλάδωσης (Zamore & Green 1989, Zamore et al., 1992). Στη συνέχεια συγκροτείται το σύμπλοκο B μέσω της συμμετοχής του τριμερούς συμπλόκου U4/U6 και U5 snRNPs. Ακολουθεί εκτενής αναδιάταξη του συμπλόκου που οδηγεί στη δημιουργία του ενεργού ματισματοσώματος ή σύμπλοκο C το οποίο και καταλύει το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ματίσματος (Black 2003; Sharp 1994). Με περαιτέρω αναδιάταξη του συμπλόκου C γίνεται η αποκοπή και συνένωση των εσωνίων.



**Εικόνα 3.** Στάδια συγκρότησης ματισματοσώματος. Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων E, A, B και C που συγκροτούν το ματισματοσώμα. (προσαρμοσμένη από Blaustein, et. al., 2007)

#### A.1.2.7 Συμμετοχή άλλων trans-στοιχείων στο μάτισμα

Εκτός από τα σύμπλοκα των UsnRNPs, σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του ιδιότυπου ματίσματος παίζουν πρωτεϊνικοί παράγοντες ματίσματος όπως οι πρωτεΐνες SR, που αποτελούν μια οικογένεια περίπου 20 εξελικτικά διατηρημένων φωσφοπρωτεϊνών (Graveley, 2000; Manley & Tacke, 1996). Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν ένα ή δύο μοτίβα για πρόσδεση RNA στο αμινοτελικό άκρο (RRMs) που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με το pre-mRNA, και μια περιοχή διαφορετικού μήκους στο καρβοξυτελικό άκρο πλούσια σε επαναλαμβανόμενα διπεπίδια αργινίνης-σερίνης (μοτίβο RS) στην οποία περιοχή οφείλεται και το όνομα της οικογένειας. Η περιοχή RS εμπλέκεται επίσης σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες (protein-protein interactions) που αποτελούν παράγοντες ματίσματος και περιέχουν μοτίβα RS (Kohtz et al., 1994; Wu & Maniatis 1993). Μέλη της οικογένειας των SR έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί από κύτταρα θηλαστικών. Κατά κύριο λόγο, η πρωτεΐνη ASF/SF2 (Alternative Splicing factor/Splicing factor 2) ταυτοποιήθηκε ως σημαντικός παράγοντας βασικού αλλά και εναλλακτικού ματίσματος για επιλογή 5' σημείων τομής στο pre-mRNA (Krainer et al., 1990; Ge & Manley 1990).

Για την αναγνώριση του 3' σημείου τομής, σημαντικό ρόλο παίζει η πολυπυριμιδική περιοχή η οποία αναγνωρίζεται από trans παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης στην περιοχή αυτή του pre-mRNA κατά την διάρκεια του ματίσματος (polypyrimidine-tract binding proteins). Η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη αυτής της κατηγορίας είναι ο παράγοντας U2AF (U2snRNP auxiliary factor), απαραίτητος για την πρόσδεση του U2snRNP στο pre-mRNA κατά το μάτισμα, όπως προ-αναφέρθηκε (A.1.2.3.6). Η πρωτεΐνη PTB (Polypyrimidine tract binding protein), η οποία ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη hnRNPI με μοριακό βάρος ~62 kDa, είναι μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη στην επιλογή εναλλακτικού σημείου ματίσματος (Lin & Patton, 1995). Επιπλέον, η πρωτεΐνη PSF (PTB-associated splicing factor) ταυτοποιήθηκε ως παράγοντας ματίσματος που συμμετέχει στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (Gozani et al., 1994).

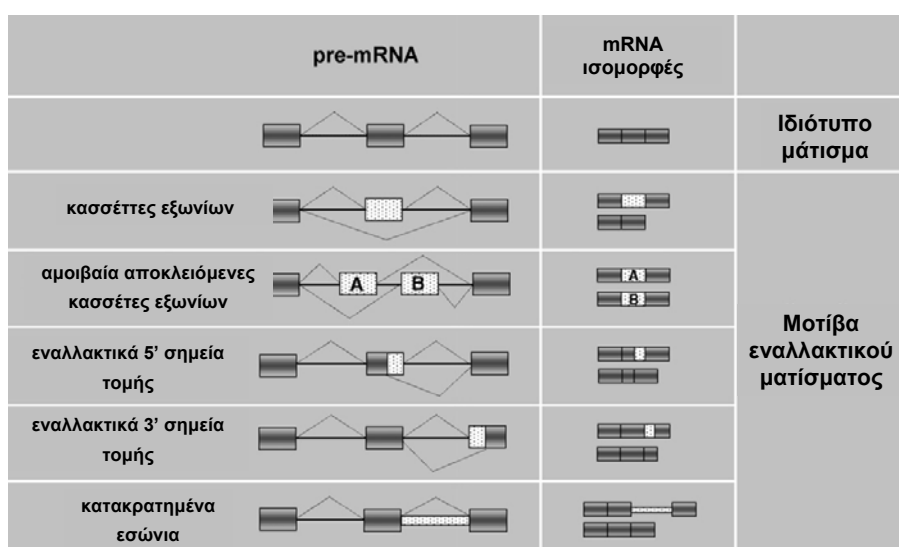
Σε συγκεκριμένα στάδια της αντίδρασης ματίσματος, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών hnRNP που συνδέονται με το pre-mRNA (ή hnRNA) από τα πρώτα κιόλας στάδια σύνθεσής του. Η οικογένεια αποτελείται πάνω από 20 μέλη, με μοριακά βάρη μεταξύ 34 και 120 kDa. Κύριο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών hnRNP είναι η ικανότητα να προσδένουν RNA (pre-mRNA/mRNA) (μέσω ειδικών μοτίβων που περιέχουν στην δομή τους) συμμετέχοντας έτσι σε πολλές κυτταρικές διεργασίες βιογένεσης του mRNA.

#### **A.1.2.8 Εναλλακτικό μάτισμα (Alternative splicing)**

Τουλάχιστον το 74% των ανθρώπινων γονιδίων υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. (Johnson et al., 2003). Μέσω αυτής της διαδικασίας επιλέγονται εναλλακτικά 5' και 3' σημεία τομής με αποτέλεσμα, από ένα μόριο πρόδρομου mRNA να μπορούν να προκύψουν πολλαπλά μόρια ώριμων mRNA μορίων, επιτυγχάνοντας έτσι την δημιουργία διαφορετικών πρωτεϊνικών ισομορφών (Hodges & Bernstein, 1994). Η επιλογή του σημείου τομής επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα (ισχύ) αναγνώρισης του σημείου τομής από πρωτεϊνικούς παράγοντες (όπως για παράδειγμα τις πρωτεΐνες SR και hnRNPs), το μέγεθος των εξωνίων και την δευτεροταγή δομή του pre-RNA. Επιπρόσθετα, τα cis-στοιχεία του pre-mRNA, γνωστά και ως ενισχυτές ή καταστολείς (enhancers, silencers), που βρίσκονται στα εξώνια και στα εσώνια (παράγραφος 1.2.3.4) μπορούν να διαμορφώσουν την χρήση και νέων 5' και 3'

σημείων τομής (cryptic sites) ιδιαίτερα όταν η αλληλουχία του σημείου τομής ή/και το μέγεθος του εξωνίου δεν είναι ιδανικά. Οι πιο γνωστές περιπτώσεις εναλλακτικού ματίσματος που έχουν περιγραφεί φαίνεται να είναι άκρως συνδιαστικές με την συμμετοχή πολλαπλών (θετικών και αρνητικών) trans-παραγόντων και cis-στοιχείων επηρεάζοντας την τελική αναλογία κάθε mRNA ισομορφής. Μεταξύ των trans-παραγόντων σημαντική θέση έχουν πρωτεΐνες hnRNP οι οποίες προσδένουν σε cis-στοιχεία εσώνιων αλλά και εξωνίων. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη hnRNPA1 η οποία λειτουργεί ανταγωνιστικά με τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2, με τρόπο εξαρτώμενο από την συγκέντρωσή τους στον πυρήνα (Mayeda & Krainer, 1992). Σε περιπτώσεις εναλλακτικού ματίσματος του 5' σημείου τομής, αυξημένες συγκεντρώσεις του παράγοντα ASF/SF2 έχουν ως αποτέλεσμα την επιλογή γειτονικών (proximal) 5' σημείων ενώ αντιθέτως, τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης hnRNPA1 προωθούν την επιλογή απομακρυσμένων (distal) 5' σημείων (Caceres et al., 1994).

Με βάση πειραματικά δεδομένα, το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να ομαδοποιηθεί σε 5 διαφορετικά μοτίβα ματίσματος τα οποία περιλαμβάνουν: τις κασσέτες εξωνίων, τις αμοιβαία αποκλειόμενες κασσέτες εξωνίων, τα εναλλακτικά 5' σημεία τομής, τα εναλλακτικά 3' σημεία τομής και τα κατακρατημένα εσώνια, όπως αναπαράγονται στο σχήμα της εικόνας 4



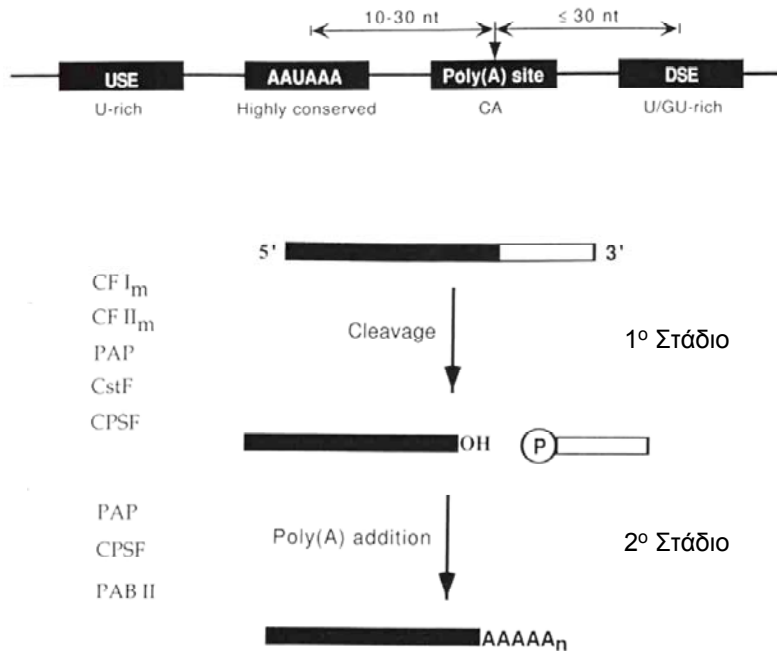
**Εικόνα 4.** Διαφορετικά μοτίβα εναλλακτικού ματίσματος. Τα εξώνια εμφανίζονται ως ορθογώνια πλαίσια και τα εσώνια ως μαύρες γραμμές. Οι αχνές γραμμές αντιπροσωπεύουν διαφορετικές δυνατότητες σύνδεσης σημείων ματίσματος. Οι περιοχές εναλλακτικού ματίσματος απεικονίζονται με άσπρο πλαίσιο. (προσαρμοσμένη από Blaustein, et. al., 2007)



### A.1.2.9 Πολυαδενυλίωση ( Ωρίμανση του 3' άκρου)

Όλα τα ευκαρυωτικά mRNAs, με εξαίρεση τα mRNAs των ιστονών, υπόκεινται σε ωρίμανση του 3' άκρου όπου προστίθενται μια σειρά μορίων αδενοσίνης [ουρά πολύ(A)] περίπου 200 νουκλεοτιδίων. Όπως και στην περίπτωση του ματίσματος, η πολυαδενυλίωση πραγματοποιείται σε δύο συζευγμένα και διαδοχικά στάδια όπου το πρόδρομο μετάγραφο αρχικά χάνει ένα τμήμα με ενδονουκλεολυτική τομή (cleavage), το οποίο βρίσκεται μεταξύ της αυστηρά συνεναιτικής αλληλουχίας AAUAAA, ανοδικά, και μιας αλληλουχίας πλούσια σε U/GU, καθοδικά του σημείου τομής. Ακολούθως, στο δεύτερο στάδιο το ένζυμο πολύ(A) πολυμεράση [poly(A) polymerase, PAP] καταλύει την προσθήκη της πολύ(A) ουράς στο σημείο της πολυαδενυλίωσης (Minvielle-Sebastia & Keller, 1999). Ο ακριβής προσδιορισμός του σημείου τομής καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ του σινιάλου της πολυαδενυλίωσης AAUAAA και του καθοδικού σημείου (U/GU), εικόνα 5.

Εκτός από τα παραπάνω cis-στοιχεία του pre-mRNA, καθοριστικό ρόλο στη διεργασία της πολυαδενυλίωσης έχουν και πολλοί trans-παράγοντες. Ένα από τα απαραίτητα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν σε αυτή την διεργασία είναι ο παράγοντας τομής και πολυαδενυλίωσης CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor). Αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερες πρωτεϊνικές υπομονάδες με τις οποίες προσδένεται στο σινιάλο AAUAAA και από τις οποίες τα πολυπεπτίδια CPSF-160 και CPSF-30 φαίνεται να είναι οι υπομονάδες-κλειδιά για την πρόσδεση στο RNA (Ryan et al., 2004). Ο παράγοντας CPSF συνεργιστικά με την πυρηνική πρωτεΐνη PABPN1 [nuclear poly(A) binding protein] με ικανότητα πρόσδεσης στην ουρά πολύ(A), διεγείρουν την δραστηριότητα της πολύ(A) πολυμεράσης, η οποία ουσιαστικά είναι αδρανής από μόνη της (Bienroth et al., 1991). Ένας άλλος παράγοντας σημαντικός για την τομή αλλά όχι για το ακόλουθο στάδιο της πολυαδενυλίωσης είναι η πρωτεΐνη CstF ή παράγοντας τομής (Cleavage stimulation Factor), εικόνα 5. Αποτελείται από τρεις υπομονάδες και προσδένεται στην πλούσια σε GU περιοχή στο 3' άκρο, σταθεροποιώντας την πρόσδεση του παράγοντα CPSF στην αλληλουχία AAUAAA (Colgan & Manley, 1997).



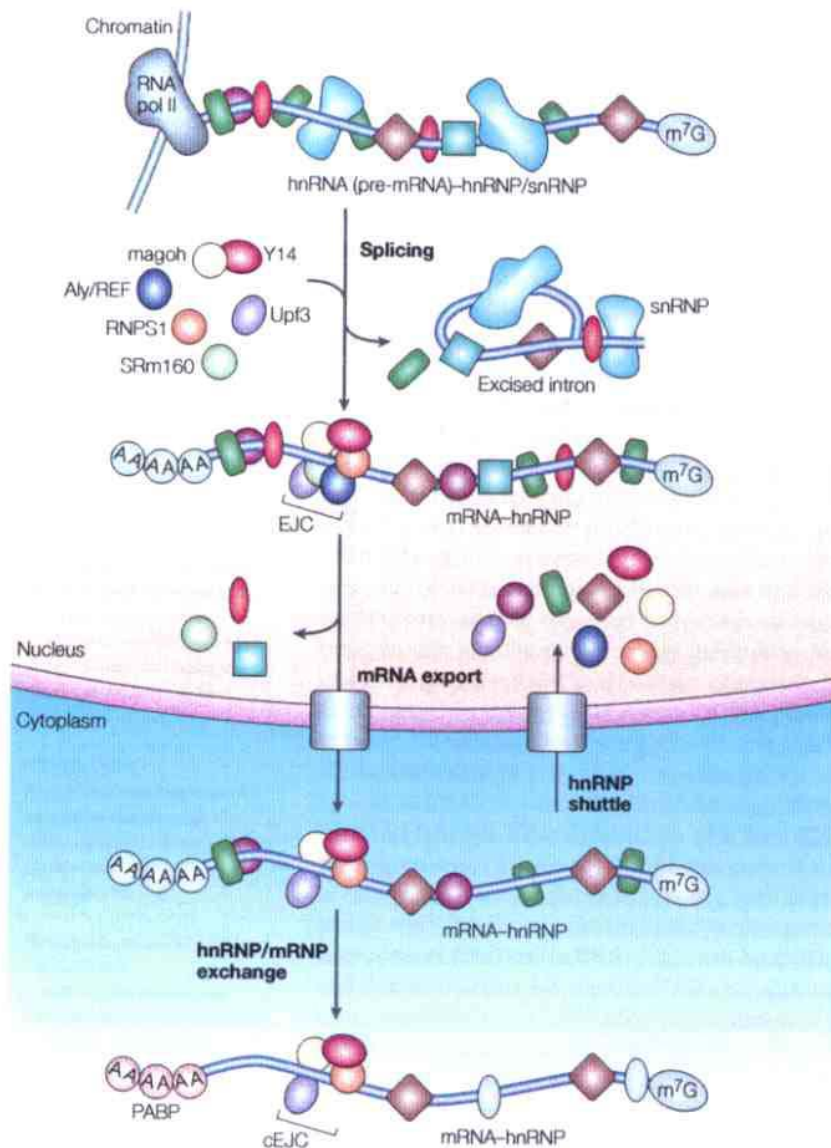
**Εικόνα 5.** Cis και trans-στοιχεία απαραίτητα για την διεργασία της πολυαδενυλίωσης

Η πολυαδενυλίωση έχει ισχυρή επίδραση στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Συμμετέχει σε πολλά στάδια του μεταβολισμού του mRNA όπως στην μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στην αποτελεσματικότητα της μετάφρασης που εξαρτάται από το μήκος της πολύ(A) ουράς και στην σταθερότητα του mRNA. Σημαντικό ρόλο έχει και η ικανότητα εναλλακτικής ωρίμανσης του 3' άκρου, εφόσον αρκετά pre-mRNAs περιέχουν πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης (Lewis et al., 1995; Wickens et al., 1997). Επιπρόσθετα σημειώνεται εδώ η σύζευξη της διεργασίας πολυαδενυλίωσης με την μεταγραφή, καθώς η ουρά πολύ(A) παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έναρξης αλλά και του τερματισμού της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II (Birse et al., 1998), όπως επίσης και η σύζευξη με την αντίδραση ματίσματος των εσωνίων που βρίσκονται στο 3' άκρο των pre-mRNA (Gunderson et al., 1997).

### A.1.3 Μεταφορά mRNA στο κυτταρόπλασμα

Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν έχουν ολοκληρωθεί οι διεργασίες ωρίμανσης του pre-mRNA, το ώριμο πλέον mRNA σε μορφή συμπλόκου mRNP εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ικανό για μετάφραση. Η μεταφορά του mRNA στο

κυτταρόπλασμα αποτελεί μια διαδικασία που προϋποθέτει τον σχηματισμό στον πυρήνα του συμπλόκου mRNP-μεταφορέα, την ακόλουθη μετακίνηση του συμπλόκου δια μέσου των πυρηνικών πόρων (NPC: Nuclear Pore Complex) και τέλος την απελευθέρωση του mRNP στο κυτταρόπλασμα με παράλληλη ανακύκλωση του πρωτεϊνικού μορίου-μεταφορέα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ένα στάδιο ελέγχου για να εξασφαλιστεί η εξαγωγή μόνο των μορίων mRNA που έχουν περάσει επιτυχώς από όλα τα στάδια πυρηνικής διεργασίας πριν την μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα (Sommer & Nehrass, 2005). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει έναν δυναμικό μηχανισμό επαναδιάταξης του πυρηνικού συμπλόκου mRNP με την απομάκρυνση αλλά και την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης σε RNA (RBPs). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός ενός νέου πρωτεϊνικού συμπλόκου στο mRNA περίπου 20 με 24 νουκλεοτίδια ανοδικά του σημείου ένωσης των εξωνίων, το σύμπλοκο EJC (exon junction complex). Αποτελείται από έξι κεντρικές πρωτεΐνες, καθώς και κάποιες περιφερειακές οι οποίες συνδέονται στο σύμπλοκο μόνο παροδικά. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες κεντρικές πρωτεΐνες του συμπλόκου EJC είναι το ετεροδιμερές Y14:Magoh το οποίο μετά την συνένωση των εξωνίων παραμένει συνδεδεμένο στο mRNA μετά την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα. Επίσης σημειώνεται ότι ορισμένες πρωτεΐνες hnRNP παραμένουν σε διασύνδεση με mRNA μετά το μάτισμα και μαζί με τις πρωτεΐνες του EJC, συνοδεύουν το mRNA στο κυτταρόπλασμα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6 (Dreyfuss, et. al., 2002).



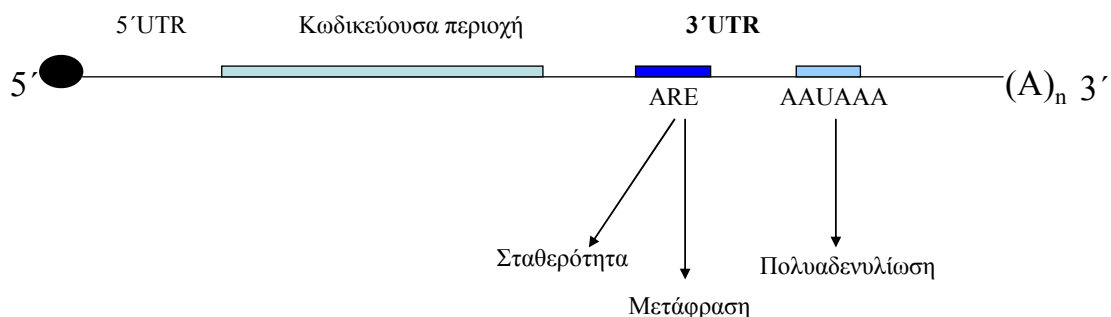
**Εικόνα 6.** Συμμετοχή πρωτεϊνών hnRNP και mRNP στα στάδια βιογένεσης του mRNA (Dreyfuss et.al., 2002)

Συνολικά, σημαντικό ρόλο για την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα παίζουν *cis*-αλληλουχίες του mRNA. Παραδείγματα αποτελούν η δομή του καλύμματος m<sup>7</sup>G στο 5' άκρο (Jarmolowski et al., 1994) καθώς και η ουρά πολυ(A) (Huang et al., 1996). Επιπρόσθετα, καθοριστικό ρόλο για την διευκόλυνση και την μεταφορά του mRNA με την μορφή συμπλόκων mRNP στο κυτταρόπλασμα παίζουν ορισμένες πρωτεΐνες RBP. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP οι περισσότερες από τις οποίες έχουν την ικανότητα να παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος ενώ άλλες παραμένουν αποκλειστικά στο πυρηνικό διαμέρισμα (όπως οι hnRNPC1/C2 και U) (Piñol-Roma

et al., 1992). Οι hnRNPs με ικανότητα παλινδρόμησης (π.χ. οι πρωτεΐνες hnRNP A/B) συνοδεύουν το mRNA κατά την μεταφορά του μέσα από τους πυρηνικούς πόρους στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι αποκλειστικά πυρηνικές hnRNP απομακρύνονται πριν ή και παράλληλα με την εξαγωγή του mRNA (Lee et al., 1996).

### A.1.3.1 Σταθεροποίηση/αποσταθεροποίηση του mRNA

Ο έλεγχος της σταθερότητας του mRNA είναι μια σημαντική κυτταροπλασματική διεργασία για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της οποίας μόρια mRNA σταθεροποιούνται ή αντίθετα αποδομούνται στο κυτταρόπλασμα καθορίζοντας έτσι σε ένα βαθμό τα επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Εκτός από την κωδικεύουσα περιοχή του mRNA (open reading frame), την δομή 5'-cap και την 3' πολύ(A) ουρά, η πλειοψηφία των mRNAs διαθέτει δύο καλά χαρακτηρισμένες αλληλουχίες RNA μεταβλητού μεγέθους που περιλαμβάνουν τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (5' and 3' UTRs), εικόνα 7. Στις περιοχές αυτές υπάρχουν ρυθμιστικά cis-στοιχεία τα οποία αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πολλών πρωτεϊνικών παραγόντων, επηρεάζοντας κυρίως την σταθερότητα/μεταφραση του mRNA. Τέτοια στοιχεία που καθορίζουν τον ρυθμό-ταχύτητα ανακύκλωσης του mRNA (mRNA turnover) είναι τα πλούσια σε αδερίνη-ουρακίλη (AU-rich elements, AREs), στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο (3' UTR) πολλών mRNAs με μικρή διάρκεια ζωής. Τα στοιχεία AREs έχουν μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλη ομάδα RNA-στοιχείων και απαντούν στο mRNA γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, μεταγραφικούς παράγοντες και ογκοπρωτεΐνες (Chen et al., 1995).



**Εικόνα 7:** Cis-στοιχεία του RNA με συμμετοχή στην σταθερότητα/μετάφραση και πολυαδενυλίωση του mRNA

Μεταξύ των trans-παραγόντων που προσδένουν σε στοιχεία ARE είναι και πρωτεΐνες hnRNPs. Πλέον γνωστό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη hnRNPD (ή AUF1) η οποία έχει βρεθεί να έχει μεγάλη συγγένεια για στοιχεία AREs, *in vitro* (DeMaria et al., 1997) και λειτουργεί ως παράγοντας σταθεροποίησης αλλά και αποσταθεροποίησης ανάλογα με το υπόστρωμα πρόσδεσης στο mRNA (DeMaria et al., 1996, Kiledjian et al., 1997). Εξίσου σημαντική συμμετοχή στο στάδιο αυτό της γονιδιακής ρύθμισης έχει και μια ομάδα πρωτεϊνών RBP, οι πρωτεΐνες Hu. Αυτές οι πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αντιγόνα-στόχοι στο παρανεοπλαστικό νευρολογικό σύνδρομο (Szabo et al., 1991) και λόγω ομολογίας τους με την ELAV πρωτεΐνη στη *Drosophila* αναφέρονται και ως οικογένεια πρωτεϊνών ELAV στα θηλαστικά. Τα μέλη αυτής της οικογένειας αποτελούνται από τις πρωτεΐνες HuB, HuC, HuD με ιστοειδική εμφάνιση σε κύτταρα του εγκεφάλου (neuron specific ELAV proteins) και την πρωτεΐνη HuR με έκφραση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Οι πρωτεΐνες HuR, C και D συμμετέχουν στην σταθεροποίηση μετάγραφων πλούσιων σε αδενίνη-ουρακίλη (AU), κυρίως στους νευρώνες (Keene, 1999) ενώ η πρωτεΐνη HuR έχει προσδιοριστεί ως σημαντικός παράγοντας σταθεροποίησης πολλών mRNA στόχων, *in vivo* (Fan & Steitz, 1998).

## **A.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΟ RNA (RBPs)**

Τα ευκαρυωτικά mRNAs διαθέτουν πληροφορίες που καθορίζουν την σωστή την επεξεργασία, την εξαγωγή τους από τον πυρήνα, την υποκυτταρική τους εντόπιση και τέλος την σταθερότητα και μετάφρασή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ *cis*-στοιχείων του mRNA και ειδικών trans-παραγόντων. Σημαντικό ρόλο για την εξασφάλιση της σωστής επεξεργασίας και της διακίνησης του mRNA παίζουν ειδικές πρωτεΐνες με ικανότητα να προσδένουν στο RNA (RBPs) σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNPs) που αποτελούν και την λειτουργική μορφή με την οποία τα μόρια pre-mRNA και mRNA υφίστανται στα κύτταρα. Μια κατηγορία πρωτεϊνών που συνοδεύουν το mRNA σε όλα τα στάδια του μεταβολισμού του είναι οι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs), οι οποίες προσδένουν μόρια pre-mRNA/mRNA σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNPs) και καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική τύχη τους. Οι πρωτεϊνικές δομές των συμπλόκων hnRNP συμμετέχουν

κατά κύριο λόγο στις πολύπλοκες διεργασίες ωρίμανσης του pre-mRNA στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Nagai, 1996; Cusack, 1999), ενώ σημαντικός είναι και ο ρόλος τους στις κυτταροπλασματικές διεργασίες του mRNA, λόγω της ιδιότητας των περισσότερων μελών να παλινδρομούν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992).

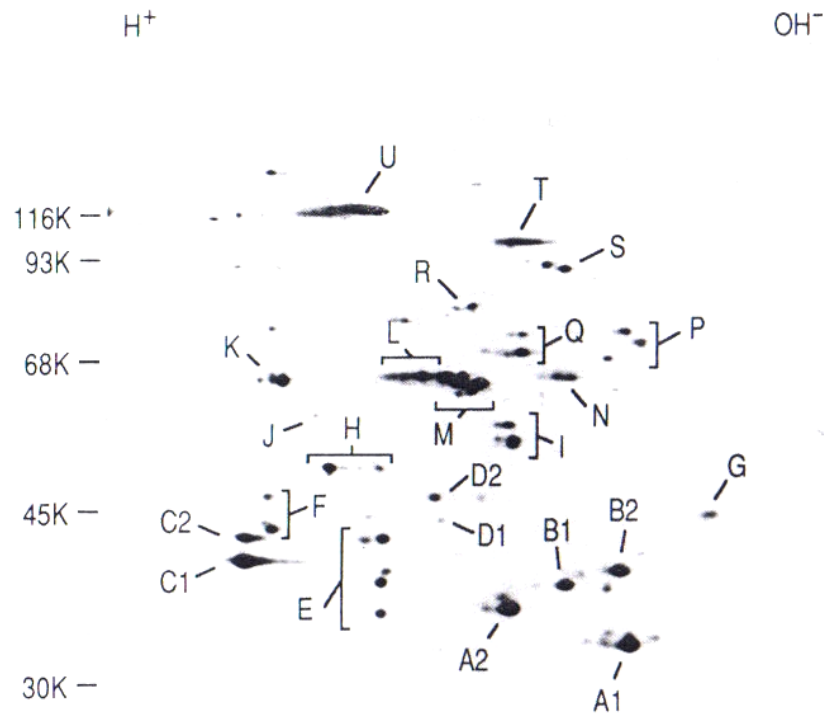
### **A.2.1 Πρωτεΐνες hnRNP**

Οι πρωτεΐνες hnRNP αποτελούν μια σημαντική οικογένεια πρωτεϊνών RBP που προσδέχουν hnRNA ή pre-mRNA και που δεν αποτελούν σταθερά συστατικά άλλων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, όπως των μικρών πυρηνικών RNPs (snRNPs) (Dreyfuss, et. al., 1988b). Τα πρόδρομα μόρια RNA καθ'όλη την διάρκεια της πυρηνικής τους διαδρομής συνδέονται με έναν καθορισμένο αριθμό πρωτεϊνών hnRNP σχηματίζοντας τα ετερογενή πυρηνικά σύμπλοκα RNP (hnRNP), τα οποία αποτελούν δυναμικές δομές κατά την διάρκεια των σταδίων ωρίμανσης. Αρχικά θεωρείτο ότι τα σύμπλοκα αυτά προστατεύουν το RNA από την δράση ριβονουκλεασών αλλά αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητα για την σωστή διεκπεραίωση όλων των μετα-μεταγραφικών διεργασιών (Dreyfuss, et. al., 1993). Εκτός από την συμμετοχή τους στις πυρηνικές διεργασίες ωρίμανσης του RNA και λόγω της ικανότητας παλινδρόμησης πολλών μελών της οικογένειας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, hnRNPs συνοδεύουν το mRNA στο κυτταρόπλασμα και ελέγχουν τις δραστηριότητές του που αφορούν κυρίως την σταθεροποίηση και την μετάφρασή του.

#### **A.2.1.1 Μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP**

Στα ανθρώπινα κύτταρα, η οικογένεια των πρωτεϊνών hnRNP αποτελείται από τουλάχιστον 20 κύρια μέλη, ορισμένα εκ των οποίων είναι τόσο άφθονα όσο και οι ιστόνες. Η απομόνωση συμπλόκων hnRNP από ανθρώπινα κύτταρα HeLa με την χρήση ειδικών αντισωμάτων κατά συγκεκριμένων πρωτεϊνών hnRNP, και η ηλεκτροφορητική ανάλυση, σε πηκτώματα δύο διαστάσεων, των πρωτεϊνικών συστατικών των συμπλόκων οδήγησε στην ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών hnRNP. Σε αντιστοιχία με τα μοριακά βάρη από 34 έως 120kDa, οι

πρωτεΐνες hnRNP αναφέρονται με τα γράμματα A έως U (PinoI-Roma, et. al., 1988), όπως παρουσιάζονται και στην εικόνα 8.



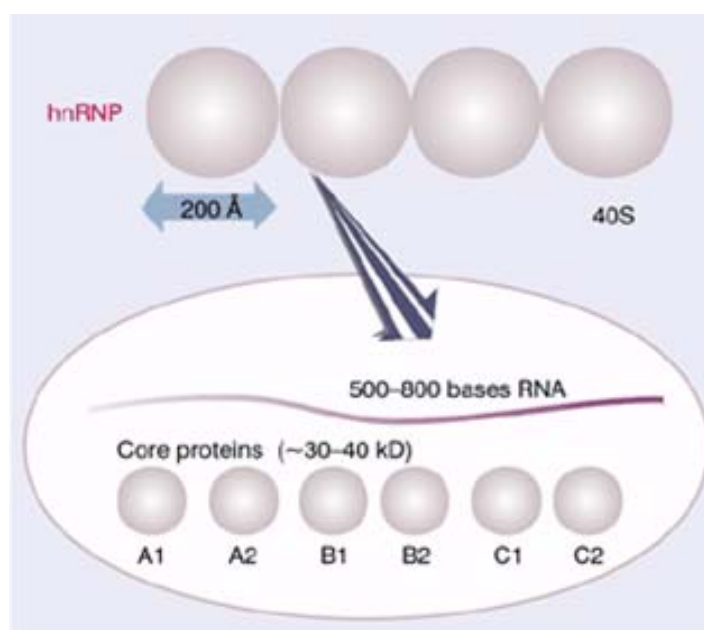
**Εικόνα 8.** Πρωτεϊνική σύσταση των συμπλόκων hnRNP, έπειτα από την απομόνωσή τους με το αντίσωμα 4F4, κατά των πρωτεϊνών hnRNP C1 και C2. Τα σύμπλοκα hnRNP απομονώθηκαν από ραδιοσημασμένα με  $^{35}\text{S}$ -μεθειονίνη κύτταρα HeLa. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE) και ανιχνεύτηκαν με σπινθηρογραφία. (Dreyfuss, et. al., 1993)

Οι πλέον άφθονες και καλά μελετημένες πρωτεΐνες hnRNP που βρίσκονται σε σταθερή διασύνδεση με hnRNA είναι οι τύπου A/B, με πλέον γνωστά μέλη την hnRNP A1 (πρότυπη hnRNP πρωτεΐνη), την A2 και την ισομορφή της B1, την A0 (Mayeda, et. al., 1994; Myer & Steitz, 1995) και το νέο μέλος A3 (Plomaritoglou, et. al., 2000). Οι πρωτεΐνες τύπου A/B είναι βασικές (pI 8,4-9.1) και μοιράζονται κοινά δομικά μοτίβα. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν δύο εν σειρά αμινοτελικά RRM (RNA recognition motif) μοτίβα για πρόσδεση στο RNA, καθώς και ένα βοηθητικό μοτίβο στο καρβοξυτελικό άκρο, πλούσιο σε γλυκίνη (glycine-rich auxiliary domain), το οποίο συμμετέχει κυρίως σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης αλλά και πρωτεΐνης-RNA (Akindahunsi, et. al., 2005). Είναι ανάμεσα στις μικρότερου



μοριακού βάρους (34-40 kDa) αλλά και πιο άφθονες hnRNP πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, οι hnRNPs A1 και A2 αποτελούν το 60% του συνόλου των hnRNP μορίων, αντιπροσωπεύοντας τις πιο άφθονες πυρηνικές πρωτεΐνες (Beyer, et. al., 1977) με την hnRNPA1 να εμφανίζεται σε  $7-10 \times 10^7$  αντίγραφα ανά κύτταρο τύπου HeLa (Kiledjian, et. al., 1994). Το μοτίβο RRM ή RBD θα περιγραφεί αναλυτικότερα στη συνέχεια (A.2.1.2).

Οι hnRNP τύπου A/B (A1, A2, B1, B2) και οι C (C1 και C2) είναι γνωστές και ως κεντρικές (core) πρωτεΐνες, οι οποίες, σε διασύνδεση με hnRNA και τις άλλες επιπρόσθετες hnRNP πρωτεΐνες κλασματώνονται από πυρηνικά εκχυλίσματα υπό την μορφή ενός ετερογενούς RNP πληθυσμού με συντελεστή καθίζησης 40-200S. Μετά από περιορισμένη δράση νουκλεασών, απομονώνεται ένας ομοιογενής πληθυσμός hnRNP συμπλόκων 40S, εμπλουτισμένος σε κεντρικές (core) πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται σε επαφή με προστατευμένα μόρια RNA 500 έως 800 νουκλεοτιδίων σε μήκος (εικόνα 9) (LeSturgeon, et. al., 1981, Lothstein, et. al., 1985).



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων hnRNP 40S με την συμμετοχή των “core” πρωτεϊνών hnRNP A/B και C1/C2 και τμήματος του pre- ή/και mRNA.

Η απομόνωση cDNA κλώνων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες A/B έδειξε την ύπαρξη πολλαπλών ισομορφών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Για παράδειγμα, τα cDNAs των A2 και B1 είναι ταυτόσημα με εξαίρεση τα επιπλέον 36 νουκλεοτίδια της B1, προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία προσθέτουν 12 αμινοξέα κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης B1. Επί του παρόντος, η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης hnRNP B2 δεν έχει επιτευχθεί αλλά πιθανόν να αποτελεί ισομορφή-προϊόν εναλλακτικού ματίσματος της A2 (Kamma, et. al., 1999). Η A1 είναι η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη hnRNP, γι' αυτό και θεωρείται ως πρότυπη πρωτεΐνη hnRNP. Η πρωτοταγής δομή της είναι εξαιρετικά συντηρημένη (100% ομολογία μεταξύ ανθρώπου και αρουραίου και 92% μεταξύ ανθρώπου και αμφιβίων, *Xenopus laevis*). Το ζεύγος πρωτεϊνών hnRNP C1/C2 είναι επίσης προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου pre-mRNA με την ισομορφή C2 να διαφέρει κατά μια αλληλουχία 13 αμινοξέων. Εμφανίζονται συντηρημένες στα θηλαστικά και είναι αποκλειστικά πυρηνικές πρωτεΐνες, σε αντιδιαστολή με τις A/B που δεν έχουν ικανότητα παλίνδρομης μεταφοράς (Dreyfuss et al., 1993). Η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών hnRNP όσον αφορά τους ισομορφικούς τους τύπους ενισχύεται περισσότερο με μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι ίδιες και που μπορούν να αλλάξουν την ικανότητα πρόσδεσής τους στο RNA, την πρόσδεση με άλλες πρωτεΐνες, καθώς και την υποκυτταρική τους εντόπιση. Οι δύο κύριες τροποποιήσεις που έχουν περιγραφεί είναι η φωσφορυλίωση σε θέση σερίνης και θρεονίνης και η μεθυλίωση σε θέση αργινίνης ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι ορισμένες hnRNP πρωτεΐνες (hnRNP A1, F και K) υπόκεινται σε τροποποίηση με την προσθήκη ουβικιτίνης, *in vivo* (Li, et. al., 2004). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες hnRNP A/B και C είναι φωσφορυλιωμένες *in vivo*, σε διαφορετικό ωστόσο βαθμό (Idriss, et. al., 1994; Pype, et. al., 1994; Pinol-Roma & Dreyfuss, 1993) ενώ πολλές hnRNPs μεθυλιώνονται σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες RGG ( arginine- rich) που περιέχουν στην δομή τους, όπως περιγράφεται από τους Godin και Varani (Godin & Varani, 2007). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη hnRNPC1, υφίσταται τροποποίηση SUMO (ubiquitin-like modifications: SUMO: small-ubiquitin-related modifier) με αποτέλεσμα να μειώνεται η αλληλεπίδρασή της με μονόκλωνο DNA (ssDNA) (Vassileva & Matunis, 2004).

Εκτός των 'core' πρωτεϊνών (hnRNP A/B και C1/C2), άλλες πρωτεΐνες hnRNP βρίσκονται σε πιο χαλαρή διασύνδεση με το hnRNA, και η παρουσία τους σε

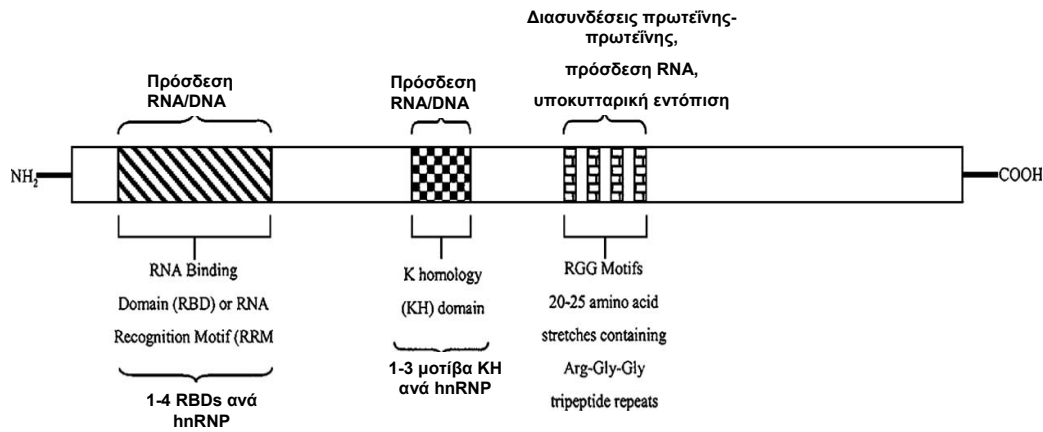
απομονωμένα σύμπλοκα hnRNP προϋποθέτει την προσθήκη αναστολέων των νουκλεασών στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Παραδείγματα αποτελούν: η πρωτεΐνη hnRNP D (ή AUF1), η οποία εμφανίζει τέσσερις ισομορφές (37, 40, 42 και 45 kDa), προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός μοναδικού mRNA μεταγράφου ενώ με πειράματα ανοσοφθορισμού έχει βρεθεί ότι παλινδρομεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Wagner, et. al., 1998; Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992). Η πρωτεΐνη hnRNP L, με μοριακό βάρος 68kDa, η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την hnRNP I, μοριακού βάρους 58kDa. Είναι κυρίως πυρηνικές πρωτεΐνες με ικανότητα παλινδρόμησης μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, εμφανίζουν τέσσερα δομικά μοτίβα RRM για πρόσδεση στο RNA καθώς και διακρίνονται από αρκετές ισομορφές, πιθανότατα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Η hnRNP I ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη PTB που συνδέεται με την πολυπυριμιδινική περιοχή στο 3' άκρο των εσωνίων του pre-mRNA.

Οι πρωτεΐνες hnRNP K/J, με μοριακά βάρη 66 και 68 kDa αντίστοιχα, είναι ανοσολογικά συγγενείς, ικανές να συνδέονται σε αλληλουχία κυτοσινών [poly(C)]. Η πρωτεΐνη K εμφανίζει τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (Dejgaard, et. al., 1994) ο ρόλος των οποίων παραμένει αδιευκρίνιστος. Η πρωτεΐνη U είναι μια άφθονη αποκλειστικά πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, όπως επιβεβαιώθηκε έπειτα από πειράματα ανοσοφθορισμού, ενώ δεν παρουσιάζει ομολογία με καμία από τις γνωστές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη M ταυτοποιήθηκε στα ανθρώπινα κύτταρα με τέσσερις ισομορφές (M1-M4) με μοριακά βάρη 64-68kDa. Είναι κυρίως πυρηνικές, πλούσιες σε μεθειονίνη, και βρίσκονται σε άμεση επαφή με το hnRNA in vivo, όπως και η πλειοψηφία των hnRNP πρωτεϊνών.

#### **A.2.1.2 Δομή των πρωτεϊνών hnRNP**

Κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών hnRNP είναι ότι οι περιέχουν στη δομή τους περιοχές (μοτίβα) που τους προσδίδουν την ικανότητα πρόσδεσης στο RNA. Επιπρόσθετα, διαθέτουν και περιοχές για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Αποτελούνται από μια τουλάχιστον περιοχή πρόσδεσης στο RNA (RBD:RNA binding domain) καθώς και μια τουλάχιστον βοηθητική περιοχή (auxiliary domain). Η κλωνοποίηση συμπληρωματικών DNAs (cDNAs) και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων οδήγησαν στην ανακάλυψη τέτοιων συντηρημένων μοτίβων

στη δομή πρωτεϊνών hnRNP. Επί του παρόντος έχουν ταυτοποιηθεί τρεις τύποι περιοχών πρόσδεσης στο RNA: το μοτίβο RBD ή RRM ή RNP-CS (RNA binding domain, RNA recognition motif ή RNP-consensus sequence), το μοτίβο KH (K-homology motif) και η περιοχή RGG (Arg-Gly-Gly), όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 10.



**Εικόνα 10.** Κοινά δομικά μοτίβα των πρωτεϊνών hnRNP. Σχηματικό διάγραμμα της πρωτεϊνικής δομής με το αμινοτελικό N- (NH<sub>2</sub>) και καρβοξυτελικό C- (COOH) άκρο. Όλα τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP περιέχουν στη δομή τους τουλάχιστον ένα μοτίβο για πρόσδεση στο RNA ή/και ssDNA (μοτίβο RRM, KH, RGG). Επίσης, οι πρωτεΐνες hnRNP διαθέτουν και βοηθητικά μοτίβα που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες ή καθορίζουν την υποκυτταρική τους εντόπιση (μοτίβα RGG) (Carpenter et. al., 2005).

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια μοτίβα για πρόσδεση RNA συναντάμε και σε πρωτεΐνες εκτός των hnRNPs, όπως για παράδειγμα σε παράγοντες ματίσματος (π.χ.ASF/SF2) ή άλλες mRNP πρωτεΐνες (π.χ.HuR, Y14), όπως παρουσιάζεται στον διαμορφωμένο πίνακα 1. Αναλυτικότερα:

Το πλέον χαρακτηρισμένο μοτίβο είναι το μοτίβο RBD/RRM/RNP-CS το οποίο αποτελείται από μια αλληλουχία 90-100 αμινοξέων που συμμετέχουν στην πρόσδεση RNA. Στο μοτίβο περιέχονται συντηρημένες αλληλουχίες αμινοξέων, το οκταπεπτίδιο RNP1 και το λιγότερο συντηρημένο εξαεπτίδιο RNP2 τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από 30 αμινοξέα και βρίσκεται συνήθως στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών hnRNP. Μελέτες έχουν δείξει ότι μέσω του μοτίβου RRM οι hnRNP πρωτεΐνες προσδένουν ειδικές αλληλουχίες στο ssDNA ή στο RNA (Dreyfuss, et. al., 1993). Η περιοχή RRM ορισμένων hnRNPs, όπως για παράδειγμα

της hnRNP A1, συμμετέχει και σε διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Hay, et. al., 2001).

Η περιοχή RGG αναγνωρίστηκε αρχικά ως μοτίβο πρόσδεσης RNA στην πρωτεΐνη hnRNP U. Αποτελείται από 20 με 25 αμινοξέα και συνήθως βρίσκεται σε πρωτεϊνικές δομές συνδιαστικά με άλλα μοτίβα για πρόσδεση στο RNA. Χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις του τριπεπτιδίου Arg-Gly-Gly (RGG) οι οποίες διακόπτονται από άλλα, συνήθως αρωματικά, αμινοξέα. Ο αριθμός των μοτίβων RGG διαφέρει μεταξύ των hnRNP πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη hnRNPA1 διαθέτει 6 τέτοιες περιοχές ενώ στην hnRNP U το μοτίβο RGG είναι το μοναδικό στοιχείο πρόσδεσης στο RNA (Burd & Dreyfuss, 1994). Η περιοχή RGG εμπλέκεται τόσο στην πρόσδεση μορίων RNA όσο και σε διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών καθώς και στην υποκυτταρική τους εντόπιση μέσω του βαθμού μεθυλίωσης στις θέσεις της αργινίνης.

Το μοτίβο KH προσδιορίστηκε αρχικά στην πρωτεΐνη hnRNP K. Έχει μήκος 50 αμινοξέων που περιλαμβάνει συντηρημένες θέσεις αμινοξέων, απαραίτητων στην πρόσδεση του RNA. Η hnRNP K περιλαμβάνει τρία μοτίβα KH (Burd & Dreyfuss, 1994). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι τα μοτίβα KH μπορούν και συμμετέχουν σε διασυνδέσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, όπως αποδείχτηκε για την πρωτεΐνη hnRNPE2, η οποία εκτός του να σχηματίζει ομοδυμερή μέσω των μοτίβων της KH1 και KH2, αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες hnRNP I, K και L (Kim, et. al., 2000).

Πρωτεΐνες	Δομικά μοτίβα πρόσδεσης RNA	Μοριακά βάρη (kDa)
A1	2xRBD, RGG	34
A2/B1	2xRBD, RGG	36/38
C1/C2	1xRBD	41/43
D(AUF1)	2xRBD, RGG	37-45
E1/E2	3xKH	38,39
F	3xRBD	53
H/H'	3xRBD	56
I(PTB)	4xRBD	59
K	3xKH, RGG	62
L	4xRBD	68
Q	3xRBD, RGG	55-70
U	RGG	120
HuR	3xRBD	36
ASF/SF2	2xRBD, RS domain	30
Y14	1xRBD	24

**Πίνακας 1.** Μοριακά βάρη (kDa) και δομικά μοτίβα αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών hnRNP και mRNP. (Πίνακας προσαρμοσμένος από Dreyfuss, et. al., 2002)

### A.2.1.3 Κυτταρικές λειτουργίες των πρωτεϊνών hnRNP

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πρωτεΐνες hnRNP περιέχουν μοτίβα για πρόσδεση στο RNA, καθώς και για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες επιτρέποντας έτσι να συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες επεξεργασίας της γονιδιακής πληροφορίας. Βάση ενός μεγάλου αριθμού πειραματικών ευρημάτων, οι πρωτεΐνες hnRNP θεωρούνται επί του παρόντος σημαντικοί γονιδιακοί ρυθμιστές, αποδίδοντας αυτό τον χαρακτηρισμό στην ευρεία συμμετοχή τους σε σχεδόν όλα τα στάδια βιογένεσης του mRNA από την μεταγραφή, τον μετα-μεταγραφικό έλεγχο μέχρι την μετάφραση (Krenic & Swanson, 1999). Επιπρόσθετα, ο ρόλος τους επεκτείνεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες όπως στο σχηματισμό τελομερών, την απόπτωση και

τον υποκυτταρικό εντοπισμό μορίων mRNA (Ford et. al., 2002; Thiede et. al., 2002; Smith, 2004).

#### **A.2.1.3.1 Πρωτεΐνες hnRNP ως ρυθμιστές ματίσματος**

Η συμμετοχή των πρωτεϊνών hnRNP στο μάτισμα αφορά το βασικό ή ιδιοστατικό (constitutive) και κυρίως το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing). Οι πρώτες μελέτες που υποστηρίζουν την εμπλοκή των hnRNPs στο μάτισμα ήταν πειράματα ανοσοαφαίρεσης μέσω αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών C1 και C2 όπου παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της αντίδρασης ματίσματος (Dreyfuss et al., 1993), ενώ αργότερα βρέθηκε ότι οι hnRNP C συμμετέχουν στην καταλυτική ενεργοποίηση του ματίσματος (Fornace, et. al., 1995). Οι πρωτεΐνες hnRNP τύπου A/B αποτελούν θεμελιώδη συστατικά του ματισματοσώματος και συμμετέχουν τόσο στο βασικό όσο και στο εναλλακτικό μάτισμα. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες A1 και A2/B1 οι οποίες καταστέλλουν το εναλλακτικό μάτισμα pre-mRNAs στόχων ανταγωνίζοντας την δράση πρωτεϊνών SR, όπως για παράδειγμα τον παράγοντα ASF/SF2. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη A1 ανταγωνίζεται την δράση του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 μέσω πρόσδεσής της σε ESS, όπως περιγράφηκε στην ενότητα A.1.2.3.8, σε αντίθεση με πρόσδεση της ASF/SF2 σε στοιχεία ESE και ISE. Για παράδειγμα, όταν τα στοιχεία ESE και ESS υπερκαλύπτονται, η πρόσδεση της A1 από μόνη της επαρκεί για να εμποδίσει την πρόσδεση πρωτεϊνών SR στο στοιχείο ESE. Όταν τα παραπάνω στοιχεία δεν υπερκαλύπτονται, οι πρωτεΐνες hnRNPA/B μπορούν να προσδεθούν συνεργιστικά στο εξώνιο, ευνοώντας την καταστολή του ματίσματος (Mayeda & Krainer, 1992, Martinez-Contreras, et. al., 2007). Όσον αφορά την πρωτεΐνη hnRNPA3 επί του παρόντος δεν υπάρχουν άμεσες αποδείξεις για την μεσολάβησή της στο μάτισμα, πέραν του εντοπισμού της στο ματισματοσώμα, κάτι που πιθανόν να υποδηλώνει ότι λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο όπως οι πρωτεΐνες A1 και A2.

Η συμμετοχή των πρωτεϊνών hnRNP C στο μάτισμα, όπως αναφέρθηκε στην αρχή, είναι αντιφατική αφού οι αρχικές αναφορές για τον συγκεκριμένο αυτό ρόλο της δεν επιβεβαιώθηκαν. Πρόσφατα, η ομάδα του Chabot διερεύνησε την ικανότητα διάφορων πρωτεϊνών hnRNP να επιδρούν στο εναλλακτικό μάτισμα συγκεκριμένων γονιδίων που συμμετέχουν στην απόπτωση. Βρέθηκε, έπειτα από παρέμβαση με

siRNAs χωριστά κατά 14 πρωτεϊνών hnRNP σε τρεις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, ότι όλες οι προς διερεύνηση πρωτεΐνες hnRNP (A1, A2, C, D, DL, F, G, H, I, K, L, M, Q και R) συμπεριλαμβανομένου και της C, συμμετέχουν και επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων σχετιζόμενων με την απόπτωση (Venables, et. al., 2008). Η πρωτεΐνη hnRNP I (ή PTB) αποτελεί έναν γνωστό ρυθμιστή εναλλακτικού ματίσματος αρκετών γονιδίων, που συνδέεται κυρίως με την καταστολή του ματίσματος (Wagner & Garcia-Blanco, 2001, Spellman, et. al., 2005). Για παράδειγμα, η hnRNP I ανταγωνίζεται την πρόσδεση του παράγοντα ματίσματος U2AF ανοδικά του 3' σημείου τομής του εξωνίου 6 του αποπτωτικού γονιδίου Fas, καταστέλλοντας την ενσωμάτωση του εξωνίου 6 (Inzquierdo, et. al., 2005).

Η πρωτεΐνη hnRNP L θεωρείται σήμερα ως ένας σημαντικός ρυθμιστής ματίσματος, μιας και έχει βρεθεί ότι επηρεάζει πολλά γονίδια-στόχους μέσω εναλλακτικού ματίσματος, λειτουργώντας τόσο ως ενεργοποιητής όσο και ως καταστολέας ματίσματος (Hung, et. al., 2008). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη L προωθεί την ενσωμάτωση εξωνίου στο pre-mRNA του παράγοντα eNOS (endothelial cell nitric oxide synthase) ( Hui, et. al., 2003) ενώ μπορεί και να καταστείλει το μάτισμα εξωνίων, μέσω ειδικής πρόσδεσής της στο στοιχείο ESS στο pre-mRNA του παράγοντα CD45 (Rothrock, et. al., 2005; Tong, et. al., 2005).

Πρόσφατη αναφορά ανέδειξε για πρώτη φορά και την πρωτεΐνη hnRNP M ως πιθανό συντελεστή στο εναλλακτικό μάτισμα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη M προσδένει ειδικά σε στοιχεία ISE/ISS στο pre-mRNA του παράγοντα FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) ενώ με την συμμετοχή και άλλων πρωτεϊνών hnRNP ρυθμίζει συνδιαστικά το εναλλακτικό μάτισμα του FGFR2, υποστηρίζοντας ότι μπορεί η πρωτεΐνη M να προωθήσει ή να καταστείλει το εναλλακτικό μάτισμα διάφορων εξωνίων (Hovhannisyan & Carstens, 2007).

#### **A.2.1.3.2 Συμμετοχή των hnRNPs στην πολυαδενυλίωση**

Η πρωτεΐνη hnRNPI (ή PTB), εκτός από την γνωστή ικανότητα πρόσδεσής της στην πολυπυριμιδική περιοχή των εσωνίων, μπορεί να ρυθμίσει θετικά ή και αρνητικά την επεξεργασία του 3' άκρου (3' end processing) ανταγωνιζόμενη τον παράγοντα CstF για πρόσδεση στα ίδια στοιχεία πάνω στο pre-mRNA. Το αποτέλεσμα είναι να



εμποδίζεται η ενδονουκλεολυτική τομή (cleavage) και κατ'επέκταση η ωρίμανση του 3' άκρου του mRNA (Castelo-Branco, et. al., 2004). Η πρωτεΐνη hnRNP H', έχει ταυτοποιηθεί ως παράγοντας που ενεργοποιεί τις διεργασίες τομής και προσθήκης poly(A) ενισχύοντας την πρόσδεση του παράγοντα CstF στο pre-mRNA (Bagga, et. al., 1998). Αντίθετα, η πρωτεΐνη hnRNP F ρυθμίζει αρνητικά τις διεργασίες τομής του 3' άκρου, εμποδίζοντας την πρόσδεση του CstF στο RNA (Veraldi, et. al., 2001). Τέλος, μία ορθόλογη της hnRNP A1 πρωτεΐνη στο ζυμομύκητα θεωρείται ως παράγοντας επιλογής εναλλακτικών σημείων πολυαδενυλίωσης, εξαρτώμενη από την συγκέντρωση της πρωτεΐνης κατ'αναλογία με την δράση της hnRNP A1 στο εναλλακτικό μάτισμα στα θηλαστικά (Minvielle-Sebastia, et. al., 1998).

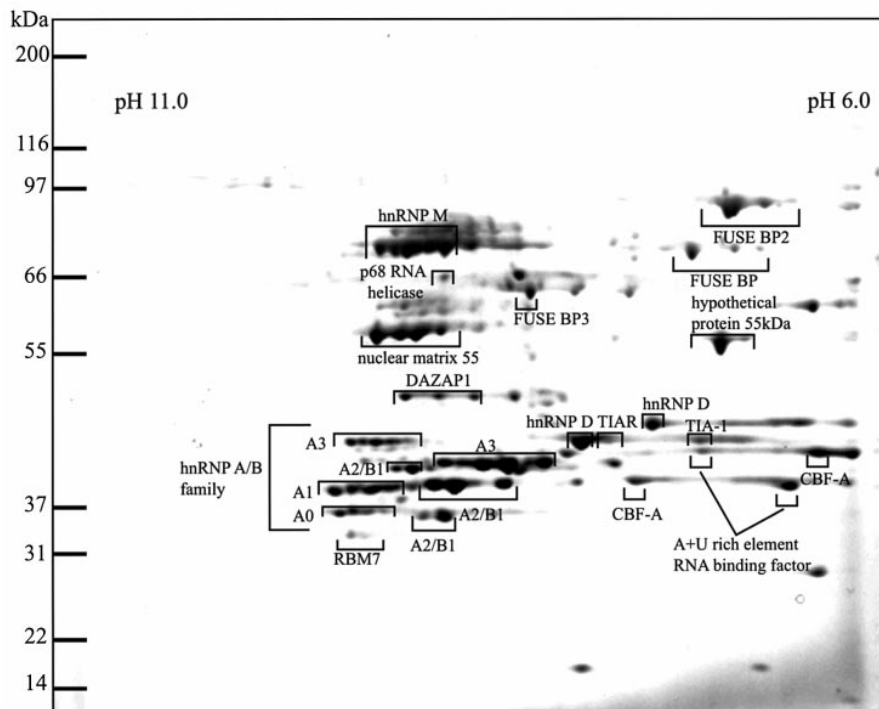
#### **A.2.1.3.3. Μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα με την διαμεσολάβηση πρωτεϊνών hnRNP**

Τα ώριμα μετάγραφα του πυρήνα εξάγονται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή συμπλόκου mRNP συνοδευόμενα και από πρωτεΐνες hnRNP. Θεωρείται ότι οι αποκλειστικά πυρηνικές πρωτεΐνες hnRNP, όπως η C και η U, διαχωρίζονται από το σύμπλοκο και διατηρούν την πυρηνική τους εντόπιση, ενώ πρωτεΐνες με ικανότητα να παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, όπως οι hnRNP A/B, D, E και η K, μεταφέρονται μαζί με το mRNA μέσω του πυρηνικού πόρου NPC (nuclear pore complex) (Mili, et. al., 2001, Gorlich & Kutay, 1999). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη, μέσω πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, της πρωτεΐνης C-hrp36 στα δίπτερα έντομα, (ορθόλογη της hnRNP A1) η οποία βρέθηκε να συνοδεύει το mRNA, μέσω των πυρηνικών πόρων, στα πολυσώματα για μετάφραση (Visa, et. al., 1996).

Η υποκυτταρική εντόπιση και κατ'επέκταση ο λειτουργικός ρόλος των πρωτεϊνών hnRNP επηρεάζεται και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκεινται. Για παράδειγμα, όταν η πρωτεΐνη hnRNP I φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A) συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα (Xie, et. al., 2003). Η φωσφορυλίωση της hnRNP A1 σε ένα πεπτίδιο 19 αμινοξέων (F-peptide) στο καρβοξυτελικό άκρο έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη επαναφορά της στον πυρήνα (Allemand, et. al., 2005).

#### A.2.1.3.4 Ρόλος πρωτεϊνών hnRNP στη σταθεροποίηση/αποσταθεροποίηση του mRNA γονιδίων-στόχων

Όπως προαναφέρθηκε (ενότητα A.1.3.1), η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) του mRNA περιέχει ρυθμιστικές αλληλουχίες πλούσιες σε αδενίνη-ουρακίλη (AREs). Σε αυτά τα στοιχεία ARE προσδένονται πρωτεΐνες RBP επηρεάζοντας την σταθερότητα καθώς και την μεταφρασιμότητα του mRNA γονιδίων-στόχων, κυρίως κυτταροκινών και ογκογονιδίων. Πολλές έρευνες έδειξαν την ικανότητα πρωτεϊνών hnRNP να προσδένουν σε στοιχεία ARE. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες hnRNP A/B (A1, A0, A2/B1 και A3) αλλά και οι hnRNP D και M, οι οποίες προσδένουν στο στοιχείο ARE του mRNA του παράγοντα TNF- $\alpha$ , όπως επιβεβαιώθηκε σε εκχυλίσματα κυτάρων RAW (μακροφάγα κύτταρα τροκτικών) έπειτα από χρωματογραφία συγγένειας και ανάλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών σε πηκτώματα δύο διαστάσεων (εικόνα 11).



**Εικόνα 11.** Πρωτεΐνες με ικανότητα να προσδένουν στο στοιχείο ARE του παράγοντα TNF- $\alpha$ . Κυτταρικά εκχυλίσματα μακροφάγων (κύτταρα RAW) επώαστηκαν με σημασμένα RNA-ολιγονουκλεοτίδια τα οποία αντιστοιχούν στην περιοχή 3' UTR, πλούσια σε αδενίνη-ουρακίλη (AU-rich) του mRNA του TNF- $\alpha$ . Διαχωρισμός των ARE-πρωτεϊνών σε πηκτώμα δύο διαστάσεων (pH 6-11) και χρώση του πηκτώματος με Sypro-Ruby. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με χρήση φασματοσκοπίας μάζας (Rousseau, et. al., 2002).

Ωστόσο, η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη hnRNP με ικανότητα πρόσδεσης σε στοιχεία ARE είναι η hnRNP D ή AUF1 (μια πρωτεΐνη με δομή συγγενική των hnRNP A/B) με κύρια συμμετοχή στην αποσταθεροποίηση του mRNA και κυρίως μέσω δύο εκ των τεσσάρων ισομορφών της, τις p37 και p42, οι οποίες εμφανίζουν και την υψηλότερη συγγένεια για στοιχεία ARE (Loflin et. al., 1999, Xu et. al., 2001). Αντιστρόφως, η hnRNP D μπορεί να λειτουργήσει και ως παράγοντας σταθεροποίησης όπως για παράδειγμα ισχύει για το mRNA της α-γλοβίνης, όπου σχηματίζει ένα RNP σύμπλοκο με τις hnRNP E1 και E2 στο 3' UTR άκρο του mRNA (Kiledjian et. al., 1997, Wang et. al., 1999).

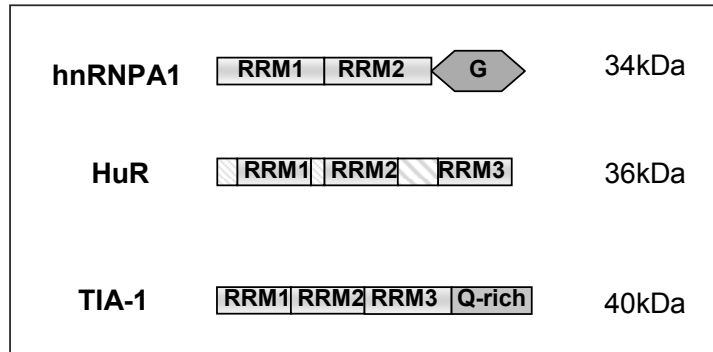
Εκτός από την hnRNP D, έχουν βρεθεί και άλλες πρωτεΐνες hnRNP με επίδραση στην σταθεροποίηση του mRNA. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες hnRNP A1, E1 και K ενεργοποιούν την σύνθεση κολλαγόνου I και III αλληλεπιδρώντας με το 3' UTR άκρο των αντίστοιχων mRNAs (Thiele et. al., 2004). Η πρωτεΐνη hnRNP C προσδένεται σε cis-στοιχεία στο 3' UTR άκρο του mRNA του υποδοχέα της ουροκινάσης (uPAR) οδηγώντας στην σταθεροποίησή του (Shetty. S, 2005), ενώ η hnRNP L σταθεροποιεί τον παράγοντα αγγειογένεσης VEGF (Shih & Claffey, 1999).

Τέλος, η πρωτεΐνη hnRNP U βρέθηκε πρόσφατα ότι ενεργοποιεί την έκφραση του παράγοντα TNF-α (καθώς και άλλων γονιδίων) αυξάνοντας την σταθερότητα του mRNA, πιθανών μέσω πρόσδεσης στην 3' UTR περιοχή (Yugami et. al., 2007).

### **A.2.2. Συμμετοχή άλλων πρωτεϊνών RBP στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο του mRNA**

Εκτός από τις πρωτεΐνες hnRNP, σημαντικό ρόλο στον ρυθμό ανακύκλωσης (ή αποδόμησης) και μεταφρασιμότητας του mRNA παίζει μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών RBP οι οποίες μοιράζονται με τις hnRNP την ιδιότητα να προσδένουν σε στοιχεία ARE στο 3' UTR άκρο ενός αριθμού mRNA γονιδίων με μικρή διάρκεια ζωής (όπως mRNAs κυτταροκινών ή ογκογονιδίων) επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τον ρυθμό ανακύκλωσης. Σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας αυτά τα mRNAs εκτίθενται σε ταχύ ρυθμό αποδόμησης, ενώ κάτω από επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων, όπως κυτταρική ενεργοποίηση ή στρες, σταθεροποιούνται και κατ'επέκταση αυξάνεται η μεταφρασιμότητά τους (Shim & Karin, 2002). Στην

παρούσα εργασία θα χαρακτηριστούν δύο από τις βασικότερες πρωτεΐνες με ικανότητα να προσδέονται σε στοιχεία AREs, την πρωτεΐνη HuR και την ομόλογή της TIA-1 (T-cell internal antigen -1). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12, οι πρωτεΐνες HuR και TIA-1 μοιράζονται και κοινά δομικά χαρακτηριστικά με πρωτεΐνες hnRNP.

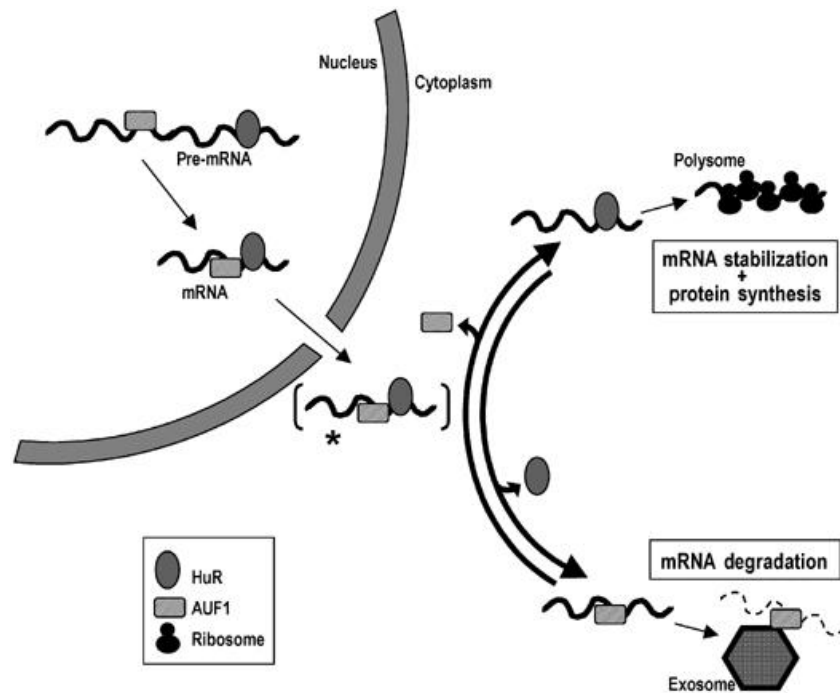


**Εικόνα 12:** Κοινά δομικά χαρακτηριστικά μεταξύ μιας πρότυπης πρωτεΐνης hnRNP, την hnRNP A1, και των πρωτεϊνών HuR και TIA-1. Μοτίβα RRM 1, 2 και 3, G: μοτίβο πλούσιο σε γλυκίνη, Q-rich: μοτίβο πλούσιο σε γλουταμίνη.

### A.2.2.1. Πρωτεΐνη HuR

Μία εκ των πλέον γνωστών πρωτεϊνών με κύρια συμμετοχή στη σταθεροποίηση mRNA στόχων είναι η πρωτεΐνη HuR (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο A.1.3.1). Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών ELAV, έχει μοριακό βάρος 36 kDa και εκφράζεται ευρέως σε όλους τους κυτταρικούς τύπους θηλαστικών. Όλες οι πρωτεΐνες Hu (HuB, HuC, HuD και HuR) διαθέτουν τρία συντηρημένα μοτίβα RRM, δύο στο αμινοτελικό άκρο για πρόσδεση σε στοιχεία AREs και ένα στο καβοξυτελικό άκρο για πρόσδεση στην πολύ(A) ουρά ορισμένων mRNA ή ακόμα και για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (εικόνα 12) (Ma et. al., 1997, Kasashima et. al., 2002). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη HuR είναι κυρίως πυρηνική με το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου 90%) να εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ παράλληλα έχει την ικανότητα να παλινδρομεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, όπως οι περισσότερες hnRNP πρωτεΐνες (Keene, 1999, Gallouzi & Steitz, 2001). Παρ'όλη την κατ'εξοχήν πυρηνική της εντόπιση υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για τον ρόλο της στον πυρήνα, ενώ έχει μελετηθεί επαρκώς ο ρόλος της στην σταθεροποίηση/μετάφραση του mRNA (Hinman & Lou, 2008). Η επίδραση της HuR στην σταθερότητα του mRNA εξαρτάται και από άλλους, ανταγωνιστικούς

παράγοντες. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η συμμετοχή της πρωτεΐνης hnRNP D/AUF-1 η οποία, σε αντίθεση με την HuR, αποσταθεροποιεί τα mRNA-στόχους γεγονός που υποδηλώνει τον ανταγωνιστικό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών (εικόνα 13) (Loflin et. al., 1999, P., Brennan & Steinz, 2001, Lal, et al., 2004). Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες HuR και hnRNP D μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα στους ίδιους mRNA-στόχους, όπως τα mRNAs των γονιδίων p21 και της κυκλίνης D1, με την πρώτη να επιδρά θετικά και την δεύτερη αρνητικά στην σταθεροποίησή τους (Lal et.al., 2004). Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι οι HuR και hnRNP D αλληλεπιδρούν in vivo σχηματίζοντας ετεροδιμερή τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, ενώ η διασύνδεση αυτή διακόπτεται κάτω από συνθήκες στρες (David et. al., 2007).



**Εικόνα 13.** Προτεινόμενο μοντέλο της φυσικής και λειτουργικής αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HuR και AUF1 (Lal, et. al., 2004)

Η πρωτεΐνη HuR, εκτός από τον κύριο ρόλο της στη σταθεροποίηση του mRNA, μπορεί να επιδράσει και στο στάδιο της μεταγραφής, κυρίως ενεργοποιώντας αλλά και καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω πρόσδεσης στο 3' UTR του mRNA, όπως συμβαίνει και με την ενεργό συμμετοχή της στην σταθερότητά του, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη στρατολόγηση-συσσώρευση mRNA-στόχων στα πολυσώματα και κατ'επέκταση την έναρξη της μετάφρασης. Παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της μεταγραφής των

γονιδίων του κυτοχρώματος C και του p53 μέσω της HuR (Kawai et. al., 2006, Mazan-Mamczarz et. al., 2003) ενώ έχει βρεθεί ότι μπορεί να καταστείλει την μετάφραση ορισμένων mRNAs, όπως του παράγοντα p27 όπου προσδένεται στο 5' UTR άκρο εμποδίζοντας την μετάφρασή του (Kullmann et. al., 2002).

Όσον αφορά τον πυρηνικό ρόλο της HuR, υπάρχουν λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, πρόσφατα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη HuR συμμετέχει στο μάτισμα καταστέλλοντας το εναλλακτικό μάτισμα του αποπτωτικού γονιδίου Fas σε κύτταρα HeLa, ενώ ο ρόλος της επεκτείνεται και στην πολυαδενυλίωση όπου φαίνεται να εμποδίζει τον σχηματισμό της πολύ(A) ουράς (Izquierdo, 2008, Zhu et. al., 2007).

#### **A.2.2.2. Πρωτεΐνη TIA-1**

Η πρωτεΐνη TIA-1 (T cell intracellular antigen-1), καθώς και η ομόλογή της TIAR (TIA-related protein), αποτελούν συγγενή με την HuR κατηγορία πρωτεϊνών RBP εφόσον συμμετέχουν στην έκφραση πρωτεϊνών τα mRNAs των οποίων περιέχουν στοιχεία AREs. Μοιράζονται με την HuR τα τρία μοτίβα RRM, και επιπλέον διαθέτουν ένα μοτίβο στο καρβοξυτελικό άκρο, πλούσιο σε γλουταμίνη (Kedersha & Anderson, 2002). Είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες με κύρια πυρηνική εντόπιση και με ικανότητα παλινδρόμησης μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Kedersha, et. al., 2000). Στον πυρήνα οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στο εναλλακτικό μάτισμα τόσο των ίδιων τους pre-mRNA (Le Guiner et. al., 2001) όσο και άλλων γονιδίων, όπως για παράδειγμα του αποπτωτικού γονιδίου Fas όπου λειτουργούν ανταγωνιστικά με την δράση της πρωτεΐνης HuR (Izquierdo, 2008). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη TIA-1 μπορεί να δράσει ανταγωνιστικά με την πρωτεΐνη hnRNP I στο εναλλακτικό μάτισμα του Fas (Inzquierdo et. al., 2005).

Όσον αφορά των κυτταροπλασματικό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών, θεωρούνται κυρίως καταστολείς της μετάφρασης. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη TIA-1 προσδένει στο mRNA του παράγοντα COX-2, εμποδίζοντας την μετάφρασή του, ενώ η απουσία της TIA-1 από κύτταρα μακροφάγων οδηγεί στην αύξηση του mRNA της TNF-α στα πολυσώματα, ενισχύοντας την άποψη για κατασταλτική δράση της TIA-1 στην μετάφραση (Dixon et. al., 2003, Piecyk et. al., 2000).

### **A.3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων χαρακτηρίζεται από την απώλεια ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης λόγω προοδευτικής συσσώρευσης μεταλλάξεων σε γονίδια εμπλεκόμενα με τον καρκίνο. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν ενεργοποίηση ογκογονιδίων αλλά και καταστολή ογκοκατασταλτικών παραγόντων. Οι αλλαγές αυτές ευνοούν την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων και οδηγούν σε καρκινικούς φαινότυπους όπως: αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης, αντοχή στην απόπτωση, διατήρηση της αγγειογένεσης, διήθηση ιστών και μεταστατική ικανότητα καθώς και διαφυγή από το αμυντικό σύστημα (Hanahan & Weinberg, 2000).

Η διαφορική έκφραση γονιδίων που ευνοούν την ανάπτυξη νεοπλασιών οφείλεται σε μεταλλάξεις που υφίστανται τα ίδια τα γονίδια αλλά και στην απορρύθμιση trans-παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Μεταξύ αυτών των παραγόντων είναι και οι πρωτεΐνες RBP που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του mRNA και κυρίως στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο. Κατά συνέπεια, επηρεάζεται η έκφραση γονιδίων όπως ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες, γεγονότα που μπορούν να οδηγήσουν στον κυτταρικό μετασχηματισμό και κατ'επέκταση στην ανάπτυξη νεοπλασιών.

Όπως αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες, οι πρωτεΐνες hnRNP θεωρούνται πλέον κύριοι γονιδιακοί ρυθμιστές με πολλαπλούς κυτταρικούς ρόλους. Συνεπώς, η απορρύθμιση της έκφρασής τους μπορεί να επηρεάσει πολλά γονιδιακά μονοπάτια με αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση συμβολή στην ενεργοποίηση του καρκινικού μετασχηματισμού.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η διατήρηση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων. Στα σπονδυλωτά, τα τελομερή αποτελούν επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες TTAGGG (Meyne et. al., 1989) με μήκος που κυμαίνεται από 3 έως 15 kb στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα. Η ακεραιότητα των τελομερών είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ικανότητας κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς η σταδιακή απώλεια του τελομερικού DNA σε κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια και αναστολή του κυτταρικού κύκλου συνοδευόμενη από κυτταρική γήρανση ή απόπτωση. Αντίθετα η σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών οδηγεί σε κυτταρική αθανατοποίηση αφού τα κύτταρα αποτυγχάνουν να μουν σε διαδικασία γήρανσης.

Βασικό ρόλο στη σύνθεση των τελομερών έχει το ένζυμο της ριβονουκλεοπρωτεϊνικής πολυμεράσης, η τελομεράση, η οποία είναι υπεύθυνη μαζί με το RNA μόριο της τελομεράσης για την σύνθεση των τελομερικών επαναλήψεων (TTAGGG). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες όπως οι hnRNPs, οι οποίες υποβοηθούν τον ρόλο της τελομεράσης. Συγκεκριμένα, οι hnRNP A1, A2/B1, D και E έχουν την ικανότητα να προσδένουν πάνω στα τελομερή τμήματα του DNA ενώ οι hnRNP A1, D και C1/C2 συνδέονται και με την ίδια τελομεράση (Ford et al., 2002). Η hnRNP A1 έχει βρεθεί ότι βοηθάει την επιμήκυνση των τελομερών και προωθεί την δραστηριότητα της τελομεράσης (LaBranche et al., 1998, Zhang et al., 2006), ενώ η hnRNP A2 φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο για το τελομερικό DNA (Moran-Jones et al., 2005). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι και η πρωτεΐνη hnRNP A3 προστατεύει τα τελομερή και εμποδίζει την δράση επιμήκυνσης της τελομεράσης, *in vitro* (Tanaka et al., 2007, Huang et al., 2008).

Σημαντικό ρόλο για την έναρξη και εξέλιξη της καρκινικής εξαλλαγής παίζουν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που μπορεί να προκύψουν από μεταλλάξεις σε *cis*-στοιχεία ματίσματος ή στη δράση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν το μάτισμα και δη το εναλλακτικό μάτισμα, όπως οι πρωτεΐνες SR και οι hnRNPs. Σε αρκετές μορφές καρκίνου έχουν αναφερθεί αλλαγές στην επιλογή σημείων ματίσματος στο mRNA γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκινικό μετασχηματισμό (Srebrow & Kornblihtt, 2006). Γονίδια τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα και των οποίων οι πρωτεϊνικές ισομορφές αλλάζουν κατά την καρκινογένεση, περιλαμβάνουν: ογκογονίδια όπως το K-ras (Wang, et al., 2001), ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το Mdm2 (Lukas, et al., 2001), γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση, όπως το Fas και η κασπάση 2 (Jiang, et al., 1999), γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, όπως ο παράγοντας VEGF (Yuan, et al., 2001) καθώς και ρυθμιστικά γονίδια της κυτταρικής πρόσφυσης (*adhesion*) και της μεσοκυττάριας επικοινωνίας, όπως το CD44 (Cooper & Dougherty, 1995). Ο παράγοντας CD44 είναι από τα πιο μελετημένα γονίδια που υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα με την εμφάνιση ισομορφών σχετιζόμενων με την ανάπτυξη νεοπλασίας και την μετάσταση (Brinkman, 2004). Το mRNA του CD44 αποτελεί στόχο ματίσματος της hnRNP A1 και του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 (Mattez et al., 2000, Galiana-Arnoux et al., 2003) ενώ η υπερέκφραση της hnRNP A1 που παρατηρήθηκε σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα συνοδευόταν από αλλαγές



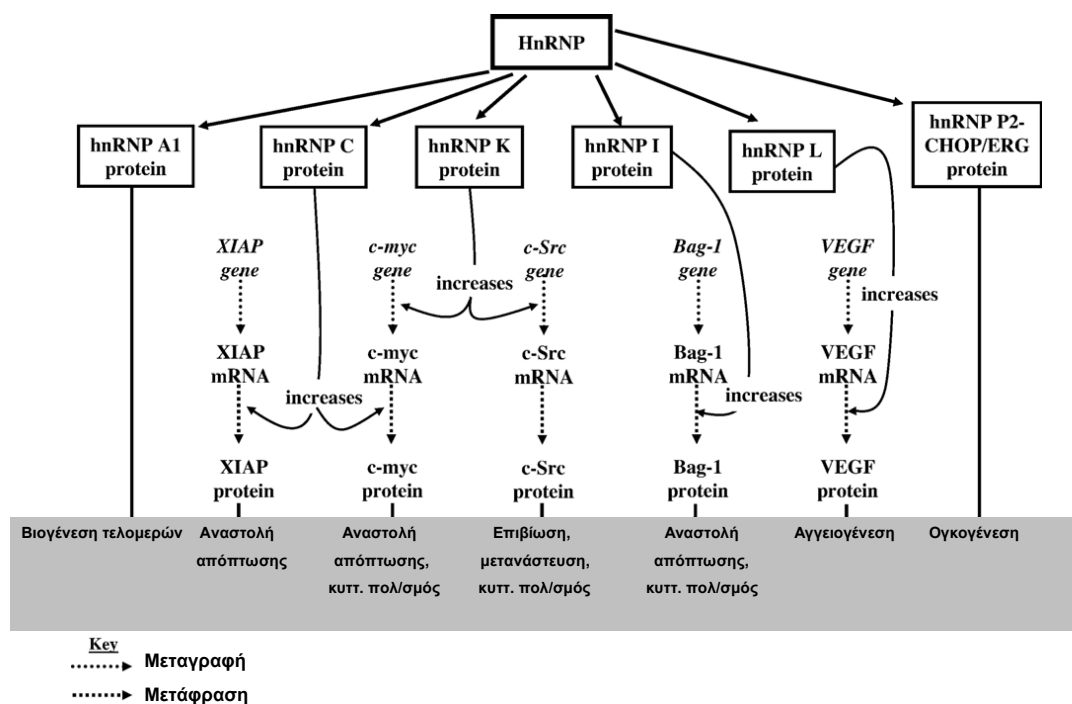
στο μάτισμα του CD44 σχετιζόμενες με την εξέλιξη του καρκίνου (Zerbe et. al., 2004).

Η σωστή έκφραση πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι προφανής στην αποτροπή ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη νεοπλασίας. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η c-myc, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται και από πρωτεΐνες hnRNP σε διάφορα στάδια του μετα-μεταγραφικού ελέγχου. Για παράδειγμα, η hnRNP D προσδένει στο 3' UTR άκρο του c-myc mRNA επηρεάζοντας την σταθερότητά του (Brewer, 1991, ενώ οι πρωτεΐνες hnRNP C1/C2, K, E1 και E2 ενεργοποιούν την μετάφραση (Kim et. al., 2003, Evans et. al., 2003). Τα επίπεδα της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Βρέθηκε ότι η έκφραση των hnRNP A1 και A2/B1 διαφοροποιείται στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου κυττάρων Colo16 (πλακώδη καρκινικά κύτταρα ) και HaCaT (αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα) ενώ η μείωση των επιπέδων τους με πειράματα RNAi οδήγησε σε σημαντική μείωση τον βαθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων Colo16 (He et. al., 2005). Η άμεση συμμετοχή των hnRNP A1 και A2/B1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό φαίνεται και από πειράματα με χρήση siRNA σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού, όπου η μείωση των επιπέδων τους προκάλεσε απόπτωση στα καρκινικά αλλά όχι στα φυσιολογικά κύτταρα (Party et. al., 2003, 2004). Πρόσφατα αποτελέσματα ενίσχυσαν τον ρόλο της hnRNP A2/B1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού ταυτοποιήθηκε ένας σημαντικός αριθμός mRNA-στόχων, γονιδίων σχετιζόμενων με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (He et. al., 2008).

Η αναστολή της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) είναι ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος διευκολύνει την επιβίωση γενετικά ασταθών κυττάρων, επιτρέποντας την επιλογή και επιβίωση επιθετικών κλώνων και κατ'επέκταση τον καρκινικό μετασχηματισμό. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο αποπτωτικός μηχανισμός ελέγχεται στο κύτταρο από την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Ένας ισχυρός αναστολέας της απόπτωσης είναι το γονίδιο XIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis). Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP C1/C2 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μετάφρασης του XIAP, λειτουργώντας ως αναστολέας της απόπτωσης (Holcik et. al., 2003), ενώ οι πρωτεΐνες hnRNP F και H επάγουν την απόπτωση, ενεργοποιώντας, μέσω

εναλλακτικού ματίσματος, τον προ-αποπτωτικό παράγοντα Bcl-xs (Garneau et. al., 2005).

Η επαγωγή των μηχανισμών αγγειογένεσης στην καρκινογένεση συμβάλλει στην τροφοδότηση με αίμα των συμπαγών όγκων. Χωρίς την προμήθεια αίματος οι όγκοι δεν αναπτύσσονται πάνω από 2-3mm. Ανάμεσα στους παράγοντες που διεγείρουν την αγγειογένεση είναι οι VEGF (vascular endothelial growth factor) και ο FGF (fibroblast growth factor) (Nyberg et. al., 2005). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ρύθμιση των παραγόντων αυτών από πρωτεΐνες hnRNP. Για παράδειγμα, η hnRNP A1 προάγει την μετάφραση του παράγοντα FGF 2 ενώ η hnRNP L σταθεροποιεί το mRNA του παράγοντα VEGF (Shih & Claffey, 1999). Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται, διαγραμματικά, παραδείγματα πρωτεϊνών hnRNP που ρυθμίζουν άμεσα ή έμμεσα γονιδιακά μονοπάτια σχετιζόμενα με την καρκινική εξαλλαγή.



**Εικόνα 14.** Γονιδιακά μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με την καρκινογένεση και που φαίνεται ότι ρυθμίζονται από πρωτεΐνες hnRNP. Το γκρι κουτί περιλαμβάνει τα καρκινογενετικά στάδια (βιογένεση τελομερών, αναστολή της απόπτωσης, κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση) που επηρεάζονται από την διαφορική έκφραση γονιδίων μέσω των πρωτεϊνών hnRNP (Carpender, et. al., 2005).

### **A.3.1. Απορρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP σε διάφορους τύπους καρκίνου**

Μία από τις πλέον μελετημένες πρωτεΐνες hnRNP στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η hnRNP A2/B1. Το 1988, δημοσιεύτηκε η ικανότητα ενός μονοκλωνικού αντισώματος (703D4) να ανιχνεύει στα πτύελα ασθενών καρκινικά κύτταρα σε πρώιμα κλινικά στάδια του ανθρώπινου μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Tockman et. al., 1988). Αργότερα, βρέθηκε ότι το αντίσωμα 703D4 είναι ειδικό για την πρωτεΐνη hnRNP A2 και την ισομορφή της B1. Ανάλυση των επιπέδων της hnRNP A2/B1, μέσω Northern blot, σε διάφορες καρκινικές σειρές του πνεύμονα έδειξε αύξηση των επιπέδων mRNA της A2/B1 στον καρκίνο του πνεύμονα σε αντιδιαστολή με φυσιολογικές, πρωτογενείς επιθηλιακές σειρές του πνεύμονα (Zhou et. al., 1996). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να έχει η έκφραση της ισομορφής B1 (προϊόν εναλλακτικού ματίσματος της A2) η οποία έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός προγνωστικός δείκτης του πλακώδες πνευμονικού καρκινώματος αφού η υπερέκφρασή της συνδέεται με καλύτερη βιωσιμότητα του ασθενούς. Η υπερέκφραση της B1, κυρίως μέσω πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας, σε αρχικά στάδια του καρκίνου του πνεύμονα, όπως σε δυσπλαστικές αλλοιώσεις, την καθιστούν πιθανό πρώιμο δείκτη καρκίνου του πνεύμονα ( Wu et. al., 2003, Sueoka et. al., 2001, Zech et. al., 2006). Οι πρωτεΐνες hnRNP A2 και B1 υπερεκφράζονται και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού, στο πάγκρεας και στον οισοφάγο (Zhou et. al., 2001, Yan-Sanders et. al., 2002, Matsuyama et. al., 2000). Η hnRNP A2/B1 έχει χαρακτηριστεί ως ογκοεμβρυϊκή (oncofetal) πρωτεΐνη, αφού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του πνεύμονα στα θηλαστικά εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα, μειώνεται στον βρογχικό επιθήλιο του ενήλικα και υπερεκφράζεται στον καρκινικό ιστό (Montuenga et. al., 1998). Εκτός από την A2/B1, και άλλα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP υπερεκφράζονται στον καρκίνο. Οι πρωτεΐνες hnRNP A1, C1/C2, H και I υπερεκφράζονται στον καρκίνο του αυχένα (Fay, et. al., 2009), οι hnRNP A1, C1/C2 και K υπερεκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα (Pino et. al., 2003), ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι ο βαθμός υπερέκφρασης της hnRNP K συσχετίζεται με την έκταση των πνευμονικών όγκων Tang, et.al., 2008). Επίσης, το mRNA της hnRNP A1 υπερεκφράζεται και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Ushigome et. al., 2005). Παράλληλα με τις βιβλιογραφικές αναφορές για υπερέκφραση πρωτεϊνών hnRNP, πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν

μείωση άλλων hnRNPs στον καρκίνο. Παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες hnRNP G και E2, οι οποίες εμφανίζονται σε χαμηλά επίπεδα στον στοματικό ανθρώπινο καρκίνο σε σχέση με μη-καρκινικά κύτταρα σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Shin et. al., 2006, Roychoudhury., et.al., 2007).

Επί του παρόντος και παρά την πληθώρα σχετικών αναφορών, η σχέση της υπερέκφρασης πρωτεϊνών hnRNP με την καρκινογένεση δεν έχει πλήρως επιβεβαιωθεί. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν προκαταρκτικά αφού στηρίζονται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση καρκινικών κυτταρικών σειρών και λιγότερο σε ιστολογικά δείγματα.

### **A.3.2. Ρόλος της πρωτεΐνης HuR στον καρκίνο**

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι πρωτεΐνες RBPs, όπως η HuR και TIA-1, έχουν την ικανότητα να προσδένουν σε στοιχεία AREs γονιδίων (πρωτεΐνες ARE-RBPs), ρυθμίζοντας κυρίως την σταθερότητα και την μεταφρασιμότητα των αντίστοιχων mRNA. Αυτά τα γονίδια εκφράζουν κυρίως πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (κυτταροκίνες, ογκοπρωτεΐνες και ογκοκατασταλτικούς παράγοντες). Καρκινοεξαρτώμενες διαφοροποιήσεις που αφορούν πρωτεΐνες ARE-BP και κυρίως της HuR έχουν περιγραφεί και αφορούν αλλαγές στα επίπεδα, την υποκυτταρική εντόπιση και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η πρώτη ένδειξη εμπλοκής της πρωτεΐνης HuR στον καρκίνο ήταν η παρατήρηση ότι οι πρωτεΐνες Hu/ELAV αποτελούν αντιγόνα που εμφανίζονται σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Dalman et. al., 1990). Αργότερα, πολλές αναφορές σύνδεσαν την έκφραση της HuR με τον καρκίνο. Καταρχήν, έχουν βρεθεί πολλοί mRNA-στόχοι της HuR που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με συμμετοχή σε κυτταρικές λειτουργίες που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινικό μετασχηματισμό, όπως την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση. Για παράδειγμα, η HuR μπορεί να ρυθμίσει και να προωθήσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω σταθεροποίησης του mRNA των κυκλινών A και B καθώς και του παράγοντα EGF (epidermal growth factor) (Wang et. al., 2000, Sheflin et. al., 2004), όπως και του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF (Levy et. al., 1998). Επίσης,

έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη HuR προάγει την έκφραση διάφορων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τον αναστολέα απόπτωσης προθυμοσίνη α (Lal et al., 2005). Πρόσφατα αποτελέσματα προτείνουν διπλή δράση της HuR, αφού φαίνεται (εκτός της αντι-αποπτωτικής της δράσης) να προάγει την απόπτωση όταν ο κυτταρικός θάνατος είναι πλέον αναπόφευκτος (Mazroui et al., 2008). Τέλος, η κατασταλτική δράση της HuR στην μετάφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p27 αποτελεί ακόμα μια ένδειξη για την ογκογενετική δράση αυτής της RBP πρωτεΐνης (Kullmann et al., 2002) ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι μαζικές αλλαγές σε mRNA-στόχους της HuR εμπλέκονται στην εξέλιξη ενός πρώιμου σταδίου σε πιο επιθετικό τύπο, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Mazan-Mamczarz et al., 2008).

Η έκφραση της πρωτεΐνης HuR έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου υπερεκφράζεται τόσο σε πρώιμες βλάβες όσο και σε προχωρημένους όγκους ενώ η έκφραση και η κυτταροπλασματική της εντόπιση αυξάνονται παράλληλα με την εξέλιξη του καρκίνου (Lopez de Silanes et al., 2003). Η έκφρασή της εμφανίζεται αυξημένη και σε άλλους καρκινικούς τύπους όπως στον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, των ωοθηκών και του αυχένα (Denkert et al., 2004, Blaxall et al., 2000, Denkert et al., 2004, Fay, et al., 2009).

### **A.3.3. Καρκίνος του πνεύμονα**

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι παγκοσμίως υπεύθυνος για τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου από ανάπτυξη καρκίνου, συγκριτικά με άλλους καρκινικούς τύπους όπως καρκίνο του προστάτη, μαστού και ορθοκολικού καρκίνου. Εμφανίζεται με μια συχνότητα που αντιπροσωπεύει 1.2 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως ενώ το ποσοστό θανάτων φτάνει το 25% όλων των θανάτων που προκλήθηκαν από καρκίνο (Jemal, et al., 2006). Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί έναν πολύ επιθετικό καρκίνο που μπορεί να διαγνωστεί μόνο σε προχωρημένο στάδιο όταν τα δύο τρίτα των περιπτώσεων συνδέονται με μετάσταση στους λεμφαδένες την στιγμή της διάγνωσης (Ihde, 1992). Η επιβίωση των ασθενών διαρκεί περίπου 5 χρόνια και εξαρτάται σημαντικά από το στάδιο εξέλιξης του πνευμονικού καρκίνου. Η διάγνωση των σε προχωρημένο στάδιο μειώνει στο 5% την επιβίωση των ασθενών στα 5 χρόνια, σε αντίθεση με την πρώιμη διάγνωση που αυξάνει το ποσοστό περίπου στο 60% (Mountain, 2002). Η ανεπαρκής διάγνωση, αλλά και η πρόγνωση, ασθενών

με καρκίνο του πνεύμονα μπορεί γενικά να αποδοθεί στην έλλειψη μεθόδων και ειδικών βιολογικών δεικτών για την πρόωμη διάγνωση σε συνδιασμό με την αδυναμία εφαρμογής θεραπειών σε προχωρημένα καρκινικά στάδια όπως η μετάσταση.

Ο παράγοντας που αποτελεί το σημαντικότερο αίτιο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα, αφού είναι υπεύθυνο για το 85% περίπου της συχνότητας εμφάνισης πνευμονικού καρκίνου. Η έκθεση σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες-καρκινογόνες ουσίες, όπως ο αμίαντος ή το ραδόνιο, και η επιρροή γενετικών παραγόντων συμβάλλουν μόλις κατά 15% στην ανάπτυξη πνευμονικών νεοπλασιών (Doll, 2000). Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι μεγαλύτερη στο ανδρικό φύλλο, αν και οι περιπτώσεις γυναικών-ασθενών αυξάνονται πολύ πιθανά λόγω της αυξανόμενης χρήσης του καπνού (Patel, et. al., 2004).

Ο ανθρώπινος καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει δύο ιστοπαθολογικούς τύπους, τον μη-μικροκυτταρικό (NSCLC) και τον μικροκυτταρικό (SCLC) καρκίνο του πνεύμονα. Περίπου το 80% όλων των πνευμονικών καρκίνων είναι μη-μικροκυτταρικού τύπου (NSCLC), ο οποίος χωρίζεται μορφολογικά σε: αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα, μεγαλοκυτταρικό καρκίνο και βρογχοκυψελιδικό καρκίνο. Το υπόλοιπο 20% καρκίνου του πνεύμονα είναι τύπου SCLC με ιδιότητες νευροενδοκρινών κυττάρων (Travis, 2002). Ωστόσο, η χειρουργική αντιμετώπιση και η ανταπόκριση των δύο κύριων τύπων καρκίνου του πνεύμονα στην θεραπεία μέσω χημειοθεραπείας ή/και ακτινοβολίας διαφέρει σημαντικά. Ο μικροκυτταρικός τύπος είναι πολύ πιο επιθετικός από τον μη-μικροκυτταρικό, δεν είναι χειρουργήσιμος και μόλις το 5% των ασθενών επιβιώνουν στα 5 χρόνια από την στιγμή της διάγνωσης (Worden & Kalemkerian, 2000).

Με δεδομένο ότι τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, έχει δοθεί μεγάλη βαρύτητα στην ανακάλυψη καρκινικών βιοδεικτών για πρόωμη διάγνωση καθώς και για εφαρμογή αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων για μείωση της θνησιμότητας. Επί του παρόντος, έχουν μελετηθεί γονιδιακές αλλαγές και διαφοροποιήσεις πρωτεϊνικών παραγόντων που σχετίζονται με την καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα (Sung & Cho, 2008). Οι πλέον σημαντικές αφορούν τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων 3, 9 και 16, την υπερέκφραση της hnRNP A2/B1, μεταλλάξεις των

γονιδίων p53 και ras καθώς και αλλαγές στην έκφραση της τελομεράσης (πίνακας 2, Hilbe, et.al., 2004). Ωστόσο, οι μέχρι τώρα διαθέσιμοι ή δυνητικοί καρκινικοί βιοδείκτες του πνεύμονα δεν εμφανίζουν επαρκή ευαισθησία και ειδικότητα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την πρόωμη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρασκευή ειδικών φαρμάκων για θεραπεία.

<i>Παράμετρος</i>	<i>Εκτίμηση βιοδεικτών</i>
3p-	κατάλληλος
9p- και p16	κατάλληλος
hnRNP A2/B1	κατάλληλος
CD44 v6	ικανοποιητικός
μεταλλάξεις p53	ικανοποιητικός
μεταλλάξεις ras	ικανοποιητικός
τελομεράση	ικανοποιητικός

**Πίνακας 2.** Σημαντικότεροι δυνητικοί βιοδείκτες καρκίνου του πνεύμονα. Εκτίμηση της αξίας των καρκινικών δεικτών (πίνακας προσαρμοσμένος από Hilbe, et.al., 2004).

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 και μάλιστα σε πρώιμα στάδια της καρκινικής εξαλλαγής του πνεύμονα (όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα A.3.1) θεωρείται επί του παρόντος ως ο πλέον υποσχόμενος νέος βιολογικός δείκτης. Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1, καθώς και των άλλων πρωτεϊνών hnRNP, παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Επιπλέον, δεν έχει εξεταστεί αν, λόγω της διασύνδεσης της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυτή η υπερέκφραση αποτελεί αίτιο ή αποτέλεσμα της ογκογένεσης. Η δυσκολία έγκαιρης πειραματικής επέμβασης στον άνθρωπο πριν από την κλινική διάγνωση, αλλά και η ιδιαίτερη αρχιτεκτονική του πνευμονικού ιστού που οφείλεται στην κυτταρική ποικιλομορφία και την άμεση αλληλεπίδραση του πνευμονικού επιθηλίου με το περιβάλλον αποτελούν επιπρόσθετους ανασταλτικούς παράγοντες. Για τον λόγο αυτό, στη μελέτη των μηχανισμών επαγωγής, καθιέρωσης και εξέλιξης του καρκινικού μετασχηματισμού των κυττάρων τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ευρέως πειραματικά πρότυπα καρκίνου του πνεύμονα τρωκτικών, και ιδιαίτερα ποντικών των οποίων είναι γνωστό πλέον το πλήρες γονιδιώμα τους και έχουν στενή γενετική και φυσιολογική συγγένεια με τον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, οι βιοχημικές, ιστολογικές και γενετικές ομοιότητες των πνευμονικών καρκίνων του ποντικού συγκριτικά με την πιο

συχνή μορφή καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο, το αδενοκαρκίνωμα, προσφέρουν έναν σημαντικό βαθμό αξιοπιστίας των πειραματικών μοντέλων καρκίνου του πνεύμονα (Meuwissen & Berns, 2005). Παρακάτω παρατίθενται οι βασικότεροι μηχανισμοί επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα σε πειραματικά πρότυπα ποντικού που εφαρμόζονται τα τελευταία χρόνια στον τομέα της πειραματικής ογκολογίας.

#### **A.3.4. Επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα σε ζωικά μοντέλα ποντικού**

Τα πειραματικά πρότυπα ποντικών έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα και προσφέρουν την δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης του καρκίνου, από το αρχικό στάδιο της υπερπλασίας ως το καρκίνωμα, προσφέροντας έτσι το πλεονέκτημα της ελεγχόμενης ανάπτυξης ενός καρκινώματος σε καθορισμένο κλινικό περιβάλλον. Επιπρόσθετα, επιτρέπουν την διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων και ολόκληρων γονιδιακών μονοπατιών για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην καρκινική εξαλλαγή.

Μία κατηγορία πειραματικών προτύπων καρκίνου του πνεύμονα είναι η αυθόρμητη ή χημικά επαγόμενη ανάπτυξη του καρκινικού μετασχηματισμού σε γενετικά αμιγή (inbred) αλλά και μη-αμιγή (outbred) στελέχη ποντικών διαφορετικής ευαισθησίας. Συγκεκριμένα, τα στελέχη ποντικών με υψηλή προδιάθεση εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στον χημικά επαγόμενο πνευμονικό καρκίνο, όπως το αμιγές στέλεχος A/J και το μη αμιγές στέλεχος CD1 (Tuveson & Jacks, 1999, Manenti, et. al., 2003). Το πιο γνωστό καρκινογόνο που χρησιμοποιείται για την επαγωγή όγκων στον πνεύμονα τρωκτικών είναι η ουρεθάνη, η οποία προκαλεί στοχευμένη καρκινική εξαλλαγή στον πνεύμονα ποντικού. Αποτελεί τον αιθυλιωμένο εστέρα του καρβαμικού οξέος ο οποίος παράγεται ως φυσικό προϊόν παρατεταμένης ζύμωσης τροφίμων και ποτών και έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερα από 60 χρόνια ως μοντέλο χημικής επαγωγής καρκινογένεσης στον πνεύμονα ποντικού. Χρησιμοποιήθηκε για την κατηγοριοποίηση αμιγών στελεχών με μεγάλη ευαισθησία, όπως είναι το στέλεχος A/J, ενδιάμεσης ευαισθησίας (όπως BALB/cByJ) και ανθεκτικά (C57BL/6J) στην ανάπτυξη νεοπλασιών του πνεύμονα με στόχο την διερεύνηση γονιδιακών προϊόντων σχετιζόμενων με την καρκινογένεση. Παρότι η



εμφάνιση αλλοιώσεων στον πνεύμονα εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του κάθε στελέχους, ωστόσο η πιθανότητα να συνεχίσει ή να υποχωρήσει η ανάπτυξη της βλάβης εξαρτάται και από το είδος του καρκινογόνου που χρησιμοποιείται για την επαγωγή της νεοπλασίας. (Nettleship, et. al., 1943, O'Donnell, et. al., 2005). Έτσι, η χορήγηση ουρεθάνης μπορεί να οδηγήσει, ανάλογα και με την ανθεκτικότητα του στελέχους, σε αδενώματα (καλοήθεις όγκους) ή να οδηγήσει σε αδενοκαρκινώματα κάτι που εξαρτάται και από το βαθμό μεταβολισμού του καρκινογόνου καθώς και τον βαθμό επιδιόρθωσης βλαβών στο κάθε στέλεχος (Avanzo, et. al., 2006, Malkinson, 1992, Titis & Forkert, 2001).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, περίπου το 85% των πνευμονικών καρκίνων στον άνθρωπο σχετίζεται με το κάπνισμα. Είναι γνωστό ότι ο καπνός του τσιγάρου περιέχει τουλάχιστον 55 καρκινογόνες ουσίες ικανές να προκαλέσουν καρκινώματα σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών, οι νιτροσαμίνες και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν τα πιο δραστικά καρκινογόνα του πνεύμονα και μπορούν να δράσουν είτε ως εναρκτήριοι παράγοντες είτε ως προαγωγοί της πνευμονικής καρκινογένεσης, σχηματίζοντας αδενώματα αλλά και αδενοκαρκινώματα (Hecht, 1999, Kim, & Lee, 1996, Abdel-Aziz, et. al., 2007).

Η επανάσταση στον χώρο της πειραματικής ογκολογίας ήρθε με την εφαρμογή των διαγονιδιακών συστημάτων στους ποντικούς. Η ενσωμάτωση γενετικών αλλοιώσεων, που συναντώνται στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, στα γαμετικά κύτταρα του ποντικού έχει οδηγήσει στην εμφάνιση όγκων στον πνεύμονα του ποντικού που προσομοιάζουν τους ανθρώπινους πνευμονικούς καρκίνους. Έχουν αναπτυχθεί διαγονιδιακά μοντέλα στα οποία επιτυγχάνεται η στοχευμένη, ιστοειδική τροποποίηση (υπερέκφραση/απενεργοποίηση) γονιδίων σχετιζόμενων με τον καρκίνο (όπως ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικούς παράγοντες, κλπ), σε ένα ειδικό υποσύνολο πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο να εξεταστεί ο ρόλος αυτών των ογκογονιδίων στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα. (Lewandoski, 2001, Meuwissen & Berns, 2005). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια K-Ras και p53, τα οποία έχουν τροποποιηθεί επιλεκτικά σε μοντέλα ποντικών σχηματίζοντας πνευμονικές αλλοιώσεις (Janssen, et. al., 2005, Meuwissen, et. al., 2003, Wang, et. al., 2006).

Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ενεργοποίηση του ογκογονιδίου K-Ras αποτελούν ένα σημαντικό πρώιμο συμβάν στον καρκίνο του πνεύμονα, ανιχνεύσιμο σε υπερπλαστικές αλλοιώσεις, ενώ απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 εμφανίζεται συχνά στο προχωρημένο στάδιο του αδενοκαρκινώματος, στον πνεύμονα ποντικών (Horigo, et. al., 1996). Παρόμοιες γενετικές αλλαγές συναντώνται και στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα (Meuwissen & Berns, 2005).

### **A.3.5. Έκφραση πρωτεϊνών RBP σε πειραματικά πρότυπα ποντικού**

Τα βιβλιογραφικά στοιχεία που αφορούν τα πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών RBP κατά την επαγωγή και εξέλιξη καρκίνου του πνεύμονα είναι επί του παρόντος περιορισμένα. Το έτος 2000, η ομάδα του Malkinson, μελέτησε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP D και HuR στον χημικά επαγόμενο, μέσω ουρεθάνης, καρκίνο του πνεύμονα ποντικών στελέχους A/J, καθώς και σε υπερπλαστικές αλλοιώσεις του πνεύμονα ποντικών BALB/c έπειτα από την χορήγηση του παράγοντα BHT (butylated-hydroxytoluene). Τα επίπεδα και των δύο αυτών πρωτεϊνών εμφάνισαν αύξηση στον νεοπλαστικό ιστό, σε άμεση συνάρτηση με το στάδιο ανάπτυξης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, *in vitro* και *in vivo* (Blaxall, et. al., 2000). Αργότερα, η ίδια ομάδα, έδειξε μια παράλληλη υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A1 και του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 σε υπερπλαστικές και νεοπλαστικές αλλοιώσεις του πνεύμονα ποντικών BALB/c συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό, έπειτα από την χορήγηση των παραγόντων BHT και MCA (methylcholanthrene) οι οποίοι σε συνδιασμό προκαλούν πνευμονικά καρκινώματα σε αυτό το στέλεχος (Malkinson, et. al., 1997). Υποστηρίζουν ότι η αύξηση αυτών των δύο ανταγωνιστικών, στο εναλλακτικό μάτισμα, πρωτεϊνών στον καρκίνο του πνεύμονα πιθανόν να συσχετίζεται με αλλαγές στις ισομορφές του mRNA του γονιδίου CD44 στο προχωρημένο στάδιο της μετάστασης (Zerbe, et. al., 2004). Λόγω της έλλειψης πληροφοριών σχετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών RBP στον καρκίνο του πνεύμονα του ποντικού είναι επιτακτική η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του φαινομένου σε πειραματικά πρότυπα καρκίνου του πνεύμονα, ώστε να μελετηθεί ο ενδεχόμενος και πολλά υποσχόμενος ρόλος τους κατά την σταδιοποίηση της καρκινικής εξαλλαγής του πνεύμονα.

#### **A.4 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Κεντρικός στόχος της διατριβής είναι ο βιοχημικός/μοριακός χαρακτηρισμός μίας ειδικής κατηγορίας πρωτεϊνών με ικανότητα να προσδέουν RNA (πρωτεΐνες RBP), και ειδικότερα το πρόδρομο και ώριμο mRNA, με σκοπό την διερεύνηση της συμμετοχής τους στην έναρξη και εξέλιξη της καρκινικής εξαλλαγής σε πειραματικά πρότυπα καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα αναμένεται να συγκριθούν άμεσα με πειραματικά δεδομένα που αφορούν τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα. Η δυνατότητα εφαρμογής και παρακολούθησης του καρκίνου του πνεύμονα σε πειραματικά πρότυπα χημικής καρκινογένεσης, σε συνδυασμό με την έλλειψη μελετών για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών RBP σε ζωικά μοντέλα αποτέλεσαν και τα κριτήρια επιλογής της παρούσας διατριβής.

Η μελέτη περιλαμβάνει πρωτεΐνες με διαφαινόμενη συμμετοχή στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα και ειδικότερα μέλη της οικογένειας των hnRNP τύπου A/B (A1, A2/B1, A3) καθώς και άλλες επιλεγμένες πρωτεΐνες RBP, κατά κύριο λόγο της HuR. Οι πειραματικές προσεγγίσεις στοχεύουν, αρχικά, στην συγκριτική ανάλυση των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A/B και HuR, σε κυτταρικά συστήματα τρωκτικών και ανθρώπου. Στη συνέχεια, επεκτείνονται στον προσδιορισμό της έκφρασης και ανάλυσης των προτύπων έκφρασής τους κατά την σταδιοποίηση καρκίνου του πνεύμονα στον ποντικό. Οι πειραματικές προσεγγίσεις που έχουν επιλεγεί (βιοχημικές, ανοσοχημικές και ανοσοϊστοχημικές) αναμένεται να δώσουν πληροφορίες αναφορικά με τυχόν τροποποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης των υπό διερεύνηση πρωτεϊνών, τους ισομορφικούς τύπους καθώς και την υποκυτταρική τους εντόπιση, γεγονότα που ενδεχομένως να συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με την έναρξη και εξέλιξη της καρκινικής εξαλλαγής στον πνεύμονα. Αρχικά, ως κύριο πειραματικό πρότυπο καρκίνου του πνεύμονα επελέγη το στέλεχος ποντικού A/J, γνωστό σύστημα χημικής επαγωγής μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα στα τρωκτικά (συνεργασία με Ε.ΚΕ.Β.Ε «Φλέμιγκ» στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ). Στη συνέχεια και λόγω τεχνικών δυσκολιών που ενέκυψαν στην πορεία του έργου, η μελέτη έχει επεκταθεί και σε αλλά στελέχη ποντικού, αλλά και επιλεγμένα κυτταρικά συστήματα που περιγράφονται στα Αποτελέσματα.

Στους στόχους της μελέτης είναι η εφαρμογή in vitro/in vivo δοκιμασιών για τον έλεγχο των βιολογικών συνεπειών της απορύθμισης στην έκφραση των hnRNP A/B

και HuR κατά τον καρκινικό μετασχηματισμό στον πνεύμονα. Επιδιώκεται η απομόνωση συμπλόκων hnRNP και mRNP από κατάλληλα κυτταρικά συστήματα, ο χαρακτηρισμός πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών hnRNP και HuR και ο τυχόν συσχετισμός με τα στάδια καρκινικής εξαλλαγής των κυττάρων.

## **Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

Όλες οι προς διερεύνηση κυτταρικές σειρές επωάζονται σε φιάλες καλλιέργειας (25 ή 75 cm<sup>2</sup>), στους 37<sup>0</sup>C παρουσία 5% CO<sub>2</sub>, σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά και στείρες συνθήκες. Τα κύτταρα συλλέγονται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους.

Οι κυτταρικές σειρές HeLa (ανθρώπινο καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας), A549 (ανθρώπινο αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα) και Novikoff (ηπάτωμα αρουραίου)

καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM, παρουσία 1% πενικιλίνης/στρεπτομικίνης και 10% ορού από αίμα νεογέννητου βόειου, FBS.

Τα κύτταρα MEF (εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού: πρωτογενή ή αθανатоποιημένα) καλλιεργούνται σε DMEM παρουσία 1% πενικιλίνης /στρεπτομικίνης και 15% απενεργοποιημένου FBS. Η απενεργοποίηση του ορού γίνεται με επώαση 30 λεπτών στους 57<sup>0</sup>C.

Οι κυτταρικές σειρές ποντικού CMT64/61 (καρκίνωμα πνεύμονα) και LA-4 (αδένωμα πνεύμονα) καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό Waymouth's MB 752/1 παρουσία 2mM γλουταμίνης, 1% πενικιλίνης / στρεπτομικίνης, 10% FBS και Ham's F12, 2mM γλουταμίνης, 1% πενικιλίνης / στρεπτομικίνης, 1% NEAA (Non essential amino acids) και 15% FBS, αντίστοιχα.

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται κυρίως μέσω θρυψινοποίησης (0,25% θρυψίνη σε PBS) αλλά και με απλή απόξυση από το υπόστρωμα αφού προηγουμένως τα κύτταρα έχουν πλυθεί δύο φορές με PBS. Μετά από 1 έως 5 λεπτά (ανάλογα τον κυτταρικό τύπο) η επώαση με θρυψίνη σταματάει με την προσθήκη θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 2000rpm. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση με την ειδική πλάκα Neupauer. Τα κύτταρα συλλέγονται σε ίζημα, πλένονται δύο φορές με PBS και είτε χρησιμοποιούνται αμέσως στην παρασκευή εκχυλισμάτων είτε φυλάσσονται στους -80<sup>0</sup>C για μετέπειτα χρήση.

### **B.1.1 Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών ποντικού με siRNA κατά του γονιδίου της πρωτεΐνης hnRNP A3**

Αποτελεί μια πειραματική διαδικασία μέσω της οποίας η έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου μειώνεται (knockdown) έπειτα από μερική ή/και ολική καταστολή του αντίστοιχου mRNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την διαμόλυνση κυττάρων με αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων μήκους περίπου 20-30 νουκλεοτιδίων (siRNAs: short interfering RNAs), συμπληρωματικές συγκεκριμένων τμημάτων του mRNA στόχου, εμποδίζοντας έτσι την έκφρασή του. Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε στα κύτταρα ποντικού LA-4, CMT64/61 και MEF με στόχο την μείωση της hnRNP A3. Η παροχή των siRNA και των υλικών επιμόλυνσης (lipofectamine

2000, Optimem) έγινε από τις εταιρίες Dharmacon και Invitrogen, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε μείγμα 4 ολιγονουκλεοτιδίων-στόχων του mRNA της hnRNP A3, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Dharmacon.

Μια μέρα πριν την επιμόλυνση, κατάλληλος αριθμός κυττάρων μεταφέρεται σε τρυβλία 6 πηγαδιών, σε συγκέντρωση  $7 \times 10^4$  /2 ml και σε πλήρες θρεπτικό υλικό, απουσία αντιβιοτικών, έτσι ώστε να βρίσκονται σε ποσοστό κάλυψης 30-40% την στιγμή της διαμόλυνσης. Για κάθε πειραματική διαδικασία, τα κυτταρικά δείγματα απλώνονται εις τριπλούν ώστε τα κύτταρα με το siRNA για την hnRNP A3 να είναι σε άμεση σύγκριση με κύτταρα με siRNA-control και με κύτταρα χωρίς καμία διαμόλυνση. Την επόμενη μέρα, γίνεται αλλαγή του υλικού με όγκο 1,5 ml και προστίθενται τα διαλύματα διαμόλυνσης τα οποία αποτελούνται από: α) 5-7μl lipofectamine, σε 250 ml θρεπτικό υλικό Optimem τελικό όγκο, για κάθε δείγμα siRNA και β) 5-10 μl siRNAs ( προϊόντα On-Targetplus smartpool siRNAs, Dharmacon), siRNAs για την hnRNP A3 ή siRNA- control, σε 250ml Optimem. Τα δείγματα α) και β) επωάζονται για 5 λεπτά, στη συνέχεια συνενώνονται, αναδεύονται προσεκτικά και επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, στο κάθε πηγάδι προστίθενται 500μl από κάθε σύμπλοκο siRNA-lipofectamine, ώστε σε τελικό όγκο 2ml η συγκέντρωση των siRNAs να αντιστοιχεί σε 50-100 nM. Έπειτα από 6 ή 24 ώρες, το υλικό που περιέχει τα siRNAs αφαιρείται και προστίθενται 2ml φρέσκου θρεπτικού υλικού, ή διαφορετικά στις 24 ώρες γίνεται δεύτερη διαμόλυνση. Τα κύτταρα συλλέγονται με θρυψίνη 72 ώρες μετά την πρώτη διαμόλυνση, μετρούνται και μαζεύονται σε μορφή ιζήματος για την βιοχημική ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της hnRNP A3.

## **B.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ**

Για την διεκπεραίωση των περισσότερων πειραματικών προσεγγίσεων χρησιμοποιήθηκαν τόσο ολικά όσο και πυρηνικά και κυταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, A549, Novikoff καθώς και κυττάρων MEF.

### **B.2.1. Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών**

Οι παρακάτω μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν για όλες τις προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές και βασίζονται στην γρήγορη λύση των κυττάρων σε ισοτονικό διάλυμα με την

βοήθεια υπερήχων. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και η όλη διαδικασία εκτελείται στους 0-4<sup>0</sup>C. Συγκεκριμένα:

I) Ίζημα κυττάρων σε συγκέντρωση 1-2x10<sup>7</sup> κύτταρα/ml επαναιωρείται σε διάλυμα NET-2 ( 10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,05% NP-40), παρουσία αναστολέων των πρωτεασών όπως PMSF σε συγκέντρωση 1mM , μείγμα αναστολέων των πρωτεασών [με ειδικότητα κατά της σερίνης, κυστεΐνης, των ασπαρτικών πρωτεασών και αμινοπεπτιδασών. Περιέχει: 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatinA, E-64, bestatin, leupeptin, and aprotinin] σε τελική αραιώση 1/100 (Sigma) καθώς και ο αναστολέας των φωσφατασών NaF σε συγκέντρωση 5mM. Ακολουθεί κυτταρική λύση με την επίδραση υπερήχων με 6 επαναλήψεις των 20 δευτερολέπτων στους 0<sup>0</sup>C και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 10.000rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται, καταψύχεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται μέχρι την χρήση του, στους -80<sup>0</sup>C.

II) Τα προς ανάλυση κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλύονται άμεσα σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer: 62.5mM tris-HCl pH .8, 2.3% SDS, 10% γλυκερίνη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης) και αναλύονται σε πηκτώματα SDS-PAGE ή φυλάσσονται μέχρι την χρήση τους στους -20<sup>0</sup>C.

### **B.2.2.Παρασκευή πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών**

I) Η διαδικασία στηρίζεται στη μέθοδο των Choi and Dreyfuss (1984). Αναλυτικότερα:

Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε διάλυμα A (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>) σε συγκέντρωση 5x10<sup>7</sup> κύτταρα/ml, παρουσία 0,5% triton για την αποσταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών και 1mM PMSF ως αναστολέα των πρωτεασών. Στη συνέχεια η λύση ολοκληρώνεται με ομογενοποίηση σε γυάλινο ομογενοποιητή Dounce με σφιχτό έμβολο (10 παλινδρομήσεις) και

φυγοκέντρωση του ομογενοποιημένου για 10λεπτά στις 4.000rpm. Το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό εκχύλισμα) καταψύχεται άμεσα σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια, επαναιωρείται σε διάλυμα A σε συγκέντρωση που ισοδυναμεί με  $\sim 2.5 \times 10^7$  κύτταρα/ml απουσία Triton και παρουσία 1mM PMSF και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (Sigma). Ακολουθεί επίδραση υπερήχων, 2 επαναλήψεις των 5 λεπτών, το εκχύλισμα επιστρέφεται σε διάλυμα A με 30% σακχαρόζη και φυγοκεντρείται για 15λεπτά στις 5.000rpm. Το πυρηνικό εκχύλισμα που αποτελείται από τα διαλυτά συστατικά, συλλέγεται από την άνω στιβάδα της σακχαρόζης, καταψύχεται και φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Το ίζημα που αποτελείται από πυρηνικά κατάλοιπα, όπως χρωματίνη, μεμβρανικά συστατικά και πυρηνίσκοι, μπορεί να επανεκχυλιστεί και να δώσει επί μέρους κλάσματα του πυρήνα, ως ακολούθως: Το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα NET-2 υψηλής αλατότητας (10mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,1% triton) σε συγκέντρωση που ισοδυναμεί με  $\sim 3,3 \times 10^8$  κύτταρα/ml, με προσθήκη 1mM PMSF και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών και στη συνέχεια ακολουθεί επίδραση υπερήχων 2 επαναλήψεις των 5 λεπτών. Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 5λεπτά στις 13000rpm, συλλέγεται το υπερκείμενο και φυλάσσεται ως το κλάσμα S1 εμπλουτισμένο σε συστατικά του πυρηνικού σκελετού. Ακολουθεί επανεκχύλιση του τελικού ιζήματος σε συγκέντρωση ισοδύναμη με  $3,3 \times 10^8$  κύτταρα/ml κάτω από τις ίδιες συνθήκες παρασκευής του κλάσματος S1 και επίδραση υπερήχων. Μετά την προσθήκη RNase A (0.1mg/ml) ή DNase (0.4mg/ml) και επώαση στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5λεπτά στις 13000rpm. Τα υπερκείμενα συλλέγονται ως κλάσματα εμπλουτισμένα σε συστατικά που απελευθερώνονται από την χρωματίνη μετά την αποικοδόμηση του DNA (κλάσμα S2D) ή του RNA (κλάσμα S2R).

**II)** Το πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εκχύλισμα παρασκευάζεται με την χρήση του kit NE-PER της Pierce. Όλα τα στάδια γίνονται στους  $0-4^{\circ}\text{C}$ , σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

Συνοπτικά, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα CER I σε όγκο  $10^7$  κύτταρα/ml, με προσθήκη μείγματος αναστολέων των πρωτεασών, ακολουθεί ανάδευση με vortex σε υψηλή ταχύτητα για 15 δευτερόλεπτα για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και το εκχύλισμα παραμένει στον πάγο για 10 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται όγκος 55μl διαλύματος CER II, γίνεται ανάδευση με vortex για 5



δευτερόλεπτα, επώαση για 1 λεπτό στον πάγο, νέα ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στα 16.000g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης συλλέγεται ως το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και φυλλάσσεται μέχρι την χρήση του ενώ ίζημα των πυρήνων επαναιωρείται σε διάλυμα NER ( $10^7$  κύτταρα/500μl) με προσθήκη μείγματος αναστολέων των πρωτεασών (Sigma). Ακολουθούν τέσσερις κύκλοι ανάδευσης 15 δευτερολέπτων και επώασης για 10 λεπτά στον πάγο, φυγοκέντρηση στα 16.000g για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου ως το πυρηνικό κλάσμα. Μέχρι την χρήση τους τα εκχυλίσματα φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **B.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

#### **B.3.1 Ολικό εκχύλισμα ιστών ποντικού στελέχους CD1 .**

Τα ζώα (ηλικίας  $3^{1/2}$  μηνών) θανατώνονται κάτω από αναισθησία με αιθέρα. Οι ιστοί που αφαιρούνται για αυτή την διαδικασία είναι: σπλήνα, πνεύμονας, συκώτι, νεφρά, εγκέφαλος και καρδιά. Όλα τα στάδια που ακολουθούν γίνονται σε θερμοκρασία  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

Αρχικά, ο κάθε ιστός ζυγίζεται, αποκόπτεται τμήμα 100mg το οποίο τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια και διαλυτοποιείται σε όγκο 1ml διαλύματος λύσης (lysis buffer: 9.5M ουρία, 2% NP-40, 5% μερκαπτοαιθανόλη). Για πλήρη διαλυτοποίηση του ιστού, το ομογενοποίηση αναδεύεται με διαδοχικές αναρροφήσεις και vortex, ακολουθεί επίδραση με υπερήχους των 2 επαναλήψεων για 5 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο (ολικό εκχύλισμα ιστού) συλλέγεται και φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **B.3.2 Διαλυτά και μη διαλυτά κλάσματα πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους CD1 και A/J.**

Για την παρασκευή διαλυτών και μη διαλυτών κλασμάτων από ιστό πνεύμονα ποντικού εφαρμόστηκε η μέθοδος των Zerbe et al (2004). Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται στους  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

Αρχικά ο πνευμονικός ιστός ζυγίζεται και 50 mg ιστού κόβεται σε μικρά κομμάτια και διαλυτοποιείται σε 1ml διαλύματος ομογενοποίησης (20mM Hepes pH 7.5, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 10% γλυκερόλη) με προσθήκη 1mM DTT και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών. Ακολουθεί ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή Dounce με σφιχτό έμβολο και φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου για περίπου 2 λεπτά στις 4.000rpm για να αφαιρεθούν αδιάλυτα μέρη του ιστού. Το υπερκείμενο συλλέγεται, φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 13.000 rpm και το νέο υπερκείμενο συλλέγεται ως το διαλυτό κλάσμα, το οποίο μαζί με το ίζημα (μη διαλυτό κλάσμα) καταψύχεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως την χρήση τους.

## **B.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

### **B.4.1 Απομόνωση RNA από διαλυτά κλάσματα πνευμονικού ιστού ποντικού στελέχους A/J**

Η διαδικασία περιγράφεται στο βιβλίο Sambrook et al (1989). Κατά την εκχύλιση του ιστού με φαινόλη το RNA διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες με βάση τις διαφορετικές ιδιότητες των μακρομορίων. Γενικώς η απομόνωση ακέραιου RNA και η περαιτέρω μελέτη του απαιτεί αυστηρές πειραματικές συνθήκες (π.χ. αποστείρωση υλικών, προσθήκη αναστολέων των RNασών, ισχυρά αποδιατακτικά).

Στο διαλυτό κλάσμα προστίθεται αρχικά ίσος όγκος USTN ( 7M ουρία, 1% SDS, 0,1M Tris-HCl pH 7.9, 400mM NaCl) για την αποδιάταξη των μακρομορίων και την διάσπαση των μεταξύ τους δεσμών. Ακολουθεί προσθήκη ενός όγκου φαινόλης (κορεσμένη με Tris-HCl pH 8.0) και καλή ανάμειξη με vortex ( 30-60 δευτερόλεπτα) μέχρι τον σχηματισμό γαλακτώματος. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 5-10 λεπτά στις 13.000 rpm (σε θερμοκρασία δωματίου) ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων, δηλαδή της φαινολικής φάσης που περιέχει τις πρωτεΐνες και της υδατικής που περιέχει μόρια RNA και DNA. Η υδατική φάση εκχυλίζεται εκ νέου με έναν όγκο διαλύματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), ανακινείται καλά με vortex, φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως και συλλέγεται η υδατική φάση που περιέχει καθαρά νουκλεϊκά οξέα.

#### **B.4.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων**

Η κατακρήμνιση βασίζεται στην ικανότητα που έχουν οι οργανικοί διαλύτες να συναγωνίζονται τα μόρια του νερού για την πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη ή το νουκλεϊκό οξύ, ελλατώνοντας με αυτόν τον τρόπο την διαλυτότητά τους.

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε διάλυμα κατακρημνίζονται με προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA) σε τελική συγκέντρωση 10%. Γίνεται καλή ανάδευση με vortex, παραμονή στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm, στους 4°C. Τέλος, το ίζημα πλένεται δύο φορές με 75% παγωμένη στους -20°C αιθανόλη, στεγνώνει στον αέρα και διαλύεται σε κατάλληλο διάλυμα για ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό.

Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται από ένα διάλυμα με την προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος οξικού νατρίου 3M (NaOAc) pH 5.2 και 2.5 όγκων 100% παγωμένη αιθανόλη, με καλή ανάδευση. Το δείγμα μένει για τουλάχιστον 2 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C. Το ίζημα πλένεται δύο φορές με 75% παγωμένη αιθανόλη, στεγνώνει στον αέρα και επαναδιαλύεται σε d.d.H<sub>2</sub>O ή σε διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA).

#### **B.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.**

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε διάλυμα γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο του Bradford (1976) και με την προσθήκη χρωστικής (BioRad). Συγκεκριμένα:

Ετοιμάζονται αραιώσεις τόσο των υπό εξέταση δειγμάτων όσο και ενός πρότυπου δείγματος (BSA) γνωστής συγκέντρωσης, με d.d.H<sub>2</sub>O νερό και σε τελικό όγκο 800μl. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl συμπυκνωμένης χρωστικής (BioRad) και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας (OD) στα 595nm, στο φωτόμετρο. Η

συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη της πρωτεΐνης BSA.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων γίνεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του δείγματος στα 260nm. OD=1 ισοδυναμεί με 50μg/ml δίκλωνου DNA, 40μg/ml μονόκλωνου DNA ή RNA και με 33μg/ml ολιγονουκλεοτιδίου. Η καθαρότητα ενός νουκλεϊνικού οξέος σε ένα διάλυμα υπολογίζεται από τον λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$  ο οποίος πρέπει να είναι >1.8 για καθαρό DNA και >2 για καθαρό RNA.

Προκειμένου να απομονωθεί καθαρό RNA και να απομακρυνθούν προσμείξεις DNA, στο διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων γίνεται προσθήκη 4 όγκων διαλύματος TE,  $MgCl_2$  10mM, DTT 0,01mM και DNάσης (2u/μl, TAKARA). Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C προστίθεται EDTA 100mM, SDS 0,2% καθώς και ένας όγκος φαινόλης:χλωροφορμίου [1:1 (v/v)]. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm (σε θερμοκρασία δωματίου) και το RNA κατακρημνίζεται από την υδατική φάση όπως περιγράφεται παραπάνω.

## **B.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Η ηλεκτροφόρηση ορίζεται ως η μετακίνηση ενός σωματιδίου που διαθέτει φορτίο πάνω σε κατάλληλο υλικό υποστήριξης, μέσω ηλεκτρικού ρεύματος. Η μετακίνηση εξαρτάται τόσο από τη φύση του δείγματος που ηλεκτροφορείται (φορτίο, μέγεθος και σχήμα), όσο και από το είδος του υλικού υποστήριξης, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Ανάλογα με το είδος του μορίου που αναλύεται (DNA, RNA ή πρωτεΐνες) και τις ιδιότητές του βάση των οποίων θα αναλυθεί (MB, pI, pH), χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές ηλεκτροφόρησης.

### **B.5.1. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμίδης (SDS/PAGE)**

Η μέθοδος στηρίζεται στο ασυνεχές σύστημα του Laemmli (1970), βάση του οποίου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος σε συνθήκες

αποδιάταξης, παρουσία του ισχυρού ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο).

Τα προς ανάλυση πρωτεϊνικά δείγματα διαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer: Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% γλυκερίνη, 5% μερκαπτοαιθανόλη, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης) και επωάζονται για 10 λεπτά στους 95°C. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμίδης, το οποίο αποτελείται από δύο επιστρώσεις διαφορετικής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης [ ακρυλαμίδη:δισακρυλαμίδη 29:1 (w/w)] και από διαφορετικό pH. Τα δείγματα φορτώνονται στο άνω πήκτωμα [stacking gel: 125mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (w/v) ακρυλαμίδη, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0.1% (v/v) TEMED], όπου επιτυγχάνεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μία πολύ λεπτή στιβάδα και στη συνέχεια εισέρχονται στο κάτω πήκτωμα [separating gel: 375mM Tris-HCl pH 8.8, X% ακρυλαμίδη, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS και 0.1% (v/v) TEMED], όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Τα πήκτωμα διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία περιέχουν 10% ακρυλαμίδιο (w/v).

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (400mM γλυκίνη, 50mM Tris-HCl pH 8.9, 0.1% SDS) υπό σταθερή τάση 150-160 volts. Οι πρωτεΐνες, λόγω της δέσμευσης SDS, φορτίζονται αρνητικά, με αποτέλεσμα να κινούνται προς την άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση λήγει όταν η χρωστική κυανού της βρωμοφαινόλης φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant blue [0.25% (w/v)] με διάλυμα μονιμοποίησης [50% (v/v) μεθανόλη-10% οξικό οξύ] για 20-30 λεπτά και αποχρωματίζεται σε διάλυμα αιθανόλης/οξικού νατρίου [25% (v/v)/10% (v/v)]. Εναλλακτικά, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί στο πήκτωμα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **B.5.2 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων 2D του τύπου NEPHGE/SDS-PAGE αποτελεί πειραματική τροποποίηση της βασικής μεθόδου ηλεκτροφόρησης 2-D της

ισοηλεκτρικής εστίασης (isoelectric focusing) των O' Farrell et. al., 1975 και έχει περιγραφεί αναλυτικά από τους O' Farrell et. al., 1977. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί των διαχωρισμό πρωτεϊνών με αρνητικό φορτίο (βασικές πρωτεΐνες έναντι των όξινων πρωτεϊνών) και έχει εφαρμοστεί επιτυχώς στις πρωτεΐνες hnRNP (Dreyfuss et.al., 1993). Στο πρώτο στάδιο (1<sup>η</sup> διάσταση), οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους, μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πήκτωμα ουρίας/πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες μη εξισορροπημένης διαβάθμισης pH (non-equilibrium pH gel: NEPHGE). Στο δεύτερο στάδιο (2<sup>η</sup> διάσταση) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται περαιτέρω με βάση το μοριακό βάρος (SDS/PAGE).

Τα προς ανάλυση δείγματα πρωτεϊνών σε μορφή ιζήματος, μετά από κατακρήμνιση με TCA, επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο (10μl) διαλύματος λύσης (lysis buffer: 9.5M ουρία, 2% NP-40, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 5% αμφολύτες pH 3-10) και στη συνέχεια μεταφέρονται σε τριχοειδή κυλινδρικά σωληνάρια που περιέχουν το πήκτωμα κλίσης pH της 1<sup>ης</sup> διάστασης (9M ουρία, 2% NP-40, 2% αμφολύτες pH 3-10, 3.9% πολυακρυλαμιδίου, 0.02% APS, 0.14% TEMED). Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτοφορούνται υπό σταθερή τάση 400 volts για 2.5 ώρες με διάλυμα ανόδου 10mM φωσφορικό οξύ και διάλυμα καθόδου 20mM καυστικό νάτριο και αναστροφή των πόλων των ηλεκτροδίων. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο που διαθέτουν, στην κλίση pH που έχει δημιουργηθεί στο πήκτωμα λόγω των αμφολυτών. Το εύρος του pH προσδιορίζεται βάση ενός παράλληλου πηκτώματος το οποίο τεμαχίζεται σε τμήματα μήκους 0.5 εκατοστών και προσμετράται το pH με την προσθήκη 2ml H<sub>2</sub>O.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης, το κυλινδρικό πήκτωμα εξισορροπείται σε διάλυμα φόρτωσης SDS sample buffer για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν την εφαρμογή της 2<sup>ης</sup> διάστασης SDS/PAGE, όπως περιγράφεται παραπάνω.

### **B.5.3 Μεταφορά πρωτεϊνών ( Western Transfer)**

Η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από ένα πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fritz et al. (1984).

Το πήκτωμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς (Biorad) σε άμεση επαφή με φύλλο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (25mM Tris-HCl pH 8.9, 162mM γλυκίνη, 205 μεθανόλη). Η μεμβράνη τοποθετείται προς την άνοδο και η μεταφορά γίνεται στο παραπάνω διάλυμα στους 4<sup>0</sup>C υπό σταθερή ένταση 300mA για 1.5 ώρες. Με το τέλος της μεταφοράς, οι πρωτεϊνικές ζώνες εντοπίζονται με σύντομη αντιστρεπτή χρώση της μεμβράνης σε διάλυμα της χρωστικής Ponceau-S (0.2% σε 3% TCA). Ο αποχρωματισμός γίνεται με έκπλυση με νερό.

#### **B.5.4 RT-PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης**

**RT:** Διαδικασία κατά την οποία τα μόρια RNA μετατρέπονται σε μόρια μονόκλωνου DNA (cDNAs) μέσω αντίστροφης μεταγραφάσης (RT).

Η αρχική αντίδραση περιλαμβάνει το προς ανάλυση δείγμα RNA σε ειδικό σωληνάριο τύπου erpendolf όπου προστίθενται dNTPs (0,25mM, το καθένα), εκκινητές oligodT (15) 2,5pmol σε τελικό όγκο 12μl. Μετά από επώαση για 5 λεπτά στους 65<sup>0</sup>C, το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο και προστίθενται τα αντιδραστήρια: 5 x RT διάλυμα, 10mM DTT, αναστολείς (Human placental ribonuclease inhibitor, 40u/μl), RT SII (superscript II reverse transcriptase, 200u/μl - Invitrogen) και τελικό όγκο 20μl d.d.H<sub>2</sub>O. Το δείγμα επωάζεται για 50 λεπτά στους 42<sup>0</sup>C και στη συνέχεια 15 λεπτά στους 70<sup>0</sup>C για την απενεργοποίηση της αντίδρασης. Τα cDNAs δείγματα που προκύπτουν αποθηκεύονται στους -20<sup>0</sup>C.

**PCR:** Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (cDNAs ή γενομικό DNA). Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών (περίπου 22 νουκλεοτιδίων έκαστο) συμπληρωματικών για το τμήμα του DNA, με αντίστροφη κατεύθυνση (forward/reverse primers). Τα ζεύγη των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητήρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν για την ανίχνευση των mRNAs των πρωτεϊνών που παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα:

mRNAs πρωτεϊνών	Ζεύγη εκκινητών
--------------------	-----------------

hnRNP A1	5' ACTGTGAATGGCCACAACACTG 3' 5' TGCCATAGCTACTGCTGCTG 3'
hnRNP A2/B1	5' GAGTCCGGTTCGTGTTCGTC 3' 5' TGGCAGCATCAACCTCAGC 3'
CD-44	5' ACCCCAGAAGGCTACATTTTGC 3' 5' CTCATAGGACCAGAAGTTGTGG 3'
GAPDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Στο ειδικό σωληνάριο (τύπου eppendorf) γίνεται ανάμειξη των ακόλουθων αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl: μg cDNA που πρόκειται να ενισχυθεί, 1pmol από κάθε εκκινητή (Ίδρυμα τεχνολογίας και έρευνας, εργαστήριο Βιοχημείας-Ηράκλειο Κρήτης), 1xPCR διάλυμα (χωρίς MgCl<sub>2</sub>, invitrogen), για την Taq πολυμεράση, 0.25mM για το καθένα από τα dNTPs και 1.5mM MgCl<sub>2</sub>. Με την προσθήκη της Taq πολυμεράσης ξεκινά η αντίδραση PCR. Αρχικά γίνεται ένας κύκλος 10 λεπτών στους 94<sup>0</sup>C για αρχική αποδιάταξη του cDNA. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 30-35 κύκλοι και σε κάθε κύκλο το δείγμα επωάζεται (σε αυτόματη συσκευή PCR) ως εξής: 1 λεπτό στους 94<sup>0</sup>C για αποδιάταξη του DNA, 45 δεύτερα στους 60<sup>0</sup>C για επανασύνδεση (για την δέσμευση των εκκινητών στις αλληλουχίες- στόχους) και 1 λεπτό στους 72<sup>0</sup>C για επιμήκυνση της επιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Τέλος, γίνεται ένας τελικός κύκλος στους 72<sup>0</sup>C για 10 λεπτά. Ακολουθεί η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης σε διάλυμα 0.5 x TBE (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA pH8.0), προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, για περίπου 1<sup>1/2</sup> ώρα, στα 120 volts.

## **B.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBPs**

### **B.6.1 Απομόνωση πρωτεϊνών RBP μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με μονόκλωνο DNA (ssDNA)**



Η μέθοδος βασίζεται στην γενική ιδιότητα πολλών πρωτεϊνών RBP να προσδέουν RNA καθώς και μονόκλωνο DNA. Η απομόνωση επιταχύνεται μέσω σφαιριδίων κυτταρίνης σε ομοιοπολικά προσδεμένο μονόκλωνο DNA. Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται στους 0-4<sup>0</sup>C, και έχουν ως ακολούθως:

### 1) Προετοιμασία κυτταρίνης-ssDNA

10mg κυτταρίνης-ssDNA (για πρωτεϊνικό εκχύλισμα 1x10<sup>7</sup> κύτταρα) αναμειγνύονται με 1ml διαλύματος BP-100 (50mM Na-phosphate pH 7.4, 100mM NaCl) και παραμένουν με αργή ανάδευση για 12 ώρες στους 4<sup>0</sup>C. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με το ίδιο διάλυμα και μένουν στον πάγο μέχρι την ανάμειξη με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα.

### 2) Πέψη κυτταρικού εκχυλίσματος με μικροκοκκική νουκλεάση

Στο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 1x10<sup>7</sup> κύτταρα ή από ομογενοποίημα πνεύμονα ποντικού (~0.9 mg συνολικής πρωτεΐνης) προστίθεται 0.5mM PMSF, 0,01% μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (sigma) και 1mM CaCl<sub>2</sub> και ακολουθεί επώαση με νουκλεάση (2u micrococcal nuclease/ml) για 25 λεπτά στους 30<sup>0</sup>C. Η πέψη αναστέλλεται με την προσθήκη 5mM EGTA, το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.000rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο.

### 3) Πρόσδεση πρωτεϊνών RBP στα σφαιρίδια κυτταρίνης-ssDNA

Ακολουθεί προσθήκη του υπερκειμένου στα σφαιρίδια κυτταρίνης-ssDNA και επώαση για 30 λεπτά, με αργή ανάδευση, στους 4<sup>0</sup>C. Μετά από φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 6000rpm, το υπερκείμενο συλλέγεται ως το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν έχει προσδεθεί στο ssDNA, ενώ τα σφαιρίδια ssDNA με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες πλένονται 5 φορές με το διάλυμα BP-100, με ενδιάμεση αργή ανάδευση 5 λεπτών. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών ακολουθεί με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης (sample buffer για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE) ή διάλυμα λύσης (lysis buffer για ηλεκτροφόρηση NEPHGE/SDS-PAGE).

## **B.6.2 Πειράματα καταβύθισης με χρήση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών**

Η μέθοδος είναι συμπληρωματική της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, *in vitro*. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η ικανότητα ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών hnRNP A/B να διασυνδεθούν με άλλες πρωτεΐνες RBP που εμπεριέχονται σε κυτταρικά εκχυλίσματα.

Χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης με ομοιοπολικά προσδεδεμένα μόρια γλουταθιόνης, τα οποία ως γνωστό έχουν μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη GST. Οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες, που είχαν παραχθεί σε *E.coli* στο εργαστήριο, περιλαμβάνουν: α) την πρωτεΐνη GST, β) την καρβοξυτελική περιοχή της hnRNP A3 με γνωστή συμμετοχή σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και γ) το συνολικό τμήμα της πρωτεΐνης hnRNP A2. Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται στους 0-4°C, και έχουν ως ακολούθως:

#### 1) Προετοιμασία εκχυλίσματος

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και MEF. Το προς ανάλυση κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα NET-2/150mM με προσθήκη PMSF και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών. Ανάλογα με τις συνθήκες που εφαρμόζονται στην κάθε πειραματική διαδικασία, το εκχύλισμα επωάζεται με RNάση για 15 λεπτά στους 30°C (50μg/ml εκχυλίσματος). Ακολουθεί προεπάση του εκχυλίσματος με σφαιρίδια γλουταθιόνης για 30 λεπτά στους 4°C με ανάδευση, για την απομάκρυνση πρωτεϊνών με μη ειδική πρόσδεση, και το υλικό είναι έτοιμο για την διαδικασία κατακρήμνισης.

#### 2) Σχηματισμός του συμπλόκου

Ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες δεμένες σε GST, καθώς και σφαιρίδια GST. Όλα τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με διάλυμα NET-2/150mM και φυλλάσσονται στον πάγο εώς την χρήση τους.

Το προς ανάλυση εκχύλισμα επωάζεται με τις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες hnRNPA3 και hnRNPA2 και για 1<sup>1/2</sup> ώρα στους 4°C, με αργή ανάδευση. Παράλληλα γίνεται και επώαση με σφαιρίδια GST για τον έλεγχο της μη ειδικής πρόσδεσης πρωτεϊνών. Το

πρωτεϊνικό σύμπλοκο απομονώνεται με σύντομη φυγοκέντρηση και πλένεται 5 φορές με διάλυμα NET-2/150mM ή αρχικά 2 φορές με διάλυμα NET-2/300mM και 3 φορές με NET-2/150mM εφόσον χρειάζεται ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου να γίνει ως προς την σταθερότητα της διασύνδεσης. Τέλος, στο ίζημα προστίθεται απευθείας διάλυμα φόρτωσης (sample buffer για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση.

## B.7 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι κυρίως εμπορικά (προέρχονται από τις εταιρίες Sigma, Santa Cruz και Abcam). Εξαιρεση αποτελεί το αντίσωμα της πρωτεΐνης hnRNPA3 που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο σε κουνέλια και στοχεύει το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα:

Πρωτεΐνες	Αντισώματα
hnRNP A1	4B10 (mo Ab, S.Cruz)
hnRNP A2/B1	1.DP3B3 (mo, S.Cruz) 2.Πολύκλωνο Ab εργαστηριακής παραγωγής (σε κουνέλια)
hnRNP B1	Πολύκλωνο Ab εργαστηριακής παραγωγής (σε κουνέλια)
hnRNP A3	1.50949 (rab, Abcam) 2.Πολύκλωνο Ab εργαστηριακής παραγωγής (σε κουνέλια)
hnRNP C1/C2	1.4F4 (mo, S.Cruz) 2.H-105 (rab, abcam)
hnRNP D/AUF1	50692 (rab, Abcam)
hnRNP L	4D11 (mo, S.Cruz)

hnRNP M	1D8, 2A6 (mo Abs, S.Cruz)
hnRNP U	Προσφορά S.Pinol-Roma (New York)
U1-70K	Προσφορά R.Lürhmann (Gottingen)
U2B''	Προσφορά van Venrooij (Nijmegen)
HuR	3A2 (mo Ab, S.Cruz)
TIA-1	C-20 (goat, S.Cruz)
$\beta$ -actin	1501 (mo, Chemicon)
$\alpha$ -tubulin	TU-02 (mo, S.Cruz)

### B.7.1 Ανοσοστύπωση (immunoblotting)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγνώριση, μέσω αντισώματος, μιας αντιγονικής ως πρωτεΐνης, μετά την αποδιάταξη και ακινητοποίησή της σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot) και περιγράφεται από τους Fritz et al.(1984). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη-στόχος αναγνωρίζεται από το ειδικό αντίσωμα, το οποίο με την σειρά του αντιδρά με ένα δεύτερο αντίσωμα ειδικό για την κατηγορία ανοσοσφαιρινών (Ig) του πρώτου αντισώματος (ζώο παραγωγής και τύπος Ig), συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (horseradish peroxidase). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης κατά την οποία παράγεται χημειοφωταύγεια (ECL, Amersham) με το κατάλληλο υπόστρωμα. Όλα τα στάδια της ανοσοστύπωσης πραγματοποιούνται υπό συνεχή ανακίνηση και έχουν ως εξής:

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών κατά Western και την χρώση με Ponceau S, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αποχρωματίζεται με διάλυμα TBS (50mM Tris-HCl pH 7.4, 200mM NaCl) και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα 3M ουρίας, 100mM MgCl<sub>2</sub> για 10 λεπτά, για την μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθεί επώαση 2 φορές για 10 λεπτά σε διάλυμα Zeller [10mM tris-HCl pH 7.4, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 5% (v/v) αποβουτυρωμένο συμπυκνωμένο γάλα, 0,5% tween 20, 0,1% (v/v) Triton X-100] για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη και την μείωση μη ειδικού σήματος (background). Η μεμβράνη στη συνέχεια επώαζεται για 2

ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ή όλη τη νύχτα στους 4<sup>0</sup>C, με το ειδικό, για την αντιγονική πρωτεΐνη, αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα Zeller. Η αραιώση του κάθε αντισώματος ποικίλει ανάλογα με τον τίτλο του και κυμαίνεται από 1:100 έως 1:4.000 (v/v). Ακολουθούν δύο πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα Zeller και επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρα με το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, σε αραιώση που κυμαίνεται από 1:2000 έως 1:20.000, σε διάλυμα Zeller. Η μεμβράνη πλένεται 2 φορές και για 10 λεπτά με διάλυμα Zeller και για τους ίδιους χρόνους με διάλυμα 1xTBS. Ακολουθεί ανίχνευση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος με το ειδικό kit ECL και αποτύπωση σε φιλμ ακτινογραφίας (X-ray).

### **B.7.2 Ανοσοκατακρήμνιση**

Η ανοσοκατακρήμνιση βασίζεται στην ικανότητα που μπορεί να διαθέτει ένα αντίσωμα να αναγνωρίσει το αντιγόνο του στην κατά το δυνατόν φυσική του κατάσταση στο κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται με την επώαση κυτταρικών εκχυλισμάτων με το υπό εξέταση αντίσωμα και την ακόλουθη απομάκρυνση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος, μαζί με τα συνδεδεμένα στο αντιγόνο άλλα μακρομόρια (RNA, πρωτεΐνες). Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Petterson et al. (1984) και Guialis et al. (1991). Στηρίζεται στην χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης με ομοιοπολικά προσδεδεμένη την πρωτεΐνη A ή μείγμα πρωτεΐνης A και G, από το σταφυλόκοκκο *Saphylococcus aureus* (Kesler, 1975, 1981). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με τις περισσότερες κατηγορίες αντισωμάτων τύπου IgG στην σταθερή περιοχή της βαριάς αλυσίδας, Fc. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια της μεθόδου.

#### 1) Πρόσδεση αντισώματος σε σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A ή μείγμα πρωτεϊνών A-G

Για το στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται ως στερεή φάση σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης A (protein A-Sepharose, Sigma) ή μείγμα πρωτεϊνών A και G (Amersham), ανάλογα με την συγγένεια και το είδος των αντισωμάτων (IgG1, IgG2a κλπ). Αρχικά, τα σφαιρίδια σεφαρόζης (3-5 mg/αντίδραση) επωάζονται για 20 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C σε διάλυμα NET-2 με συνεχή αργή ανάδευση, το ίζημα πλένεται 3 φορές

με NET-2/150mM και ακολουθεί η διασύνδεση των αντισωμάτων ( 1-5μg/assay) στις πρωτεΐνες A και G, αντίστοιχα, σε 500μl διαλύματος NET-2/150mM. Η επώαση γίνεται για 12 ώρες στους 4<sup>0</sup>C υπό συνεχή ανακίνηση. Το σύμπλοκο A/G-σεφαρόζη-αντίσωμα απομονώνεται με σύντομη φυγοκέντρηση και πλύσιμο 3 φορές με διάλυμα NET-2.

## 2) Προετοιμασία του αντιγόνου

Για τις ανοσοκατακρήμνισεις που εκτελέστηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τόσο ολικά (κύτταρα A549 και Novikoff) όσο και πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχύλισμα (κύτταρα A549, HeLa και MEF), καθώς και επιμέρους πυρηνικά υποκλάσματα ( S1, S2R και S2D, κυττάρων A549). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στους 4<sup>0</sup>C. Ανάλογα με τις συνθήκες που εφαρμόζονται στην κάθε πειραματική διαδικασία, το εκχύλισμα προ-επωάζεται με RNάση A για 15 λεπτά στους 30<sup>0</sup>C (50μg/ml εκχυλίσματος), προκειμένου να χαρακτηριστεί η διαμεσολάβηση ή μη στην διασύνδεση των πρωτεϊνών στο ανοσοσύμπλοκο. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα προ-επωάζεται για 30 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C (με ανάδευση) με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεϊνών A/G προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες με μη ειδική πρόσδεση στα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια απομακρύνονται από το εκχύλισμα με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000rpm στους 4<sup>0</sup>C και το υλικό είναι έτοιμο για την διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης.

## 3) Σχηματισμός και καθαρισμός του ανοσοσυμπλόκου

Μετά από την επώαση με τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A/G, το εκχύλισμα συνενώνεται με το σύμπλοκο πρωτεΐνης A/G- σεφαρόζης- αντισώματος και επωάζεται 1½ ώρες στους 4<sup>0</sup>C υπό ήπια ανάδευση. Παράλληλα γίνεται και επώαση σφαιριδίων πρωτεΐνης A/G απουσία αντισώματος ή με πρόσδεση μη ειδικών αντισωμάτων, για τον έλεγχο μη ειδικής πρόσδεσης μακρομορίων στο ανοσοσύμπλοκο. Το ανοσοσύμπλοκο απομονώνεται με σύντομη φυγοκέντρηση και πλένεται 5 φορές με διάλυμα NET-2/150mM ή αρχικά 2 φορές με διάλυμα NET-2/300mM και 3 φορές με NET-2/150mM εφόσον χρειάζεται ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου να γίνει ως προς την σταθερότητα σε αυξημένη αλατότητα της διασύνδεσης των πρωτεϊνών. Τέλος, στο ίζημα προστίθεται απευθείας διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer, για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

### **B.7.3 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση πνευμονικού ιστού ποντικού**

Με την ιστοχημική ανάλυση επιτυγχάνεται ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του πνευμονικού ιστού ποντικού μέσω χρώσης με αιματοξυλίνη/ηωσίνη. Με την ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιείται ανίχνευση και κυτταρική εντόπιση πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Τα περισσότερα υλικά και τα αντιδραστήρια παραχωρήθηκαν από την ομάδα του Δρ. Κοντογιάννη ( Ε.Κ.Ε.Β.Ε Φλεμινγκ). Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια των 2 αυτών μεθόδων.

#### **B.7.3.1 Προετοιμασία τομών**

Μετά από την συλλογή του προς ανάλυση πνευμονικού ιστού από ενήλικες ποντικούς, ο ιστός μονιμοποιείται σε διάλυμα φορμαλίνης 10% για 24 ώρες. Οι πνεύμονες αφυδατώνονται με διαδοχική εμβάπτιση σε αυξανόμενη συγκέντρωση αιθανόλης (50<sup>0</sup>-100<sup>0</sup>) και εγκλείονται σε παραφίνη. Από τα blocks παραφίνης προκύπτουν με μικροτόμο τομές ιστού πάχους 4μm οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικά πλακίδια. Οι τομές επωάζονται όλη τη νύχτα στους 37<sup>0</sup>C, και επεξεργάζονται περαιτέρω για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

#### **B.7.3.2. Μορφολογία πνεύμονα ποντικού μέσω χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης**

Η χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (E/E) σε τομές παραφίνης επιτρέπει τον μορφολογικό χαρακτηρισμό ενός συγκεκριμένου ιστού. Η αιματοξυλίνη έχει την ιδιότητα να βάφει τους πυρήνες των ιστοειδικών κυττάρων ενώ η ηωσίνη το κυτταρόπλασμα.

Αρχικά, οι υπό ανάλυση τομές επωάζονται για 30 λεπτά στους 60<sup>0</sup>C και αποπαραφινολογούνται με εμβάπτιση 2 φορές και για 20 λεπτά σε διάλυμα ξυλενίου. Ακολουθεί ενυδάτωση των τομών 2 λεπτά σε διαδοχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης καθοδικής συγκέντρωσης (100<sup>0</sup>, 2x96<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>, 50<sup>0</sup>), εμβάπτιση 3 λεπτά σε νερό και χρώση 1 λεπτό και 45 δευτερόλεπτα με το διάλυμα της αιματοξυλίνης. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλένονται με νερό προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της

πυρηνικής χρώσης, εμβαπτίζονται για 4 λεπτά σε διάλυμα Scotch και ξεπλένονται με νερό. Ακολουθεί σύντομη εμβάπτιση σε 50<sup>0</sup> και 70<sup>0</sup> αιθανόλες, χρώση με διάλυμα ηωσίνης για 2 λεπτά και ξέπλυμα με νερό. Τέλος, οι τομές αφυδατώνονται εν συντομία σε ανοδικής συγκέντρωσης αιθανόλη (50<sup>0</sup>-100<sup>0</sup>), εμβαπτίζονται 2 φορές και για 2 λεπτά σε διάλυμα ξυλενίου και καλύπτονται με ειδικές καλυπτρίδες (mounting: DPX).

### **B.7.3.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)- Χρώση με DAB**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν ειδικά το αντιγόνο τους σε έναν ιστό. Επιτρέπει την *in situ* ανίχνευση μιας ανοσογονικής πρωτεΐνης και κυρίως την υποκυτταρική της εντόπιση. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την διαδικασία είναι έναντι της πρωτεΐνης hnRNPA1 και hnRNPA2/B1.

Οι τομές αρχικά αποπαραφινολογούνται και ενυδατώνονται όπως παραπάνω ενώ μετά το ξέπλυμα με νερό εμβαπτίζονται για 5 λεπτά σε PBS. Για την αποκάλυψη του αντιγόνου, οι τομές επωάζονται για 10 λεπτά σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.01M, pH 6.0), με προσθήκη 0.016% HCl, σε φούρνο μικροκυμάτων και ακόλουθη παραμονή 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές πλένονται 3 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα PBS και προεπωάζονται 10 με 15 λεπτά (σε θερμοκρασία δωματίου) με διάλυμα μεθανόλης με 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για την αδρανοποίηση των ενδογενών υπεροξειδασών. Στη συνέχεια πλένονται 3 φορές για 5 λεπτά με PBS και επωάζονται 1 ώρα με διάλυμα PBS παρουσία 5% ορού FBS, 1%BSA και 0,05% Tween-20 για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολουθεί επώαση για 12 ώρες στους 4<sup>0</sup>C με το ειδικό, για την αντιγονική πρωτεΐνη αντίσωμα καθώς και με μη ειδικό αντίσωμα της ίδιας κατηγορίας αντισώματος ως αρνητικό control (IgG2a), αραιωμένα κατάλληλα σε διάλυμα PBS, 0.5% BSA και 0.05% Tween-20. Μετά από τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS, οι τομές επωάζονται για 1 ώρα με το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, ομοιοπολικά δεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP: horse radish peroxidase), σε αραιώση 1:800. Οι τομές πλένονται 3 φορές και για 5 λεπτά με διάλυμα PBS και 2 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα 0.05M Tris-HCl pH 7.6. Ακολουθεί ανίχνευση της ειδικής πρωτεΐνης μέσω επώασης των τομών για 10-15 λεπτά (απουσία φωτός) με DAB (diamine benzidine)



αραιωμένη σε 50mM Tris-HCl pH 6.0, προσθήκη 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, για την ενζυμική αντίδραση με την υπεροξειδάση. Έπειτα από με σύντομη εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης, οι τομές ξεπλένονται καλά με νερό, αφυδατώνονται διαδοχικά σε αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλες (5-6 εμβάπτισεις στην κάθε αιθανόλη: 50%-100%) και αφού περάσουν 2 φορές και για 2 λεπτά από διάλυμα ξυλενίου, καλύπτονται με ειδικές καλυπτρίδες (mounting: DPX). Η ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία καφέ χρώσης στις ζώνες που έχουν αναγνωριστεί από το αντίσωμα ενώ η ένταση του χρώματος είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης του αντιγόνου.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ RNP

#### Γ.1.1 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για την μελέτη συμπλόκων RNP

Βασικό στόχο της παρούσας εργασίας αποτελούσε η μελέτη πρωτεϊνών RBP στην κατά το δυνατόν φυσική τους κατάσταση στο κύτταρο, με την μορφή ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (RNP) με την οποία συμμετέχουν στις διεργασίες ωρίμανσης του pre-mRNA. Για τον σκοπό αυτό κρίθηκε αρχικά σκόπιμη η εφαρμογή των διαθέσιμων, για τις RBP πρωτεΐνες, αντισωμάτων σε ανοσοχημικές προσεγγίσεις ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να πιστοποιηθεί η ικανότητα ή μη των αντισωμάτων στην απομόνωση συμπλόκων RNP.

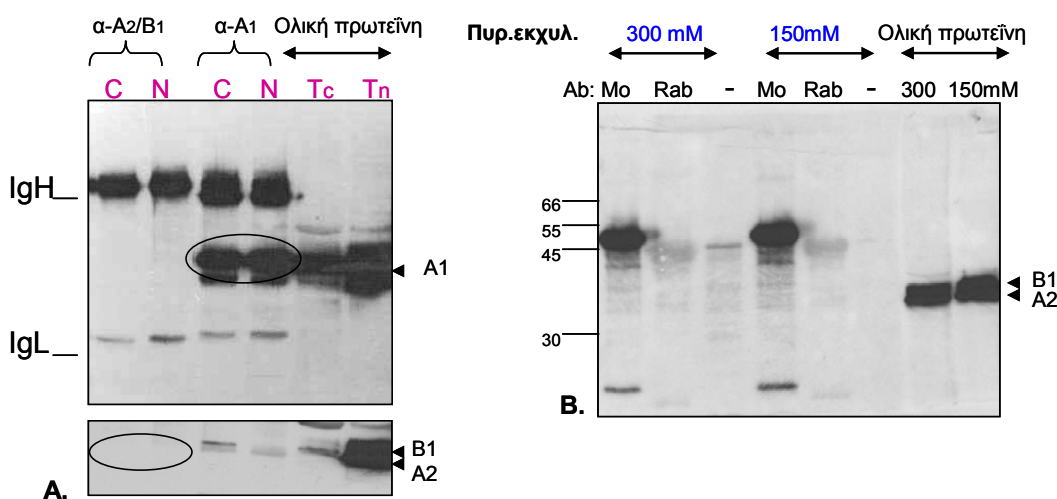
Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως κατά των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B (A1, A2/B1 και A3) καθώς και δύο άλλων πρωτεϊνών RBP, της HuR και της συγγενικής της πρωτεΐνης TIA-1. Η εφαρμογή τους πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa και A549 και από τρωκτικά (κυτταρική σειρά Novikoff) κυρίως μέσω ανοσοστυπώσεων και ανοσοκατακρημνίσεων (αλλά και μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με μονόκλωνο DNA για την απομόνωση πρωτεϊνών RBP).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης σε εκχυλίσματα κυτάρων HeLa, μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της hnRNP A1 και της hnRNP A2/B1. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε μικρής κλίμακας πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εκχύλισμα με την βοήθεια του εμπορικού kit NE-PER.

Η ταυτοποίηση με ανοσοστύπωση (Western blotting) των πρωτεϊνών του ανοσοϊζήματος έδειξε πως μόνο το αντίσωμα κατά της A1 είχε την ικανότητα να ανοσοκατακρημνίσει το αντιγόνο του και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα, σε αντίθεση με το μονόκλωνο αντίσωμα κατά της A2/B1, όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.1.Α. Η αδυναμία του αντισώματος κατά της A2/B1 να ανοσοκατακρημνίσει το ίδιο του το αντιγόνο δημιούργησε αρχικά την υποψία ότι μπορεί να οφείλεται είτε στο ίδιο το αντίσωμα είτε και στην μη αποκάλυψη του αντιγονικού επίτοπου στα συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα. Για τον λόγο αυτό, κρίθηκε σκόπιμη η εφαρμογή της πειραματικής αυτής διαδικασίας σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που παρασκευάστηκαν κάτω από συνθήκες φυσιολογικής αλατότητας (150mM NaCl)

(μέθοδος κατά Dreyfuss, et. al., 1984) καθώς και 300mM NaCl. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ένας ακόμη τύπος αντισώματος κατά της A2/B1, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της A2/B1 που παρασκευάστηκε σε κουνέλια στο εργαστήριό μας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα Γ.1.Β, όπου φαίνεται από την ανοσοστύπωση με το ίδιο πολυκλωνικό αντίσωμα η αδυναμία, σε αντίθεση με το αντίσωμα κατά της hnRNP A1, και των δύο αντί-hnRNP A2/B1 (μονοκλωνικού και πολυκλωνικού) να κατακρημνίσουν την πρωτεΐνη A2/B1 στο ανοσοίζημα (εικόνα Γ.1.Β). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι περαιτέρω προσπάθεια για ανοσοκατακρήμνιση με τα δύο αντισώματα κατά της A2/B1 επεκτάθηκε με την χρήση ισχυρών αποδιατακτικών στην παρασκευή των κυτταρικών εκχυλισμάτων [όπως παρασκευή εκχυλισμάτων παρουσία 1% Triton X-100, SDS, DOC (deoxycholate)] καθώς και με επίδραση με RNάση A για την απομάκρυνση του RNA των συμπλόκων RNP προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ο αντιγονικός επίτοπος να βρίσκεται εσωτερικά του συμπλόκου RNP και κατ' επέκταση να μην είναι διαθέσιμος για αντίδραση με το αντίσωμα. Παρά τις εκτεταμένες προσπάθειες, υπήρξε αδυναμία εφαρμογής των αντισωμάτων κατά της A2/B1 σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, σε αντιδιαστολή με το αντίσωμα κατά της A1.



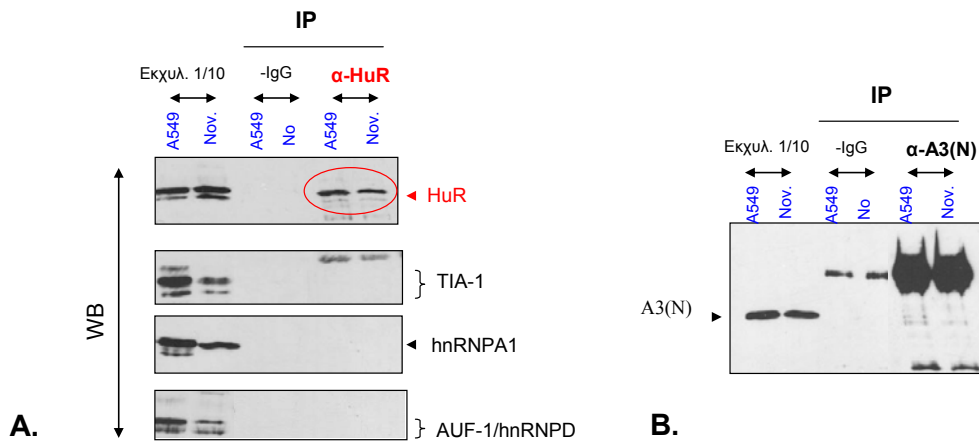
**Εικόνα Γ.1:** Σύγκριση της ικανότητας των αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNP A1 και  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 να ανοσοκατακρημνίσουν τα αντιγονικά τους πολυπεπίδια σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa..

**A.** Ανοσοκατακρήμνιση μέσω των αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNP A1 (mo) και  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 (mo) σε κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό εκχύλισμα (N) (kit NE-PER) και ανοσοστύπωση με τα αντίστοιχα αντισώματα σε αραιώση 1:1000. Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον

ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες των ανοσοϊζημάτων και των αντίστοιχων εκχυλισμάτων (ολική πρωτεΐνη). Σημειώνεται η θέση των αντιγόνων και των IgG (βαριά, H, και ελαφριά, L, αλυσίδα). Η παρουσία/απουσία των αντιγονικών πρωτεϊνών σημειώνεται με κύκλο **B**. Ανοσοκατακρήμιση μέσω δύο αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 (mo, rab) σε πυρηνικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε σε χαμηλή (150mM) ή υψηλή αλατότητα (300mM) και ανοσοσύτωση μεμβράνης με το μονόκλωνο  $\alpha$ -hnRNP A2/B1.

Με δεδομένη την ικανότητα του αντισώματος κατά της A1 να έχει εφαρμογή σε πειράματα ανοσοκατακρήμισης αναζητήθηκαν επιπλέον εργαλεία για την ανάλυση των υπό διερεύνηση ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Δεδομένου ότι στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν κυρίως οι πρωτεΐνες τύπου hnRNP A/B σε συνδυασμό και με δύο άλλες RBPs και ιδιαίτερα την HuR και την συγγενική της πρωτεΐνη TIA-1, θεωρήθηκε αναγκαία η εφαρμογή ειδικών αντισωμάτων σε πειράματα ανοσοκατακρήμισης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και Novikoff μέσω των αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών HuR (3A2, mo) και hnRNP A3 (50949, rab) και στη συνέχεια τα ανοσοϊζήματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα τύπου SDS-PAGE. Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών των ανοσοσυμπλόκων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολούθησε ανοσοσύτωση με τα αντίστοιχα αντισώματα καθώς και με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών TIA-1, hnRNP A1 και hnRNP D (AUF-1) για την ταυτοποίηση στα ανοσοϊζήματα πιθανών διασυνδέσεων και με άλλες πρωτεΐνες.

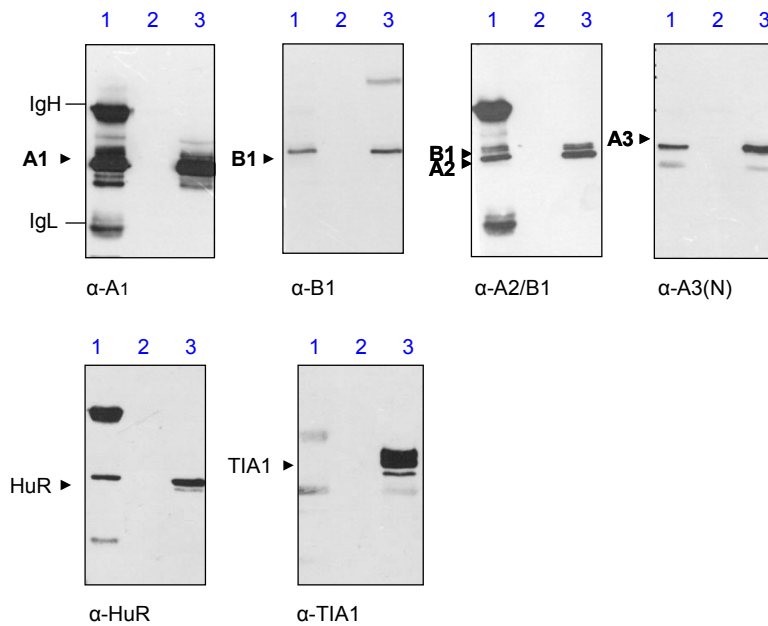
Το αντίσωμα 3A2 κατά της πρωτεΐνης HuR είχε την ικανότητα να κατακρημνίσει το ίδιο του το αντιγόνο και στα δύο κυτταρικά συστήματα όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.2.A. Εντούτοις, καμιά από τις άλλες πρωτεΐνες που εξετάστηκαν με ανοσοσύτωση (TIA-1, hnRNP A1, AUF1/hnRNP D) δεν εντοπίστηκαν στο ανοσοϊζήμα. Ο παράλληλος έλεγχος του αντισώματος κατά της A3 έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα (εικόνα Γ.2.B.), όπως και στην περίπτωση των δύο αντισωμάτων κατά της A2/B1, δηλαδή υπήρξε αδυναμία ταυτοποίησης και της ίδιας της αντιγονικής πρωτεΐνης hnRNP A3 στο ανοσοϊζήμα.



**Εικόνα Γ.2:** Αδυναμία των αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών HuR και hnRNP A3 να εφαρμοστούν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, για την απομόνωση συμπλόκων RNP.

Ανοσοκατακρήμνιση μέσω των αντισωμάτων **A.** α-HuR (mo, 3A2) και **B.** α-hnRNP A3 (rab, 50949) σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και Novikoff και ακόλουθη ανοσοσύτρωση με τα αντισώματα: α-HuR (1:500), α-hnRNP A3 (1: 2000), α-TIA-1 (1:500), α-hnRNP A1 (1;1000) και α-hnRNP D (1:800). Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες του ανοσοϊζήματος, παράλληλα με πρωτεΐνες του ολικού εκχυλίσματος (κλάσμα 1/10).

Η ικανότητα του αντισώματος κατά της πρωτεΐνης hnRNP A1 να ανοσοκατακρημνίσει το αντιγόνο του από διάφορα κυτταρικά εκχυλίσματα (εικόνα Γ.1.A) επέτρεψε την περαιτέρω ανάλυση του ανοσοϊζήματος για την αναζήτηση πρωτεϊνών RBP σε διασύνδεση. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με το αντίσωμα α-hnRNP A1 σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa σε συνθήκες φυσιολογικής αλατότητας (150mM NaCl), δεδομένου ότι οι διασυνδέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP εμφανίζουν ευαισθησία σε αυξημένη αλατότητα (Dreyfuss, et. al., 1984). Έπειτα από ανοσοσύτρωση με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών hnRNP A2/B1 (αλλά και ειδικά κατά της ισομορφής B1), A3 και των πρωτεϊνών HuR και TIA-1, διαπιστώθηκε η ειδική διασύνδεση της A1 με όλες τις προς διερεύνηση πρωτεΐνες, με εξαίρεση την TIA-1 (εικόνα Γ.3). Το γεγονός αυτό θα επιτρέψει την απομόνωση και την ταυτοποίηση συμπλόκων hnRNP και mRNP της πρωτεΐνης hnRNP A1. Επιπρόσθετα, η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη HuR συγκατακρημνίζεται με την A1 και συνεπώς εμφανίζεται σε διασύνδεση με hnRNP σύμπλοκα, αποτελεί ένα καινούριο εύρημα το οποίο οδήγησε σε μια πιο λεπτομερή ανάλυση αυτής της διασύνδεσης, όπως περιγράφεται και παρακάτω (ενότητα Γ.3).



**Εικόνα Γ.3:** Ταυτοποίηση πρωτεϊνών hnRNP/mRNP σε διασύνδεση με την hnRNP A1.

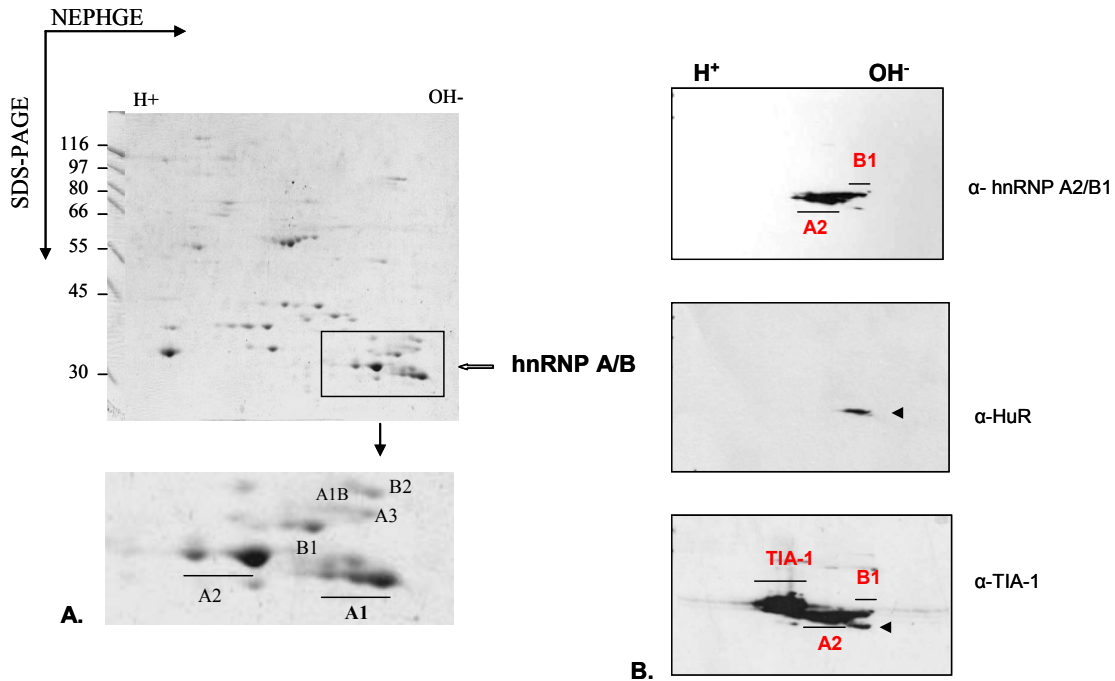
Ανοσοκατακρήμιση με το αντίσωμα κατά της hnRNP A1 σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (150mM NaCl) και ανοσοσύτωση με τα  $\alpha$ -hnRNP A1 (1:1000),  $\alpha$ -hnRNP B1 (1:200),  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 (1:1000),  $\alpha$ -hnRNP A3 (1:2000),  $\alpha$ -HuR (1:500) και  $\alpha$ -TIA-1 (1:500). Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες του ανοσοϊζήματος της A1 **1**, ανοσοϊζήμα αντί-hnRNP A1, **2**, αρνητικός μάρτυρας (IP απουσία αντισώματος: -IgG), **3**, πυρηνικό εκχύλισμα.

### Γ.1.2 Χρωματογραφία συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης

Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνών RBP είναι ο εμπλουτισμός αυτών μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με μονόκλωνο DNA ομοιοπολικά προσδεμένο σε σφαιρίδια κυτταρίνης (ssDNA-κυτταρίνης) (Pinol-Roma, et. al., 1990). Στην παρούσα εργασία κρίθηκε σκόπιμο να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και στη συνέχεια το κλάσμα των πρωτεϊνών σε διασύνδεση με το ssDNA να αναλυθεί σε πηκτώματα δύο διαστάσεων τύπου NEPHGE/SDS-PAGE. Αρχικά, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στις πρωτεΐνες HuR και TIA-1 συγκριτικά με τις πρωτεΐνες hnRNP A/B δεδομένου ότι αυτές οι δύο RBPs δεν έχουν εξεταστεί με την παραπάνω μεθοδολογία. Η πειραματική αυτή προσέγγιση δίνει την δυνατότητα ανάλυσης των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών RBP και την άντληση πληροφοριών σχετικά με την έκφραση, την παρουσία ισομορφών καθώς και

μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ενδεχομένως να έχουν υποστεί σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών με συγγένεια για ssDNA έγινε σε πήκτωμα δύο διαστάσεων (2-D) τύπου NEPHGE/PAGE και η μετέπειτα χρώση του πηκτώματος με coomassie-blue έδωσε μια πρώτη εικόνα εμπλουτισμού πρωτεϊνών RBP (εικόνα Γ.4). Η εστίαση στη βασική πλευρά του πηκτώματος που περικλείεται στο ορθογώνιο σχήμα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες hnRNP A/B και τις θέσεις των πρωτεϊνών hnRNP A1, της ισομορφής A1B, A2, B1, B2 και A3, όπως σημειώνονται στην εικόνα Γ.4.A. Προκειμένου να προσδιοριστεί και να ταυτοποιηθεί η θέση των πρωτεϊνών HuR και TIA-1, παράλληλο πήκτωμα μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών HuR και TIA-1 συγκριτικά με την hnRNP A2/B1. Η ανοσοστύπωση με τα ειδικά για τις παραπάνω πρωτεΐνες αντισώματα πραγματοποιήθηκε πάνω στην ίδια μεμβράνη ώστε η δεδομένη θέση της A2/B1 να βοηθήσει στον προσδιορισμό των δύο άλλων πρωτεϊνών RBP HuR και TIA-1 (εικόνα Γ.4.B.). Αυτό επέτρεψε την ταυτοποίησή τους στο εμπλουτισμένο για RBPs κλάσμα καθώς και τη θέση τους στο σύστημα 2-D ως προς τις πρωτεΐνες hnRNP A/B, με την πρωτεΐνη TIA-1 να μετατοπίζεται προς την όξινη περιοχή του πηκτώματος συγκριτικά με την HuR και την hnRNP A2/B1 (Γ.4.B). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη HuR εντοπίστηκε στην αναμενόμενη θέση της hnRNP A1, γεγονός που έδειξε την αλληλοεπικάλυψή τους σε πηκτώματα δύο διαστάσεων.



**Εικόνα Γ.4:** Χρωματογραφία συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης για την απομόνωση πρωτεϊνών RBPs από ολικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa σε πήκτώματα δύο διαστάσεων τύπου NEPHGE/SDS-PAGE.

**A.** Πρωτεϊνική ανάλυση των RBPs με συγγένεια για ssDNA σε πήκτωμα 2-D και προσδιορισμός της θέσης πρωτεϊνών hnRNP A/B και HuR, TIA-1. Χρώση του πηκτώματος δεύτερης διάστασης SDS-PAGE (10%), με Coomassie. **B.** Ανοσοσύτωση με τα αντισώματα α-hnRNP A2/B1, α-HuR και α-TIA-1 σε μεμβράνη που προέκυψε από μεταφορά των πρωτεϊνών, μετά την ηλεκτροφορητική ανάλυσή τους σε πήκτωμα όμοιο με το πήκτωμα της εικόνας A.

## Γ.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP ΣΤΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου πρωτεϊνών RBP σε ζωικά πειραματικά μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, υπάρχουν περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα για την συγκριτική ανάλυση πρωτεϊνών RBP ανάμεσα στα τρωκτικά και στον άνθρωπο. Για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε αρχικά σκόπιμο να αναλυθούν τα πρότυπα έκφρασής τους σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές καθώς και σε ιστούς ποντικού, συγκριτικά με ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.



### **Γ.2.1. Σύγκριση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών RBPs μεταξύ ανθρώπου και τρωκτικών**

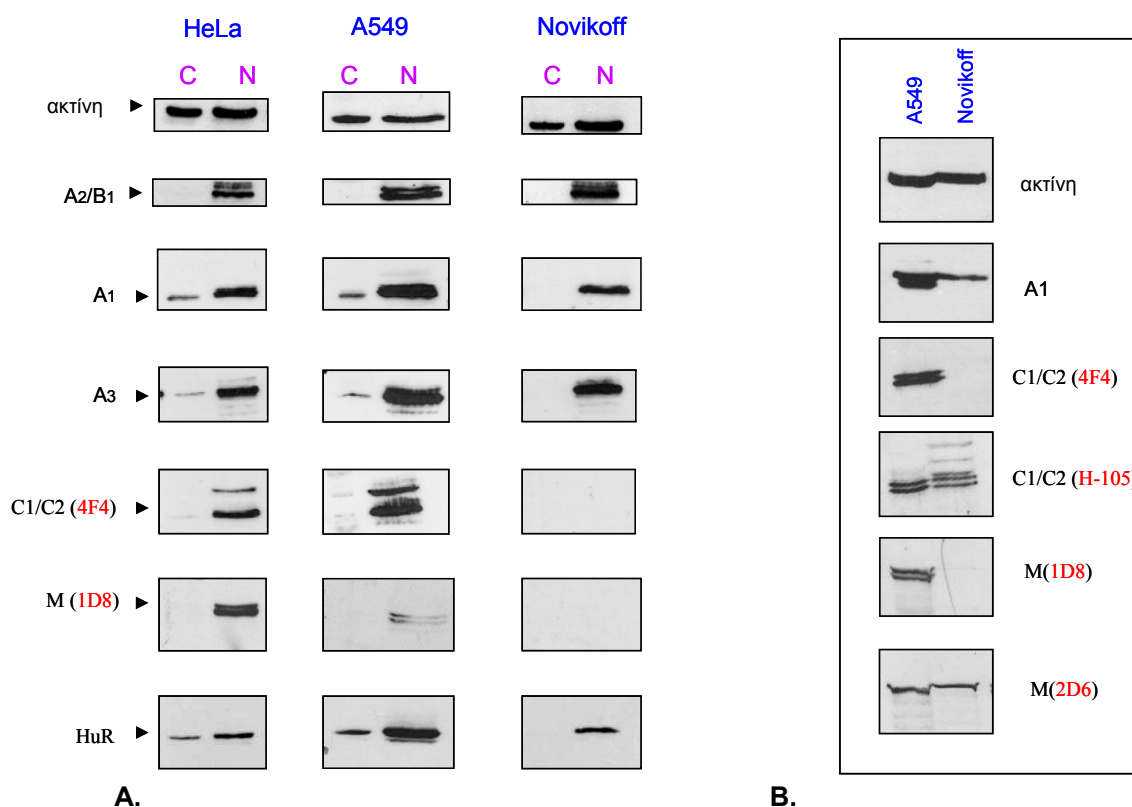
Η διαθεσιμότητα μιας πληθώρας αντισωμάτων κατά πρωτεϊνών RBP επέτρεψε την συγκριτική ανάλυση της έκφρασης, της υποκυτταρικής εντόπισης και της εμφάνισης ισομορφικών τύπων αυτών των πρωτεϊνών, αρχικά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από άνθρωπο και αρουραίο. Βασικός στόχος ήταν να διερευνηθούν πιθανές διαφορές των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ειδών οι οποίες θα ληφθούν υπόψη για την περαιτέρω ανάλυση.

Για την συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση παρασκευάστηκαν κυτταροπλασματικά, πυρηνικά και ολικά εκχυλίσματα από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας) και A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα) καθώς και από την κυτταρική σειρά Novikoff (ηπάτωμα αρουραίου). Η σύγκριση έγινε με ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE βάση της ίδιας συνολικής πρωτεΐνης (20μg) καθώς και ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού της β-ακτίνης ως εσωτερικού, κυτταρικού δείκτη. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατά πρωτεϊνών hnRNP (  $\alpha$ - hnRNP A1, A2/B1, A3, C1/C2 και M) και κατά της πρωτεΐνης HuR.

Η αντίδραση ανοσοσύτωσης με τα παραπάνω αντισώματα έδειξε σημαντικές διαφορές όσον αφορά την έκφραση και την υποκυτταρική εντόπιση των RBPs μεταξύ ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και αρουραίου, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα Γ.5.A. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες hnRNP A1, hnRNP A3 και HuR εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα αλλά ανιχνεύονται και στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα Novikoff όπου ανιχνεύονται αποκλειστικά στον πυρήνα. Επιπρόσθετα, τα αντισώματα 4F4 κατά της hnRNP C1/C2 (4F4) και 1D8 κατά της hnRNP M δεν ήταν ικανά να αναγνωρίσουν το αντιγόνο τους στα κύτταρα του αρουραίου σε αντιδιαστολή με τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Η τελευταία παρατήρηση δημιούργησε την υποψία ότι στα τρωκτικά πιθανόν οι πρωτεΐνες hnRNP C1/C2 και M να υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αλλαγή του αντιγονικού επίτοπου, κάτι που εμποδίζει την αναγνώρισή τους από τα συγκεκριμένα αντισώματα. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και Novikoff (προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο απώλειας

των πρωτεϊνών κατά την εκχύλιση) και ταυτόχρονα έγινε άμεση σύγκριση δύο διαφορετικών αντισωμάτων: συγκεκριμένα τα αντισώματα 4F4 (mo) και H-105 (rab) για την hnRNP C1/C2 και τα αντισώματα 1D8 (mo) και 2D6 (mo) για την πρωτεΐνη hnRNP M (εικόνα Γ.5.B). Η διαδικασία ανοσοσύτωσης επιβεβαίωσε πως τα αντισώματα αναγνωρίζουν διαφορετικούς αντιγονικούς επίτοπους στις hnRNP C1/C2 και M στον άνθρωπο και στα τρωκτικά. Οι σημαντικές αυτές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και του αρουραίου υποδηλώνουν την παρουσία στα τρωκτικά διαφορετικών πρωτεϊνικών ισομορφών της hnRNP C1/C2 και της M.



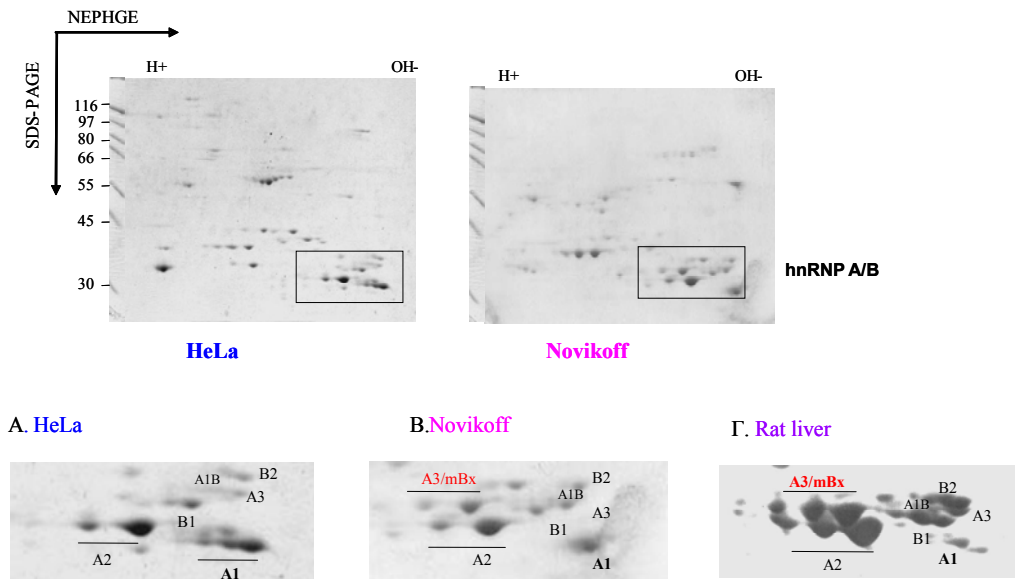
**Εικόνα Γ.5:** Σύγκριση των προτύπων έκφρασης και της υποκυτταρικής κατανομής πρωτεϊνών RBPs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από άνθρωπο (HeLa, A549) και αρουραίο (Novikoff).

**A.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE, και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών που προκύπτουν από πυρηνικά (N) και κυτταροπλασματικά κλάσματα (C) κυττάρων HeLa, A549 και Novikoff (kit NE-PER). Ακόλουθη ανοσοσύτωση με τα αντισώματα:  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -hnRNP A2/B1,  $\alpha$ -hnRNP A1,  $\alpha$ -hnRNP A3 (N),  $\alpha$ -hnRNP C1/C2 (4F4),  $\alpha$ -hnRNP M (1D8) και  $\alpha$ -HuR. **B.** Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά πρωτεϊνών ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων A549 και Novikoff. Ανοσοσύτωση με: δύο  $\alpha$ -hnRNP C1/C2 (4F4, H-105), δύο  $\alpha$ -hnRNP M (1D8, 2D6),  $\alpha$ -hnRNP A1 και  $\alpha$ -actin.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω πειραματική προσέγγιση και οι διαφορές που εντοπίστηκαν μεταξύ ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (HeLa και A549) και αρουραίου (κύτταρα Novikoff) οδήγησαν στην περαιτέρω ανάλυση των δύο συστημάτων. Θεωρήθηκε σκόπιμη η σύγκριση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP μετά από τον εμπλουτισμό τους σε στήλη συγγένειας ssDNA από εκχυλίσματα κυττάρων HeLa και Novikoff και ανάλυση σε πηκτώματα δύο διαστάσεων τύπου NEPHGE/SDS-PAGE. Παράλληλα εξετάστηκαν με την ίδια μεθοδολογία τα πρότυπα έκφρασης των hnRNPs από ιστό ήπατος αρουραίου.

Η χρώση των πηκτωμάτων δύο διαστάσεων (NEPHGE/ SDS-PAGE) με Coomassie καθώς και η ειδική εντόπιση των πρωτεϊνών hnRNP A/B (περιοχή σε μεγέθυνση, όπως στην εικόνα Γ.4), επέτρεψε την αναγνώριση δύο σημαντικών διαφορών μεταξύ των δύο συστημάτων ανθρώπου/αρουραίου(εικόνα Γ.6). Στο σύστημα του αρουραίου, εκτός από την βασική ισομορφή της πρωτεΐνης hnRNP A3 που εμφανίζεται κοινή με τα ανθρώπινα κύτταρα [και αναγνωρίζεται από το αντίσωμα α-A3 (N), εικόνα Γ.5], κυριαρχεί η έκφραση μιας άλλης ισομορφής της πρωτεΐνης, που θα ονομάζεται εφ'εξής hnRNPA3/mBx και η οποία ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας (Plomaritoglou, et. al., 2000). Παράλληλα, η πρωτεΐνη hnRNP A1 φαίνεται να υπερισχύει στα ανθρώπινα κύτταρα σε σχέση με το σύστημα του αρουραίου (συγκρίνονται τα πλαίσια της εικόνας Γ.6.A, B και Γ.).

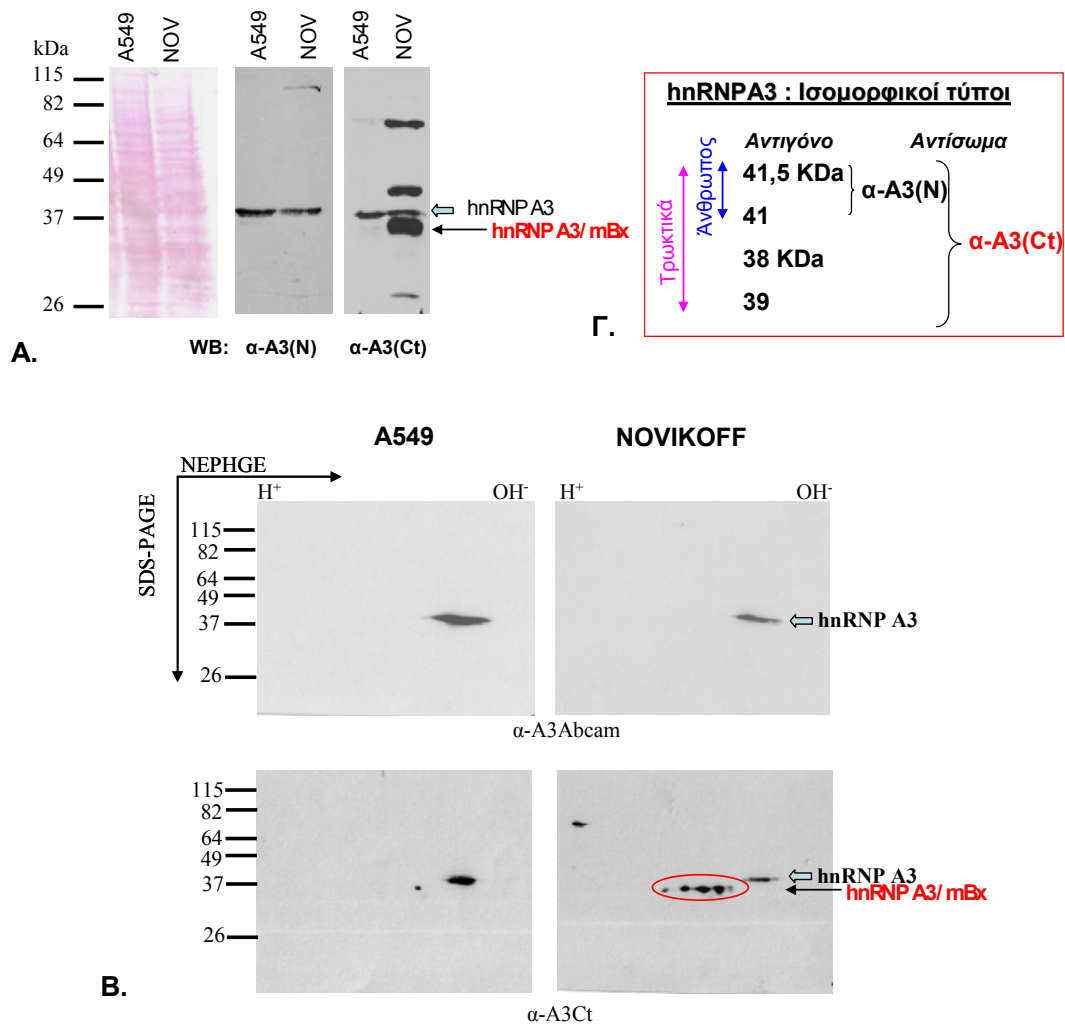
Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού σχετικά με τις πρωτεΐνες hnRNP A1 και A3 υποδηλώνουν πως ενδεχομένως να έχουν συμπληρωματικούς κυτταρικούς ρόλους, με την hnRNP A3 να κυριαρχεί στα τρωκτικά και την hnRNPA1 να υπερτερεί στον άνθρωπο.



**Εικόνα Γ.6:** Ανάλυση πρωτεϊνών hnRNP A/B σε πηκτώματα δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE), μετά από εμπλουτισμό σε στήλη συγγένειας ssDNA εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa (human), Novikoff (Rat) και ηπατικό ιστό αρουραίου. Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών hnRNP A/B (A1, A1B, A2, B1, B2, A3 και A3/mBx) σε κύτταρα HeLa (A.), Novikoff (B.) και ήπαρ αρουραίου (Γ.). Χρώση των πηκτωμάτων με Coomassie.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί και να χαρακτηριστεί περαιτέρω η παρουσία της κύριας ισομορφής hnRNP A3/mBx στα τρωκτικά, παρασκευάστηκε στο εργαστήριό μας νέο αντίσωμα σε κουνέλια χρησιμοποιώντας ως ανοσογόνο υλικό ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη A3/mBx (recA3Ct) που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό τμήμα (βοηθητική περιοχή) της hnRNP A3 (Διδακτορική διατριβή Γ. Μπουκάκη). Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας αυτού του νέου αντισώματος, παρασκευάστηκαν ολικά και πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και Novikoff και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτώματα μίας διάστασης καθώς και δύο διαστάσεων (NEPHGE/SDS-PAGE) όπως παρουσιάζονται στην εικόνα Γ.7.A και B. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου και μελετήθηκε η ανοσοαντίδραση με το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης hnRNPA3/mBx, σε άμεση σύγκριση με το εμπορικό αντίσωμα της Abcam α-A3 (N). Σημειώνεται ότι το εμπορικό αντίσωμα α-A3 (N) αναγνωρίζει το ειδικό εξόνιο στο αμινοτελικό άκρο της ισομορφής hnRNP A3, το οποίο απουσιάζει από την κύρια μορφή της hnRNP A3/mBx. Τα δύο αντισώματα θα αναφέρονται εφ'εξής ως α-A3 (N) και α-A3 (Ct).

Η αντίδραση ανοσοαποτύπωσης με τον νέο ορό  $\alpha$ -A3(Ct) (εικόνα Γ.7.A), επιβεβαίωσε την παρουσία αυτής της ισομορφής της A3 στα τρωκτικά, σε αντιδιαστολή με την εμφανή απουσία της στα ανθρώπινα κύτταρα. Αναφέρεται ότι στα πηκτώματα 2-D εμφανίστηκαν επιπλέον ισομορφές (τουλάχιστον 4) της A3/mBx ίδιου μοριακού βάρους, πιθανά λόγω διαφορετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, στα θηλαστικά ανιχνεύονται δύο κύριες ισομορφές της πρωτεΐνης hnRNP A3, η ισομορφή A3 (με μοριακό βάρος 41/41,5 kDa) κοινή μεταξύ ανθρώπου και τρωκτικών, και η ισομορφή A3/mBx (με μοριακό βάρος 38/39 kDa) η οποία εντοπίζεται ως κυρίαρχη μορφή της A3 στα τρωκτικά (εικόνα Γ.7.B)



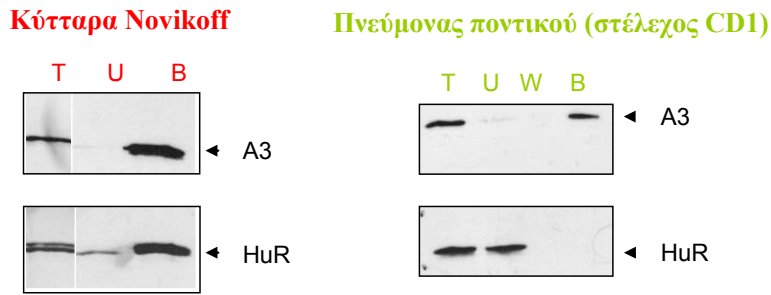
**Εικόνα Γ.7:** Ταυτοποίηση της ειδικότητας του νέου αντισώματος  $\alpha$ -A3(Ct) που παρήχθη σε κουνέλια κατά του καρβοξυτελικού άκρου (Ct) της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης hnRNP A3.

**A.** Πρωτεϊνική ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων A549 και Novikoff, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοστύπωση (WB) με το αντίσωμα κατά της hnRNP A3/mBx ( $\alpha$ -A3-Ct: αραίωση 1:200) και της hnRNP A3 [ $\alpha$ -A3 (N)]. **B.** Ανοσοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών ισομορφών της hnRNP A3 σε πηκτώματα δύο διαστάσεων τύπου NEPHGE/SDS-PAGE πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων A549 και Novikoff. Σημειώνεται η θέση των πρωτεϊνών. **Γ.** Ανοσοχημικός προσδιορισμός των ισομορφικών τύπων της πρωτεΐνης hnRNPA3 στον άνθρωπο και στα τρωκτικά με βάση την ειδικότητα των δύο αντισωμάτων να αναγνωρίζουν τις ισομορφές της hnRNP A3.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις σχετικά με την έκφραση, την υποκυτταρική εντόπιση και την παρουσία ισομορφών πρωτεϊνών hnRNP αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και στην κυτταρική σειρά Novikoff του αρουραίου. Βάση αυτών των αποτελεσμάτων κρίθηκε σκόπιμη η απομόνωση πρωτεϊνών RBP από τα κύτταρα αρουραίου (Novikoff) και ιστό πνεύμονα ποντικού στελέχους CD1. Στόχος ήταν η περαιτέρω σύγκριση πρωτεϊνών RBP στα τρωκτικά, δεδομένου ότι αποτελούν το βασικό πειραματικό μοντέλο προς διερεύνηση στην παρούσα διατριβή.

Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκε ολικό εκχύλισμα από την κυτταρική σειρά Novikoff (ηπατοκύτταρα αρουραίου) καθώς και από τον πνευμονικό ιστό ποντικού στελέχους CD1. Στην συνέχεια έγινε εμπλουτισμός σε πρωτεΐνες RBP με την εφαρμογή στήλης συγγένειας ssDNA. Οι πρωτεΐνες RBP αναλύθηκαν σε πηκτώματα SDS-PAGE (10%) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου και έγινε ανοσοστύπωση με τα αντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP και της HuR. Στην εικόνα Γ.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοστύπωσης με αντισώματα κατά της hnRNP A3 [ $\alpha$ -A3 (N)] και HuR.

Μια πρώτη παρατήρηση ήταν η αλλαγή στην ικανότητα της πρωτεΐνης HuR να προσδεθεί στο ssDNA ανάμεσα στην κυτταρική σειρά Novikoff και τον πνεύμονα του ποντικού, σε αντιδιαστολή με την πρωτεΐνη hnRNP A3 (εικόνα Γ.8), καθώς και άλλες A/B (μη εικονιζόμενο αποτέλεσμα) οι οποίες διατηρούν την ικανότητα πρόσδεσης στο ssDNA. Αυτή η αλλαγή στην πρόσδεση της HuR σε μονόκλωνο DNA/RNA πιθανόν να υποδηλώνει την παρουσία διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της HuR ανάμεσα στα κύτταρα Novikoff και τον πνευμονικό ιστό οι οποίες επηρεάζουν το φορτίο και κατ'έκταση την ικανότητά της να προσδένει σε μονόκλωνο DNA (ή/και RNA).



**Εικόνα Γ.8:** Απομόνωση πρωτεϊνών RBP μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ssDNA από κύτταρα Novikoff και ιστό πνεύμονα ποντικού στελέχους CD1. Ανοσοστύπωση μεμβρανών με τα αντισώματα  $\alpha$ -hnRNP A3 (N) και  $\alpha$ -HuR. Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πηκτώματα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες από ολικό εκχύλισμα κυττάρων Novikoff και πνευμονικού ιστού ποντικού (στελέχος CD1) κατόπιν εμπλουτισμού μέσω ssDNA. T= εκχύλισμα (total input), U= μη προσδεδεμένες πρωτεΐνες (unbound fraction), W= έκπλυμα των σφαιριδίων κυτταρίνης ssDNA (wash), B= κλάσμα προσδεδεμένων πρωτεϊνών (bound fraction).

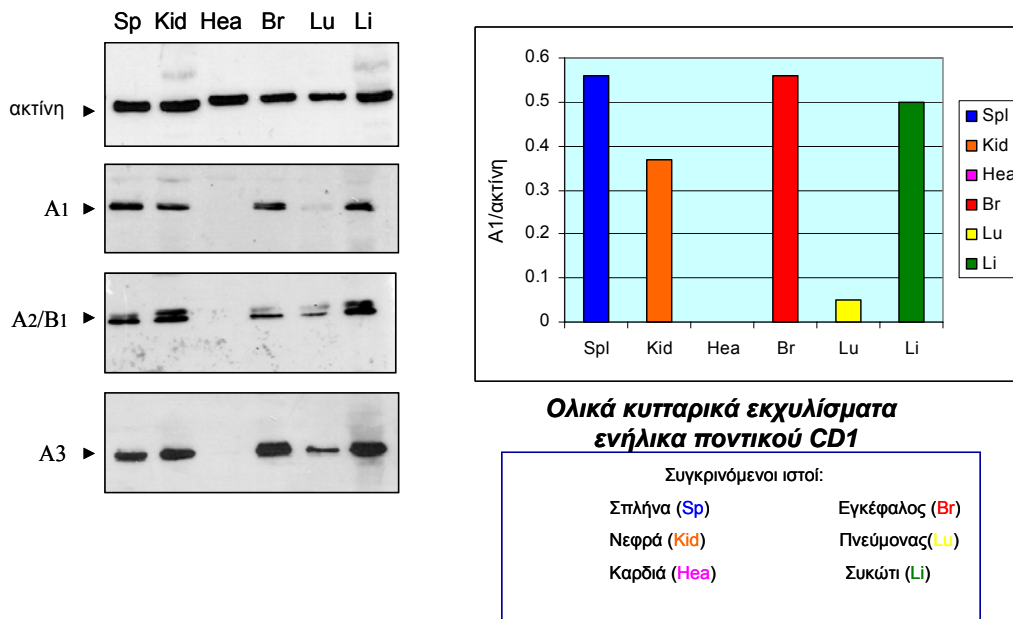
### Γ.2.2. Προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών RBPs σε πειραματικά ζωϊκά μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για την έκφραση πρωτεϊνών RBP σε ζωϊκά μοντέλα επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα. Στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, αντίθετα, υπάρχουν σχετικές δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν την καρκινοεξαρτώμενη απορρύθμιση στην έκφραση πρωτεϊνών RBP, κατ'εξοχήν των hnRNP A2/B1 και HuR (όπως περιγράφεται στην εισαγωγή).

Με βάση τις διαφορές που ανιχνεύτηκαν μεταξύ ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και τρωκτικών (ενότητα Γ.2.1), κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η έκφραση πρωτεϊνών hnRNP A/B σε διάφορους ιστούς ενήλικα ποντικού στελέχους CD1 ( $3^{1/2}$  μηνών), συμπεριλαμβανομένου και του πνευμονικού ιστού. Στόχος ήταν η ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων αρχικά στον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό που θα αποτελέσει και την αφετηρία για την περαιτέρω διερεύνηση του καρκινικού φαινομένου στον πνεύμονα. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν, με ομογενοποίηση παρουσία ισχυρών αποδιατακτικών (διάλυμα λύσης), ολικά εκχυλίσματα από σπλήνα, νεφρό, καρδιά, εγκέφαλο, πνεύμονα και συκώτι. Οι πρωτεΐνες των ιστολογικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE και μετά από μεταφορά σε μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης έγινε ανοσοσύτρωση με ειδικά αντισώματα κατά των πρωτεϊνών hnRNP A/B.

Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.9, ο πνεύμονας (Lu) εμφανίζει χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών hnRNP A/B συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς (με εξαίρεση την καρδιά) γεγονός που συμφωνεί με σχετική δημοσίευση σύμφωνα με την οποία τα επίπεδα των hnRNP A/B είναι ιδιαίτερα χαμηλά στον πνεύμονα του ενήλικα ποντικού, σε αντιδιαστολή με τα υψηλά επίπεδα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του πνεύμονα (Montuenga et al, 1998).



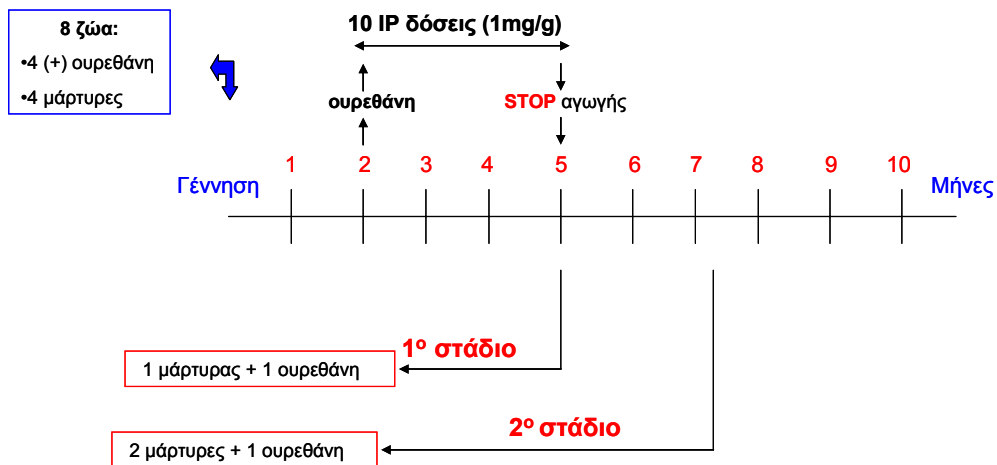
**Εικόνα Γ.9:** Σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B (A1, A2/B1, A3) σε ιστούς ενήλικα ποντικού στελέχους CD1.

Ανοσοσύτρωση μεμβράνης με τα αντισώματα: α-actin, α-hnRNP A1, α-hnRNP A2/B1, α-hnRNP A3(N). Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες των ολικών εκχυλισμάτων των ιστών: σπλήνα (sp), νεφρό (kid), καρδιά (Hea), εγκέφαλος (Br), πνεύμονας (Lu) και συκώτι (Li). Η αναγωγή των επιπέδων των πρωτεϊνών έγινε ως προς αυτά της ακτίνης στο ίδιο υλικό ιστόγραμμα).



### Γ.2.2.1 Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με ουρεθάνη σε ποντικούς στελέχους A/J

Η παραπάνω παρατήρηση για τα χαμηλά επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP στον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό ποντικού καθώς και οι περιορισμένες αναφορές σχετικά με τα πρότυπα έκφρασής τους στον καρκίνο του πνεύμονα του ποντικού, οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνησή τους σε ένα ευρέως γνωστό σύστημα χημικής επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα, το στέλεχος A/J (συνεργασία με την ομάδα του Δρ.Κοντογιάννη, Ερευν. Ινστ. Φλεμινγκ). Το τελικό σχήμα που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα Γ.10. Συγκεκριμένα, δύο μήνες μετά την γέννηση, δόθηκαν σε διάστημα 3 μηνών σε 4 ζώα 10 ενέσιμες ενδοπεριτονιακές δόσεις ουρεθάνης (1mg/g), καρκινογόνο γνωστό για την ικανότητά του να προκαλεί στοχευμένη καρκινική εξαλλαγή στον πνεύμονα ποντικού, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν 4 ηλικιακά ίδια ζώα ως μάρτυρες. Υπογραμμίζεται ότι το παραπάνω σχήμα χημικής επαγωγής αποδείχτηκε πολύ επιθετικό για το εξαιρετικά ευαίσθητο στέλεχος A/J, με αποτέλεσμα την επιβίωση μόλις 5 εκ των αρχικά διαθέσιμων 8 ζώων. Το μεγάλο κόστος διατήρησης της αποικίας μαζί με τα περιορισμένα χρονικά περιθώρια της μελέτης εμπόδισαν την εφαρμογή του αρχικού πειραματικού στόχου που ήταν η σταδιοποίηση της καρκινικής εξαλλαγής του πνεύμονα και η συμμετοχή μεγαλύτερου αριθμού ζώων ανά στάδιο. Λόγω των ανωτέρων προβλημάτων, η μελέτη περιορίστηκε σε ένα σύνολο 5 ζώων. Ως αποτέλεσμα, έγινε μια περιορισμένης έκτασης μελέτη των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών RBP στον πνεύμονα των ζώων που θανατώθηκαν σε δύο χρονικά σημεία, 12 (1<sup>ο</sup> στάδιο) και 22 εβδομάδες (2<sup>ο</sup> στάδιο) μετά την πρώτη χορήγηση ή μη ουρεθάνης, όπως περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα Γ.10.

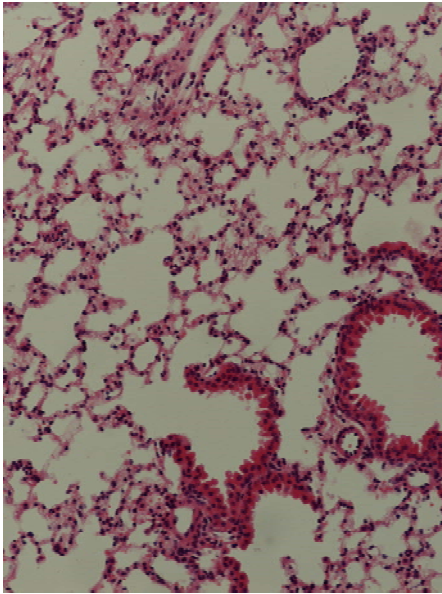
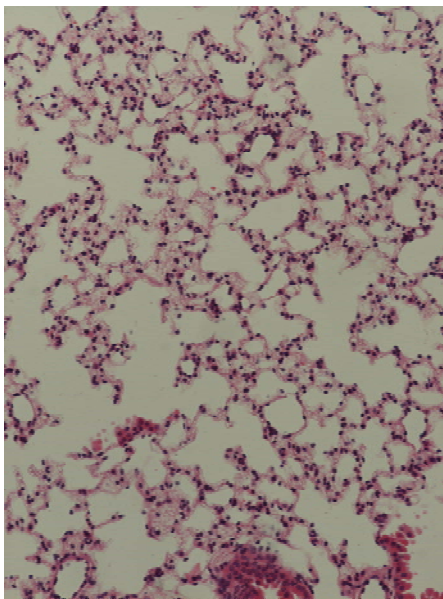
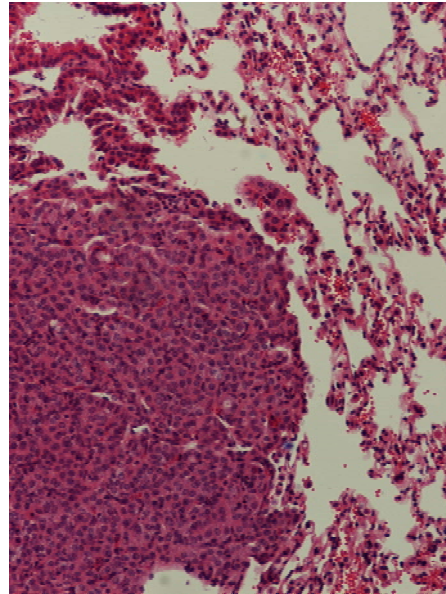
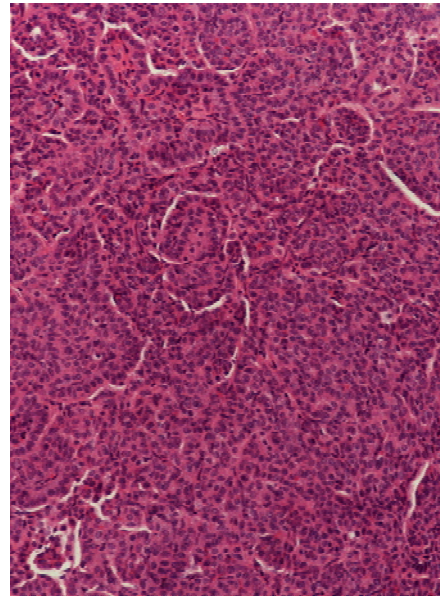


**Εικόνα Γ.10:** Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ουρεθάνης σε ποντικούς στελέχους A/J (μοντέλο επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα) και στάδια εξέτασης επαγωγής και καθιέρωσης καρκινικής εξαλλαγής στον πνεύμονα.

#### Γ.2.2.1.1 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική μελέτη φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους A/J

Η διαθεσιμότητα ιστού για ιστο/ανοσοϊστοχημική μελέτη στο 2<sup>ο</sup> στάδιο θανάτωσης των ζώων επέτρεψε αρχικά τον μορφολογικό χαρακτηρισμό του πνεύμονα στην καρκινική και φυσιολογική του κατάσταση καθώς και τον ανοσοϊστοεϊδικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 στο στέλεχος A/J. Τομές παραφίνης πνεύμονα πάχους 4μm, αφού ενυδατώθηκαν, πέρασαν διαδοχικά από διάλυμα αιματοξυλίνης (για την χρώση των πυρήνων) και έπειτα από διάλυμα ηωσίνης (για κυτταροπλασματική χρώση).

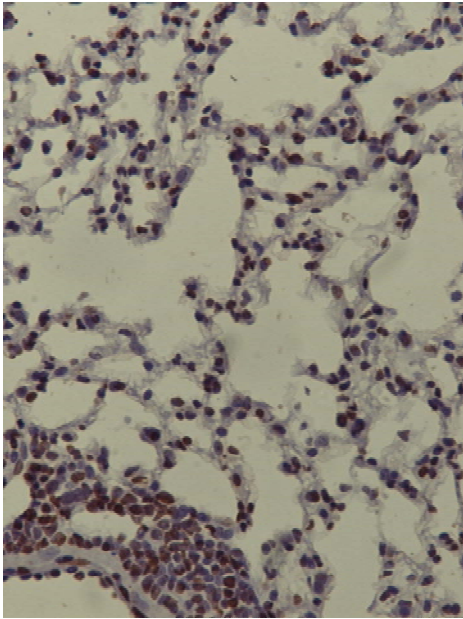
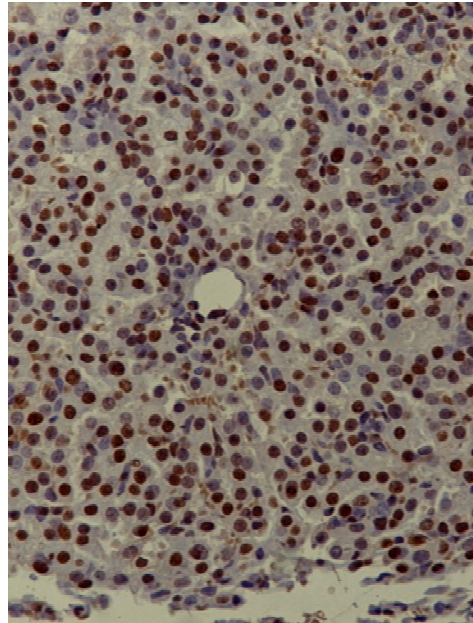
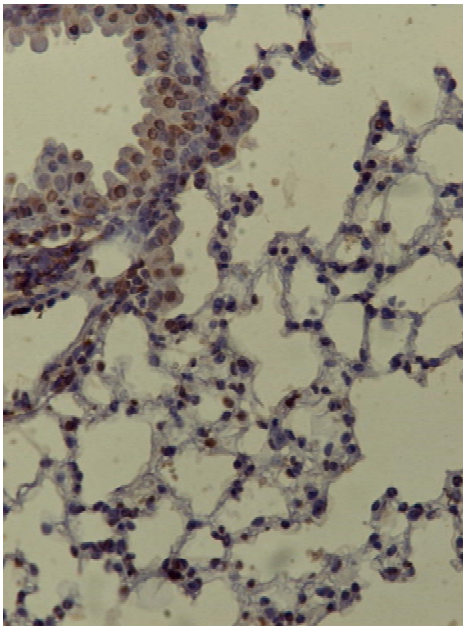
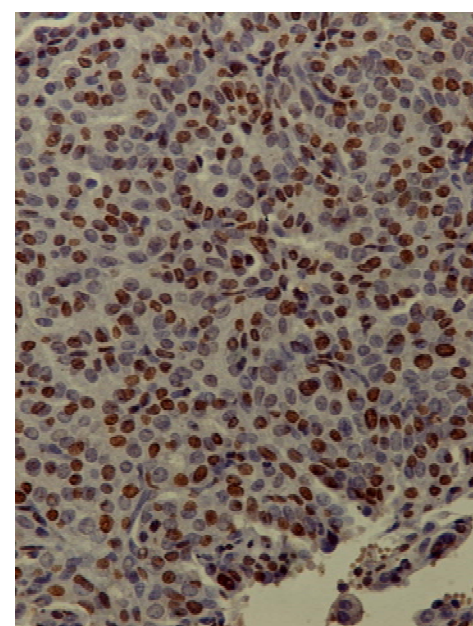
Όπως φαίνεται και στην εικόνα Γ.11., τα ζώα με την χημικά επαγόμενη καρκινική εξαλλαγή εμφάνισαν πολλαπλές εστίες αδενοκαρκινωμάτων στον πνεύμονα 22 εβδομάδες μετά την πρώτη χορήγηση ουρεθάνης (B), σε αντίθεση με τα ζώα μάρτυρες (A).

**Μάρτυρας 1****Μάρτυρας 2****A.****Ουρεθάνη, εικόνα 1****Ουρεθάνη, εικόνα 2****B.**

**Εικόνα Γ.11:** Μορφολογική ανάλυση του πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους A/J, 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση (B) ή μη (A) ουρεθάνης. Χρώση με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη για την διαφοροποίηση πυρήνων και κυτταροπλάσματος αντίστοιχα. Μέγεθος εικόνων 20x.

Η επιβεβαίωση ότι το ζώο που πήρε ουρεθάνη εμφάνισε όγκους στις 22 εβδομάδες οδήγησε στον προσδιορισμό της έκφρασης και της υποκυτταρικής εντόπισης των πρωτεϊνών hnRNP A/B σε παράλληλες τομές πνεύμονα όπως αυτές της εικόνας Γ.11. Δοκιμάστηκαν αρχικά διάφορα διαθέσιμα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών A/B, αλλά μόνο τα μονοκλωνικά αντισώματα  $\alpha$ -hnRNP A1 και  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 είχαν την ικανότητα να δώσουν ειδική αντίδραση στον πνευμονικό ιστό, σε αντίθεση με το πολυκλωνικό  $\alpha$ -A3 (N) αντίσωμα. Αυτό επέτρεψε ανοσοϊστοχημική εντόπιση της hnRNPA1 και A2/B1. Η χρώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η DAB η οποία αποδίδει καφέ χρώση στο σημείο αντίδρασης αντιγόνου/αντισώματος, και ακόλουθη χρώση με αιματοξυλίνη (counter stain) για εντοπισμό των πυρήνων.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας έδειξαν κυτταρική, σχεδόν αποκλειστικά πυρηνική χρώση, καθώς και εκτεταμένης έκτασης ετερογενή χρώση των πυρήνων μέσα στην καρκινική εστία, με ορισμένα κύτταρα να εκφράζουν (καφέ χρώση πυρήνων), ενώ άλλα να μην εκφράζουν (μπλε χρώση πυρήνων) τις πρωτεΐνες A1 και A2/B1 (εικόνα Γ.12.B). Σε άμεση σύγκριση με τον γειτονικό φυσιολογικό ιστό (A) παρατηρήθηκαν αντίστοιχα επίπεδα χρώσης και ετερογένειας των πυρήνων με τα κύτταρα της καρκινικής εστίας (B). Στο σύνολο των κυττάρων δεν διακρίνονται μεγάλες διαφοροποιήσεις στον βαθμό της ειδικής αντίδρασης (καφέ χρώση) φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές στην σύγκριση με τα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου που βρίσκονται σε έντονο βαθμό αναπαραγωγής σε σχέση με τα κύτταρα των πνευμονικών κυψελίδων.

**Μάρτυρας 1: hnRNP A1****Ουρεθάνη: hnRNP A1****Μάρτυρας 2: hnRNP A2/B1****Ουρεθάνη: hnRNP A2/B1****A.****B.**

**Εικόνα Γ.12:** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους A/J 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση (B) ή μη (A) ουρεθάνης. Ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 μέσω των αντισωμάτων:  $\alpha$ -hnRNP A2/B1(mo) και  $\alpha$ -hnRNP A1 (mo) σε αραίωση 1:50. Χρώση με DAB, μέγεθος εικόνων 40x.

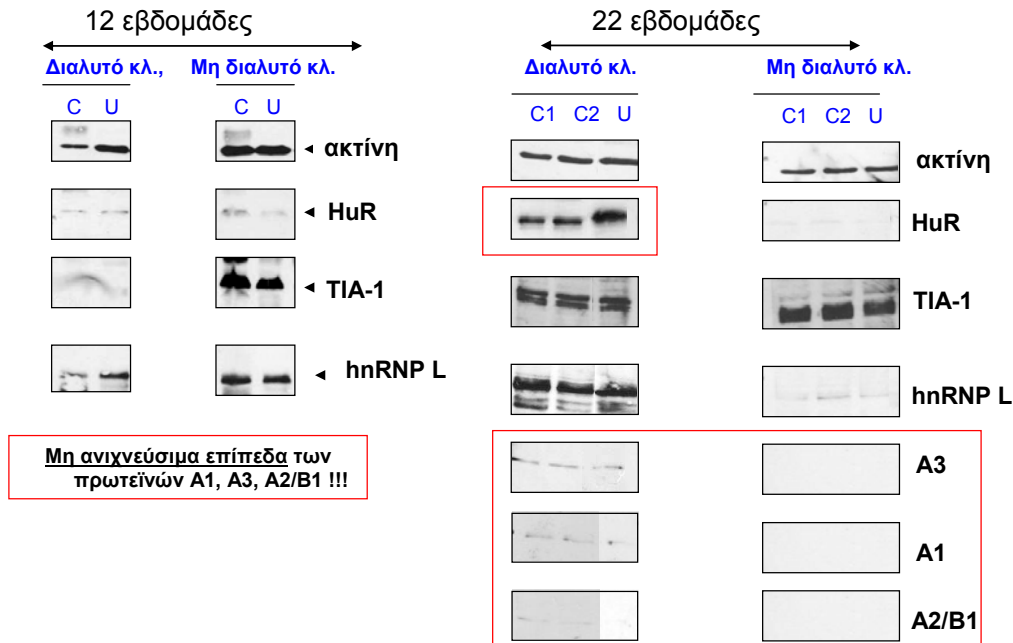
Συμπερασματικά, η έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A2/B1 και A1 στο σύνολο του καρκινικού ιστού δεν εμφάνισε σημάδια υπερέκφρασης σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Εξαίρεση δυνατόν να αποτελούν μεμονωμένα κύτταρα της καρκινικής εστίας.

#### **Γ.2.2.1.2 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP και HuR στον πνεύμονα ποντικών A/J**

Παράλληλα με την ανοσοϊστοχημική εξέταση έγινε ακόλουθη βιοχημική ανάλυση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP καθώς και των πρωτεϊνών HuR και TIA-1 στα ζώα τόσο στις 12 όσο και στις 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης. Έγινε ομογενοποίηση του πνευμονικού ιστού ποντικών A/J ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Zerbe et al, (2004) κατά το οποίο το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χωρίζεται σε διαλυτά (κυτταρικά συστατικά εκχυλίσματα σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας ) και μη διαλυτά κλάσματα (κυτταρικό ίζημα), όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους. Η επιλογή των συγκεκριμένων συνθηκών ομογενοποίησης βασίστηκε στην αντίστοιχη διερεύνηση από την ομάδα των Zerbe et. al., της έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A1 και του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2, στην επαγόμενη καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα ποντικών στελέχους BALB/c. Οι πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων αναλύθηκαν σε πηκτώματα SDS-PAGE και έπειτα από μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολούθησε ανοσοεντόπιση με χρήση αντισωμάτων κατά πρωτεϊνών hnRNP A/B (A1, A2/B1 και A3) αλλά και της hnRNP L, καθώς και των πρωτεϊνών HuR και TIA-1. Η σύγκριση έγινε ως προς την ίδια συνολική πρωτεΐνη ανά διαδρομή (40μg) καθώς και με εσωτερικό κυτταρικό δείκτη την ακτίνη.

Τόσο στα διαλυτά όσο και στα μη διαλυτά κλάσματα, η αντίδραση ανοσοαποτύπωσης με τα παραπάνω αντισώματα έδειξε χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP A/B (με εξαίρεση την hnRNP L) και στα δύο χρονικά σημεία, στα φυσιολογικά αλλά και στα ζώα με ουρεθάνη, όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.13. Η αδυναμία ταυτοποίησης υπερέκφρασης των hnRNP στον πνεύμονα ποντικού με ουρεθάνη και παρά την εμφάνιση πολλαπλών αδενωμάτων στις 22 εβδομάδες, είναι σε γενική αντιστοιχία με την ανοσοϊστοχημική ανάλυση (εικόνα Γ.12.B). Η μόνη αξιοσημείωτη διαφορά που εντοπίστηκε μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού ήταν μια, μικρής κλίμακας (2x), αύξηση των επιπέδων της HuR στο ζώο των 22 εβδομάδων που εμφάνισε καρκινικές εστίες. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικές

διαφορές στην κατανομή των πρωτεϊνών TIA-1 και hnRNP L ανάμεσα στα διαλυτά και μη-διαλυτά κλάσματα μεταξύ των ζώων των 12 και 22 εβδομάδων, ανεξάρτητες της καρκινικής εξαλλαγής, που πιθανόν να οφείλονται στην διαφορετική εκχυλισσιμότητα των πρωτεϊνών λόγω της προϊούσας κακής φυσικής κατάστασης των ζώων (καχεξία, φλεγμονή, κ.λ.π.)

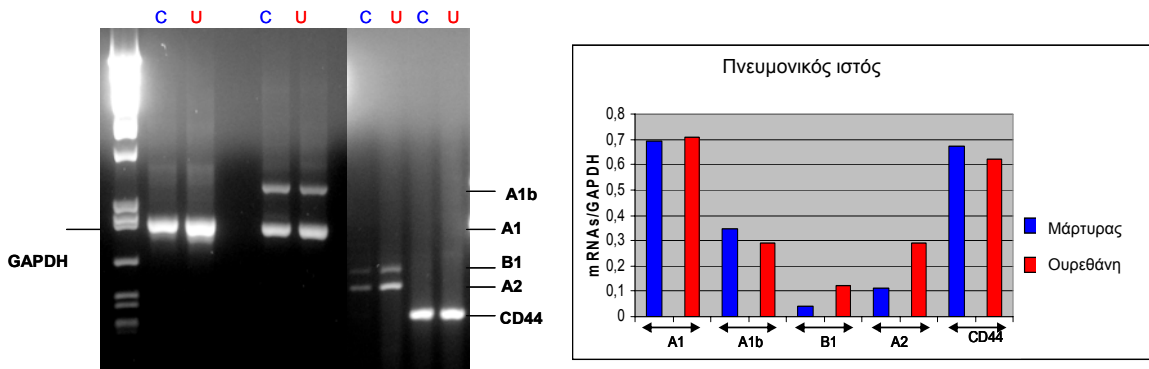


**Εικόνα Γ.13:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών RBP σε διαλυτά και μη διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από τον πνεύμονα ποντικών A/J μετά την χορήγηση (U) ή μη (C) ουρεθάνης, σε δύο χρονικά σημεία θανάτωσης (12 και 22 εβδομάδες). Ανάλυση ίσης ποσότητας συνολικής πρωτεΐνης (40μg) σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοσύτωση με τα αντισώματα: α-actin, α-HuR, α-TIA-1, α-hnRNP L (1:1000), α-hnRNP A1, α-hnRNP A2/B1 και α-hnRNP A3.

Με δεδομένα τα χαμηλά επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP A/B στον χημικά επαγόμενο καρκίνο του πνεύμονα στους ποντικούς A/J, προχωρήσαμε στην ανάλυση των επιπέδων των αντίστοιχων mRNAs μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού, στο σημείο θανάτωσης των ζώων 22 εβδομάδων. Έγινε απομόνωση ολικού RNA από τα διαλυτά κλάσματα πνευμονικού ιστού των ποντικών στελέχους A/J, 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η διαδικασία RT-PCR για την ενίσχυση ειδικών αλληλουχιών mRNA. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για τα mRNAs των A2/B1, A1 καθώς και του γνωστού ογκογονικού παράγοντα CD44. Η εμφάνιση ειδικών ισομορφών του CD44, προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος,

σχετίζεται με προχωρημένα καρκινικά στάδια και μεταστατικά φαινόμενα. Ο προσδιορισμός των σχετικών επιπέδων mRNAs έγινε βάση τον εσωτερικό δείκτη GAPDH.

Σε αντίθεση με τα χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP στον πνεύμονα ποντικών A/J (με ή χωρίς ουρεθάνη) και στα δύο χρονικά σημεία θανάτωσης (εικόνα Γ.13), τα επίπεδα των αντίστοιχων mRNAs των ποντικών στις 22 εβδομάδες ήταν εύκολα ανιχνεύσιμα (εικόνα Γ.14). Παρά ταύτα, δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα μεταξύ του μάρτυρα και του ζώου με καρκινικές εστίες. Πιθανή εξαίρεση αποτελεί το mRNA των hnRNP A2 και B1 που εμφανίζει μια μικρή αύξηση στο ζώο με τα καρκινώματα, όπως παρουσιάζεται και στο ιστόγραμμα της εικόνας Γ.14, γεγονός που χρειάζεται επιβεβαίωση. Σημειώνεται ότι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων, που αποτέλεσε και το κύριο μειονέκτημα της μελέτης, δεν επέτρεψε να βγουν ασφαλή συμπεράσματα. Οι εκκινητές των hnRNP A1 και A2/B1 που χρησιμοποιήθηκαν δίνουν και τις ισομορφές A1<sup>B</sup> και B1 αντίστοιχα, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Αναφορικά με τον παράγοντα CD44, τόσο ο πνευμονικός ιστός του μάρτυρα όσο και του ζώου με ουρεθάνη εμφάνισαν την μη-καρκινική (standard) ισομορφή του mRNA του παράγοντα CD44, απουσία μορφών σχετιζόμενων με την καρκινική και κυρίως μεταστατική εξαλλαγή των κυττάρων.



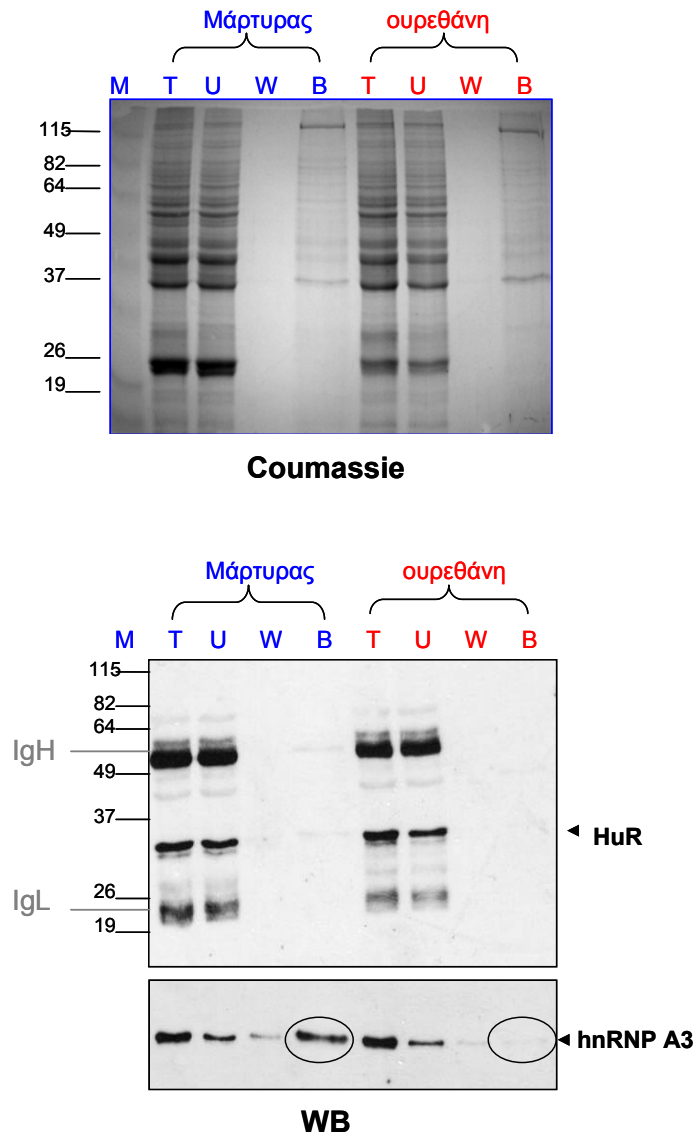
**Εικόνα Γ.14 :** Σύγκριση των επιπέδων mRNAs μέσω αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR), σε ολικό RNA προερχόμενο από πνεύμονα ποντικών A/J μετά την χορήγηση (U) ή μη (C) ουρεθάνης, στις 22 εβδομάδες θανάτωσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με την χρήση ειδικών εκκινητών για τα mRNAs των hnRNP A1, A2/B1, CD44 και της GAPDH ως εσωτερικού δείκτη. Παρουσίαση των σχετικών επιπέδων των mRNAs σε μορφή ιστογράμματος με αναγωγή ως προς GAPDH.



Η απουσία ενδείξεων για τυχόν υπερέκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A/B στον πνεύμονα των A/J ποντικών (εικόνα Γ.13) ήταν σε προφανή αναντιστοιχία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, κυρίως αναφορικά με την πρωτεΐνη hnRNP A2/B1 και πιθανά να υποδηλώνει την παρουσία άλλων μορφών απορύθμισης, όπως μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών RBP μετά από εμπλουτισμό πρωτεϊνών RBP μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης. Σκοπός ήταν να αναλυθούν οι πρωτεΐνες RBP βάση της ιδιότητάς τους να προσδέονται σε μονόκλωνο DNA και να συγκριθούν μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού για την εντόπιση πιθανών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση πρωτεϊνών RBP, μέσω στήλης συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης, από το σύνολο των διαλυτών κλασμάτων ιστού πνεύμονα των ποντικών A/J μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης στις 22 εβδομάδες. Οι πρωτεΐνες RBP που απομονώθηκαν σε όλα τα στάδια εμπλουτισμού στη στήλη αναλύθηκαν σε δύο παράλληλα πηκτώματα SDS-PAGE. Ακολούθησε χρώση του ενός πηκτώματος με Coomassie για μια ολική εικόνα των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν ή όχι από την στήλη, ενώ οι πρωτεΐνες του δεύτερου πηκτώματος μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου και έγινε ανοσοστύπωση με τα αντισώματα  $\alpha$ -hnRNPA3 (N) και  $\alpha$ -HuR.

Το αποτέλεσμα του πειράματος (χρώση με Coomassie) έδειξε την ειδική παρουσία πρωτεϊνών μοριακού βάρους 115-37 kDa στο κλάσμα B που προσδέθηκε στη στήλη. Εντούτοις, η γενική εικόνα των RBPs στο κλάσμα εμπλουτισμού δεν διαφέρει μεταξύ μάρτυρα και ζώου με ουρεθάνη (εικόνα Γ.15). Η ανοσοστύπωση με αντίσωμα κατά της hnRNP A3 έδειξε μια διαφορετική συμπεριφορά της πρωτεΐνης A3 με αυτή της πρωτεΐνης HuR. Συγκεκριμένα και με βάση την ιδιότητα της HuR να παραμένει μη προσδέσιμη στο ssDNA κλάσμα στον φυσιολογικό αλλά και στον καρκινικό ιστό, η πρωτεΐνη A3 χάνει την ιδιότητα αυτή στον καρκινικό ιστό. Η σημαντική αυτή αλλαγή αποτελεί ένδειξη για παρουσία, στο ζώο με ουρεθάνη, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης A3, πολύ πιθανά φωσφορυλιώσεων, που αλλάζουν το φορτίο της πρωτεΐνης και συνεπώς την ικανότητα πρόσδεσης στο ssDNA/RNA.



**Εικόνα Γ.15 :** Αλλαγή στην ικανότητα πρόσδεσης σε ssDNA της πρωτεΐνης hnRNPA3 από εκχύλισμα πνεύμονα ποντικού με ουρεθάνη σε αντιδιαστολή με φυσιολογικό ιστό (μάρτυρας)

Εφαρμογή στήλης συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης στα διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τον πνεύμονα ποντικών A/J, 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης: Εμπλουτισμός πρωτεϊνών RBP στο κλάσμα B που προσδένει στη στήλη. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών κατά την διαδικασία εμπλουτισμού μέσω στήλης συγγένειας ssDNA-κυτταρίνης σε πήκτωμα SDS-PAGE (10%). Χρώση με coomassie και παράλληλη ταυτοποίηση πρωτεϊνών RBP μετά την μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη από παράλληλο πήκτωμα. Ανοσοστύπωση με τα αντισώματα α-HuR και α-hnRNPA3 (N).

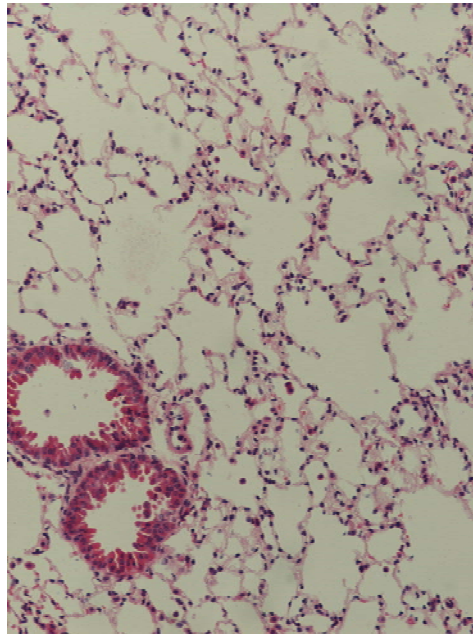
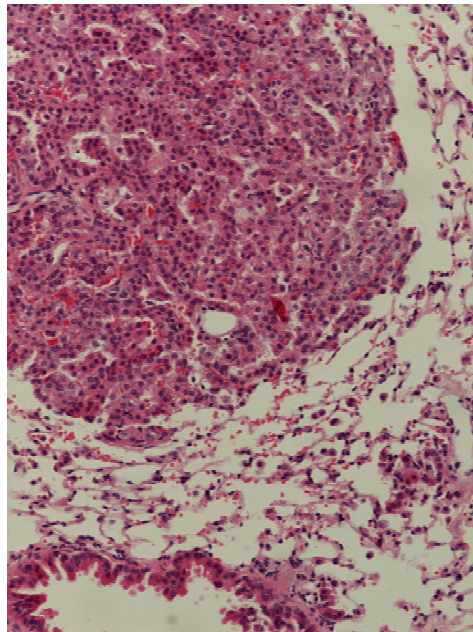
### **Γ.2.2.2 Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με ουρεθάνη σε ποντικούς στελέχους B6/129**

Η ευαισθησία του στελέχους A/J να αναπτύσσει αυθόρμητα όγκους, μαζί με το επιθετικό σχήμα χορήγησης του καρκινογόνου δεν επέτρεψε την διαθεσιμότητα ικανοποιητικού πνευμονικού ιστού για περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου και αναλυτικότερη μελέτη των διαφορών που εντοπίστηκαν, συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό. Ωστόσο, υπήρξε η δυνατότητα ελέγχου ενός διαφορετικού στελέχους ποντικού που αφορά το αμιγές στέλεχος B6/129, το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, συγκριτικά με το στέλεχος A/J, στην ουρεθάνη και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη νεοπλασιών (Συnergασία με Φλεμινγκ). Ο έλεγχος έγινε σε διαθέσιμο για ιστολογική εξέταση υλικό που αφορούσε τομές παραφίνης του πνευμονικού ιστού από ζώα-μάρτυρες και ζώα στα οποία χορηγήθηκε ουρεθάνη, όπως και στους ποντικούς A/J, ηλικίας περίπου 22 εβδομάδων. Παράλληλα, υπήρξε η δυνατότητα εξέτασης των επιπέδων έκφρασης των RBPs σε ολικά εκχυλίσματα του ιστού του πνεύμονα στα ίδια ζώα.

#### **Γ.2.2.2.1 Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική μελέτη φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους B6/129**

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από μάρτυρες και από ζώα με ουρεθάνη για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό του πνευμονικού ιστού, μέσω χρώσης με αιματοξυλίνη/ηωσίνη. Η πειραματική διαδικασία ήταν ίδια με αυτή της εικόνας Γ.11.

Όπως προκύπτει από την αντιπροσωπευτική εικόνα Γ.16, τα ζώα με τον χημικά επαγόμενο καρκίνο του πνεύμονα εμφάνισαν ορισμένες εστίες αδενοκαρκινωμάτων, σε αντίθεση με τους μάρτυρες. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η συχνότητα της καρκινικής εξαλλαγής σε αυτό το στέλεχος ήταν μικρότερη από το στέλεχος A/J τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά, δεδομένης διαφορετικής ευαισθησίας στην καρκινογόνο ουσία.

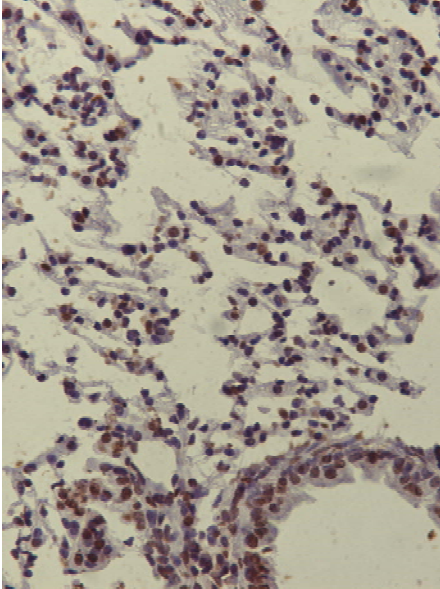
**Μάρτυρας****Ουρεθάνη**

**Εικόνα Γ.16 :** Μορφολογική ανάλυση του πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους B6/129, 22 περίπου εβδομάδες μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης. Χρώση με αιματοξυλίνη/ηωσίνη για την διαφοροποίηση πυρήνων και κυτταροπλάσματος, αντίστοιχα. Μεγέθυνση εικόνων 20x.

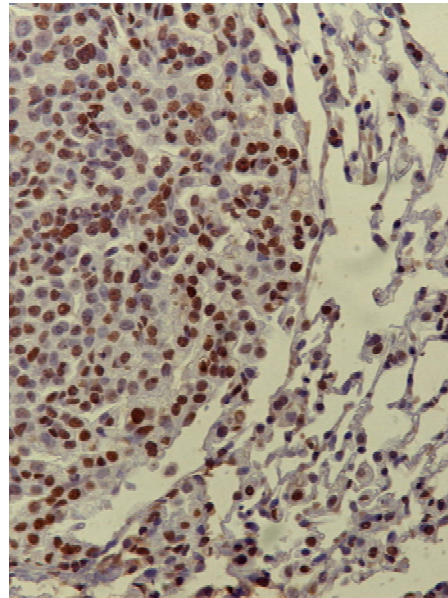
Σε παράλληλες τομές πνεύμονα με αυτές της εικόνας Γ.16 έγινε ο προσδιορισμός της έκφρασης και της υποκυτταρικής εντόπισης των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 των μαρτύρων και των ζώων που εμφάνισαν καρκινικές εστίες. Η ανοσοϊστοχημική εντόπιση έγινε μέσω των ειδικών, για την A1 και A2/B1 πρωτεΐνη, αντισωμάτων σε αραίωση 1:50, όπως ακριβώς και στην εικόνα Γ.12. Η χρώση που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση για τον εντοπισμό των δύο αντιγόνων ήταν η DAB, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε χρώση (counter stain) με αιματοξυλίνη.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας στους ποντικούς B6/129 ήταν σε γενικές γραμμές τα ίδια με το στέλεχος A/J (σύγκριση των εικόνων Γ.12 και Γ.17). Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 εντοπίστηκαν σχεδόν αποκλειστικά στο πυρηνικό διαμέρισμα των πνευμονικών κυψελιδικών και βρογχικών κυττάρων τόσο στους μάρτυρες (εικόνα Γ.17.A) όσο και στα ζώα με τις νεοπλασίες (εικόνα Γ.17.B). Σημειώθηκε χαμηλής έντασης και ετερογενής χρώση των πυρήνων με ορισμένα κύτταρα να εκφράζουν τις πρωτεΐνες ενώ άλλα όχι. Τα κύτταρα της καρκινικής εστίας εμφάνισαν παρόμοια ετερογένεια στην έκφραση ενώ σχετικά αυξημένη ένταση χρώσης εντοπίζεται μόνο σε μερικά καρκινικά κύτταρα.

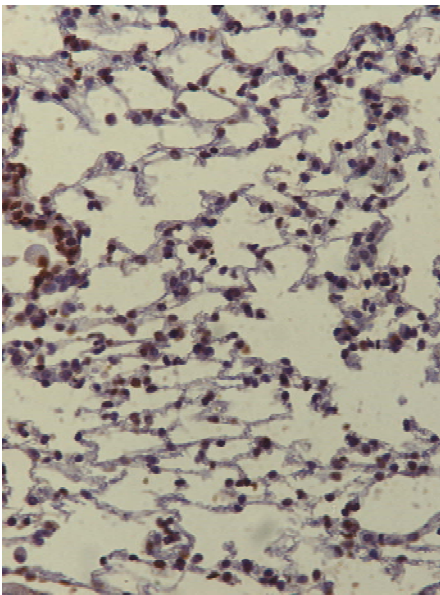
**Μάρτυρας: hnRNP A1**



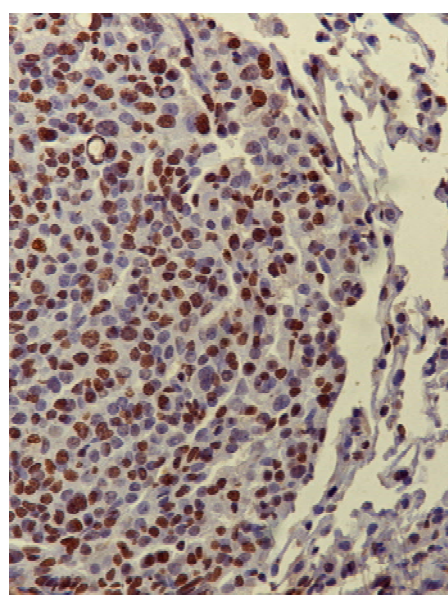
**Ουρεθάνη: hnRNP A1**



**Μάρτυρας: hnRNP A2/B1**



**Ουρεθάνη: hnRNP A2/B1**



**A.**

**B.**

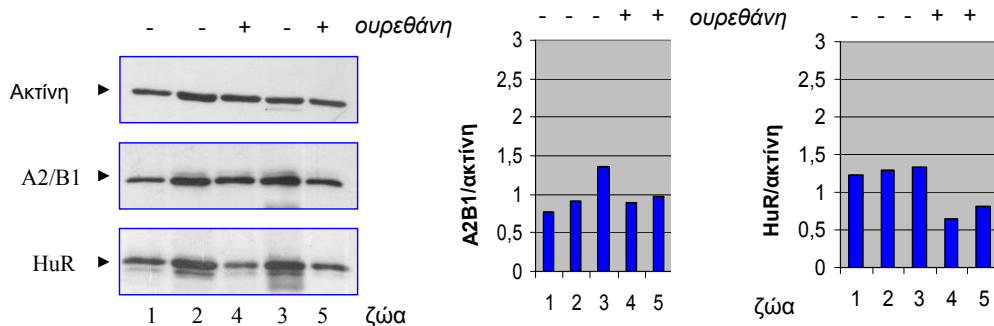
**Εικόνα Γ.17 :** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους B6/129, περίπου 22 εβδομάδες μετά την χορήγηση (B) ή μη (A) ουρεθάνης. Ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών hnRNP A/B μέσω των αντισωμάτων:  $\alpha$ -hnRNP A2/B1 και  $\alpha$ -hnRNP A1 σε αραιώση 1:50. Χρώση με DAB, μέγεθος εικόνων 40x.

Γενικώς η έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A2/B1 και A1 στο στέλεχος B6/129 δεν διέφερε από αυτή στο στέλεχος A/J. Συνολικά, ο καρκινικός ιστός δεν εμφάνισε σημάδια υπερέκφρασης των πρωτεϊνών A/B σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, με εξαίρεση μεμονωμένα κύτταρα της καρκινικής εστίας.

#### Γ.2.2.2 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP και HuR στον πνεύμονα ποντικών στελέχους B6/129 μετά από χορήγηση ουρεθάνης

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP A/B στο στέλεχος B6/129 έγινε βιοχημική ανάλυση των επιπέδων τους σε ολικά εκχυλίσματα του πνευμονικού ιστού στα ζώα-μάρτυρες και στα ζώα μετά την χορήγηση ουρεθάνης. Παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα σε διάλυμα λύσης και οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE. Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η ανοσοσύτρωση με ειδικά αντισώματα επέτρεψε την ταυτοποίηση δύο αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών RBP, της hnRNP A2/B1 και της HuR. Η σύγκριση των επιπέδων μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού έγινε με βάση τα επίπεδα της ακτίνης ως εσωτερικού δείκτη.

Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.18, η έκφραση της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των ζώων-μαρτύρων και των ζώων με λήψη ουρεθάνης. Αντίθετα, όσον αφορά την πρωτεΐνη HuR σημειώθηκε μείωση σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα της εικόνας, κυρίως όσον αφορά την πρωτεΐνη HuR. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών σε αυτό το στέλεχος είναι υψηλότερα συγκριτικά με το στέλεχος A/J πιθανόν λόγω διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου.



**Εικόνα Γ.18:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών RBP σε ολικά εκχυλίσματα προερχόμενα από τον πνεύμονα ποντικών B6/129 μετά την χορήγηση (+) ή μη (-) ουρεθάνης και παρέλευση 40 εβδομάδων. Ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE

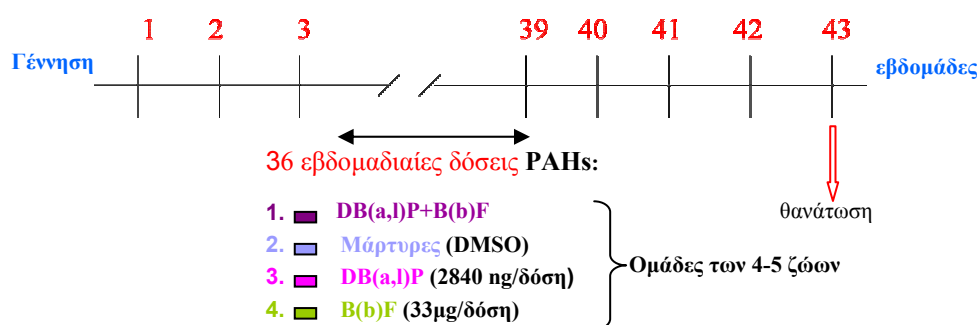
10% και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοστύπωση με τα αντισώματα:  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -HuR και  $\alpha$ -hnRNPA2/B1. Πυκνομέτρηση των ζωνών και παρουσίαση σε μορφή ιστογράμματος των σχετικών ως προς ακτίνη επιπέδων των δύο πρωτεϊνών.

### **Γ.2.2.3 Χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) σε ποντικούς στελέχους CD-1**

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την ανάλυση των δύο χημικά επαγόμενων με ουρεθάνη πειραματικών προτύπων καρκινογένεσης του πνεύμονα (στελέχη A/J και B6/129) έδειξαν ότι πρωτεΐνες RBP, hnRNP A/B και HuR, έχουν διαφορετική συμπεριφορά στον ποντικό συγκριτικά με τον άνθρωπο. Η έκφρασή τους παρέμεινε στα ίδια επίπεδα στον καρκινικό όσο και στον φυσιολογικό ιστό του ποντικού, ενώ υπήρξαν περιπτώσεις με μειωμένα καρκινικά επίπεδα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.18. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων και για μια πιο λεπτομερή εξέταση του φαινομένου, υπήρξε η δυνατότητα διερεύνησης και ενός τρίτου πειραματικού προτύπου καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό αναφέρεται στο μη αμιγές στέλεχος CD1. Η μελέτη αυτή προσαρτήθηκε στα πλαίσια της εκτέλεσης μεγάλης κλίμακας πειραματικής διαδικασίας του εργαστηρίου χημικής καρκινογένεσης του IBEB (υπευθ. Δρ. Σ. Κυρτόπουλος). Στα ζώα χορηγήθηκαν δύο τύποι αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων (PAHs) οι οποίοι δρουν: 1) ως εκκινητής [DB(a,l)P=Dibenzo(a,l)pyrene] και 2) ως προαγωγός [B(b)F= Benzo(b)fluorantrene] του καρκινικού φαινομένου και μπορούν σε συνδυασμό να προκαλέσουν καρκινική εξαλλαγή με κύριο στόχο τον πνεύμονα του ζώου.

Συγκεκριμένα, τρεις εβδομάδες μετά την γέννηση δόθηκαν σε ομάδες των τεσσάρων ή πέντε ζώων στελέχους CD1, 36 ενέσιμες δόσεις των 2840ng και 33μg των δύο αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων DB(a,l)P και B(b)F αντίστοιχα, χωριστά ή σε συνδυασμό. Παράλληλα, σε μια ομάδα ζώων της ίδιας ηλικίας χορηγήθηκε μόνο DMSO ως το μέσο διαλυτοποίησης των PAH (ζώα-μάρτυρες). Όλα τα ζώα θανατώθηκαν στις σαράντα τρεις εβδομάδες. Το συνολικό σχήμα χορήγησης παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα Γ.19.





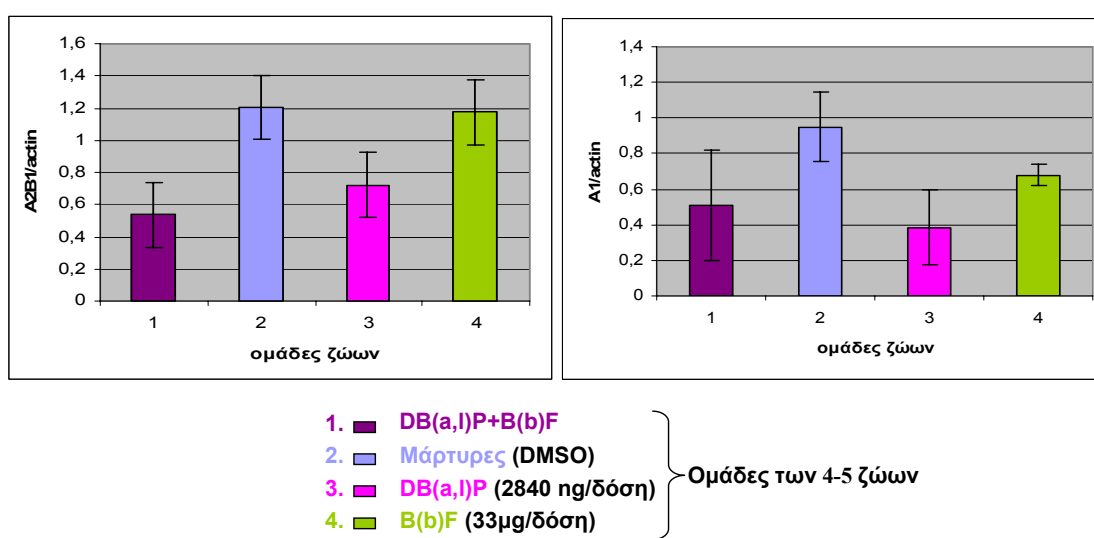
**Εικόνα Γ.19:** Σχηματική παρουσίαση χορήγησης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων DB(a,l)P και B(b)F σε στελέχη CD1 (εργ. Χημικής Καρκινογένεσης, ΕΙΕ). Τέσσερις (1-4)ομάδες 4-5 ζώων: 1<sup>η</sup> ομάδα = συνδυασμένη χορήγηση των DB(a,l)P και B(b)F, 2<sup>η</sup> ομάδα = χορήγηση του μέσου διαλυτοποίησης DMSO (μάρτυρες), 3<sup>η</sup> ομάδα = DB(a,l)P και 4<sup>η</sup> ομάδα = B(b)F.

#### Γ.2.2.3.1 Βιοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP στον πνεύμονα ποντικών CD1

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του πνευμονικού ιστού των ποντικών CD1 μέσω αιματοξυλίνης/ηωσίνης έδειξε ότι, το 80% των ζώων που πήραν την συνδυασμένη, διπλή δόση εκκινητή και προαγωγού εμφάνισαν αδενώματα, σε αντιδιαστολή με τα ζώα που πήραν απλές δόσεις ή με τα ζώα μάρτυρες (μη εικονιζόμενο αποτέλεσμα). Για την σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών RBP μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού πνευμονικού ιστού, ακολούθησε βιοχημικός έλεγχος των επιπέδων των πρωτεϊνών RBP στις τέσσερις ομάδες ζώων. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν, όπως και στην περίπτωση των ποντικών στελέχους A/J, διαλυτά κλάσματα μετά την ομογενοποίηση του πνευμονικού ιστού και οι πρωτεΐνες των αντίστοιχων εκχυλισμάτων αναλύθηκαν σε πηκτώματα SDS-PAGE. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοστύπωση με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών hnRNP A/B καθώς και της ακτίνης ως εσωτερικό πρωτεϊνικό δείκτη. Ίδια ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης (40μg) χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των επιπέδων των υπό διερεύνηση πρωτεϊνών, όπως και στην περίπτωση του στελέχους A/J.

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω ανάλυση των hnRNP A/B και συγκεκριμένα των hnRNP A1 και A2/B1, στους ιστούς πνεύμονα κάθε ομάδας ποντικών CD1 δεν ήταν και εδώ τα αναμενόμενα με τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα όπου παρατηρείται

συχνή αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B στον καρκινικό συγκριτικά με τον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό. Στα ζώα με συνδιασμό των PAHs και παρά την εμφάνιση αδενωμάτων τα επίπεδα των πρωτεϊνών ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τους μάρτυρες καθώς και την ομάδα των ζώων με την απλή χορήγηση του παράγοντα-προαγωγού B(b)F. Το ίδιο μειωμένα με την συνδιαστική δράση ήταν και τα επίπεδα των hnRNPA/B στην ομάδα που πήρε μόνο τον παράγοντα-εκκινητή DB(a,l)P. Ο ανοσοεντοπισμός της HuR έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των hnRNP A/B (μη εικονιζόμενο αποτέλεσμα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά, με την μορφή ιστογράμματος, στην εικόνα Γ.20.



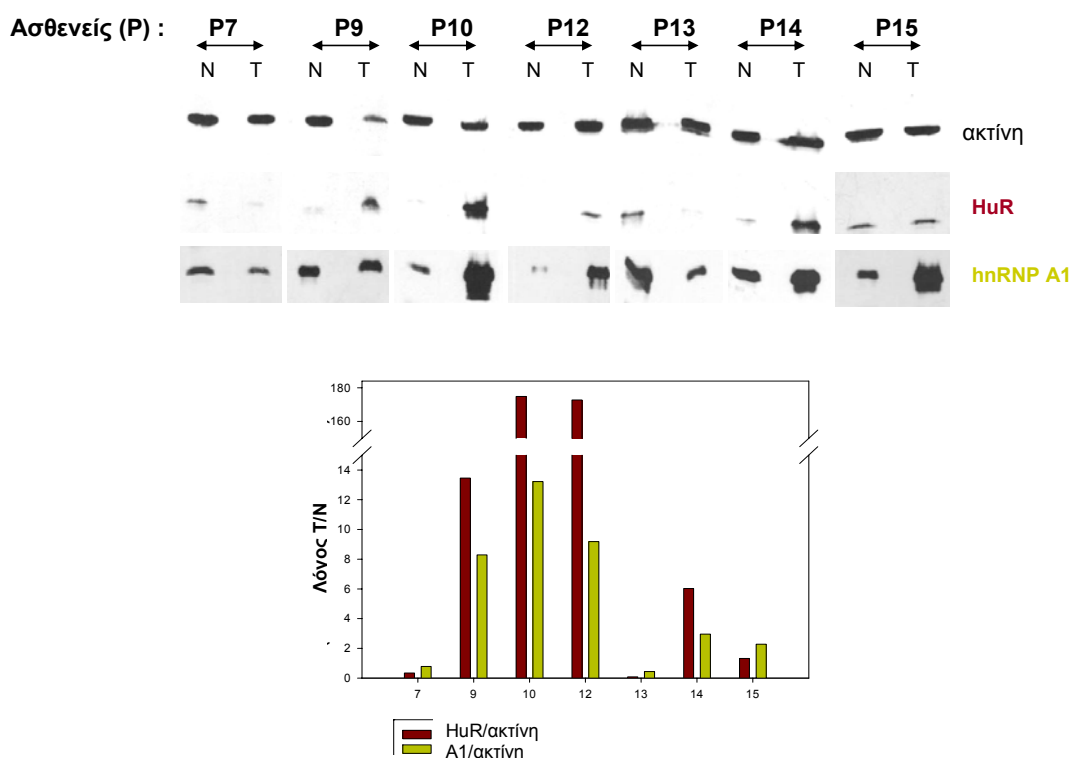
**Εικόνα Γ.20:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 στα διαλυτά κλάσματα του πνευμονικού ιστού ποντικών στελέχους CD1 μετά την χορήγηση της συνδιαστικής (1) ή απλής χορήγησης (3,4) των δύο πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων [DB(a,l)P, B(b)F], καθώς και μη χορήγησης (ζώα-μάρτυρες, 2) στο χρονικό σημείο θανάτωσης των 43 εβδομάδων. Ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοστύπωση με τα αντισώματα: α-actin, α-hnRNP A1 και α-hnRNP A2/B1. Πυκνομέτρηση των αντιγονικών ζωνών και αναγωγή των επιπέδων των πρωτεϊνών ως προς ακτίνη. Παρουσίαση των σχετικών ως προς ακτίνη επιπέδων των δύο πρωτεϊνών σε μορφή ιστογράμματος, καθώς και του εύρους διακυμάνσεων των επιπέδων σε κάθε ομάδα ζώων.

#### Γ.2.2.4 Έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP και HuR σε ανθρώπινες βιοψίες του πνεύμονα

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσον αφορά τα επίπεδα των RBPs (hnRNP A/B και HuR) στον καρκίνο του πνεύμονα από τα τρία διαφορετικά ζωικά μοντέλα που

εξετάστηκαν ήταν σε προφανή αντιδιαστολή με τα δεδομένα στον ανθρώπινο πνευμονικό ιστό αλλά και με ότι είχε δημοσιευτεί μέχρι την δεδομένη χρονική στιγμή στα τρωκτικά. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών RBP στον καρκινικό ιστό πνεύμονα ήταν, σε γενικές γραμμές, στα αντίστοιχα με τον φυσιολογικό πνεύμονα επίπεδα χωρίς ενδείξεις υπερέκφρασης. Εντοπίστηκαν μικρές διαφορές στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών ανάμεσα στα τρία στελέχη ποντικών. Οι διαφορές αυτές κυμαίνονται από μη αξιόλογες αυξομειώσεις έως και σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών στον καρκινικό, συγκρινόμενο με τον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό. Ειδικότερα, υπήρξαν περιπτώσεις όπου η έκφραση πρωτεϊνών RBP ήταν μειωμένη στον καρκίνο του πνεύμονα, συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό, όπως παρατηρήθηκε στα στελέχη B6/129 και CD1, σε αντίθεση με τα A/J. Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα που προκύπτουν στα τρωκτικά δεν προσομοιάζουν την εικόνα που επικρατεί στον άνθρωπο. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων εξετάστηκαν παράλληλα ανθρώπινες βιοψίες του πνεύμονα που υπήρχαν σε διαθεσιμότητα στο εργαστήριο και αποτελούν το υλικό της έρευνας του υποψήφιου διδάκτορα Γ.Μπουκάκη. Παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα βιοψιών του πνεύμονα, με διάλυμα λύσης, από επτά ασθενείς. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη βιοψιών και έγινε σύγκριση του καρκινικού ιστού σε άμεση αναφορά με τον παρακείμενο, φυσιολογικό ιστό από τον ίδιο ασθενή. Οι πρωτεΐνες που κατά κύριο λόγο εξετάστηκαν ήταν η hnRNP A1 και η HuR. Το κριτήριο επιλογής αυτών των δύο πρωτεϊνών βασίστηκε στην ανάγκη που προέκυψε να συγκριθούν μία πρότυπη πρωτεΐνη hnRNP και μία άλλη RBP πρωτεΐνη με γνωστή συμμετοχή στην καρκινική εξαλλαγή, όπως ήδη εξετάστηκαν συγκριτικά στον χημικά επαγόμενο καρκίνο του πνεύμονα στα τρωκτικά.

Παρουσιάζεται, σε μορφή ιστογράμματος (εικόνα Γ.21), η σχέση καρκινικού (T) ως προς τον παρακείμενο φυσιολογικό (N) πνευμονικό ιστό. Πέντε στους επτά ασθενείς εμφανίζουν παράλληλη, εμφανή υπερέκφραση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και HuR στον καρκινικό συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε τρεις ασθενείς (9, 10 και 12) η έκφραση των πρωτεϊνών στον καρκινικό ιστό φτάνει σε πολύ υψηλά επίπεδα (λόγος T/N>8).



**Εικόνα Γ.21:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A1 και HuR σε ολικά εκχυλίσματα προερχόμενα από ζεύγη βιοψιών καρκινικού (T) και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού (N) του πνεύμονα από επτά ασθενείς. Ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE 10% και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοστύπωση με τα αντισώματα:  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -HuR και  $\alpha$ -hnRNP A1. Παρουσίαση σε μορφή ιστογράμματος του λόγου καρκινικού/φυσιολογικού ιστού (T / N) των δύο πρωτεϊνών για κάθε ασθενή, μετά από την αναγωγή ως προς ακτίνη.

### Γ.2.3 Μείωση των επιπέδων της hnRNPA3 με siRNA σε κυτταρικές σειρές ποντικού

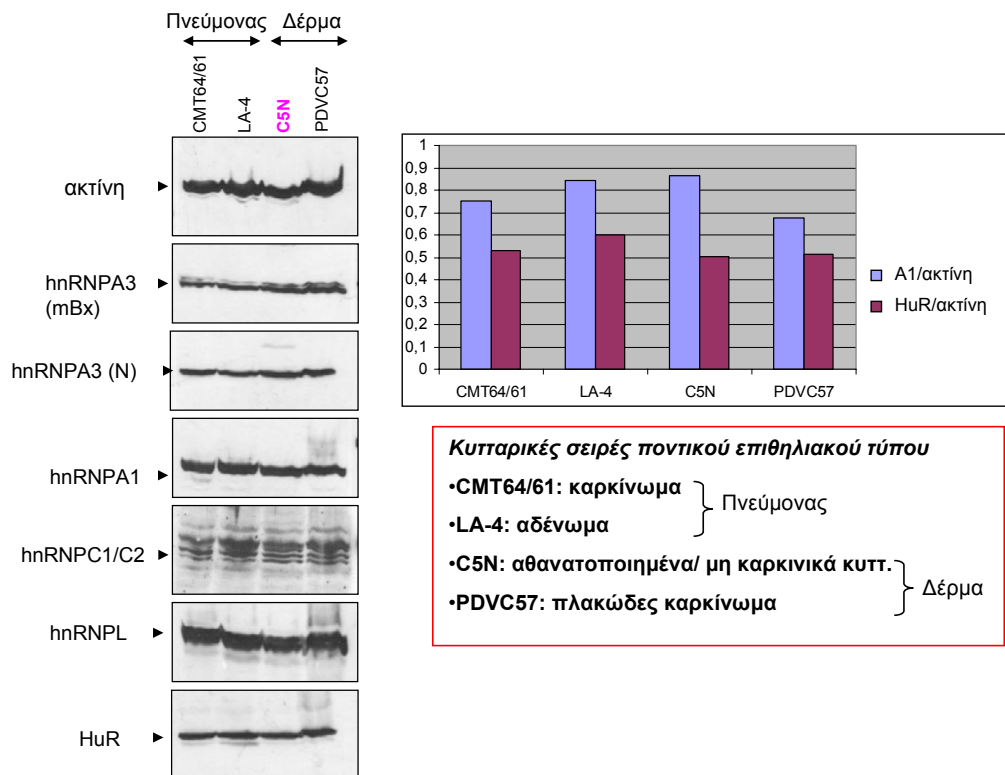
Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις στα πειραματικά μοντέλα του ποντικού και λόγω εξάντλησης του διαθέσιμου πνευμονικού ιστού των ποντικών για περαιτέρω διερεύνηση, θεωρήθηκε σκόπιμο να συμπληρωθεί η μελέτη με την εισαγωγή καρκινικών κυτταρικών σειρών επιθηλιακού τύπου από πνεύμονα ποντικού. Αυτό θα επέτρεπε να διερευνηθεί περαιτέρω η έκφραση των πρωτεϊνών RBP στην καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα σε κυτταρικά πειραματικά μοντέλα. Μια πρώτη προσπάθεια στην κατεύθυνση αυτή ήταν η αναζήτηση ζεύγους ισογονικών κυτταρικών σειρών ποντικού με προέλευση από φυσιολογικό και καρκινικό ιστό του πνεύμονα όπως είναι τα ζεύγη E10/E9 και C10/A5 (αθανατοποιημένα μη καρκινικά/νεοπλαστικά κύτταρα)

(Peebles, et. al., 2007). Οι σειρές αυτές δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες και δεν κατέστη δυνατή η διάθεσή τους από το εργαστήριο της ομάδας του Malkinson. Αυτό οδήγησε στον περιορισμό της μελέτης σε δύο, εμπορικά διαθέσιμες καρκινικές, επιθηλιακές κυτταρικές σειρές που αντιπροσωπεύουν δύο στάδια εξέλιξης του πνευμονικού καρκίνου: την προ-καρκινική σειρά LA-4 τύπου αδενώματος και την CMT64/61, τύπου καρκινώματος. Μια άλλη δυσκολία ήταν η ανεύρεση μίας κυτταρικής σειράς πνεύμονα ποντικού που να αντιστοιχεί σε φυσιολογικό πνευμονικό επιθήλιο. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε, παράλληλα με τις καρκινικές σειρές του πνεύμονα, η αθνατοποιημένη κυτταρική σειρά C5N επιθηλιακού τύπου από δέρμα ποντικού (διαθέσιμη από τον Δρ. Β. Ζουμπουρλή, IBEB-EIE, καθώς και η PDVC57 που αντιστοιχεί σε καρκινικά κύτταρα πλακώδους επιθηλίου). Αρχικός στόχος ήταν να συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP και HuR μεταξύ των τεσσάρων επιθηλιακών κυτταρικών σειρών ποντικού που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια καρκινικής εξαλλαγής.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από τις τέσσερις επιθηλιακές κυτταρικές σειρές LA-4, CMT64/61, C5N και PDVC57 και έγινε ανάλυση των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων σε πήκτωμα SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν ηλεκτροφορητικά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοχημικός προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP και HuR μέσω των αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNP A1, των δύο αντισωμάτων κατά της hnRNP A3 [ $\alpha$ -hnRNP A3 (N),  $\alpha$ -hnRNP A3 (Ct)],  $\alpha$ -hnRNP C1/C2,  $\alpha$ -hnRNP L και  $\alpha$ -HuR και αναγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων προς την ακτίνη.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.22, ανιχνεύονται σε σχετικά υψηλά επίπεδα οι πρωτεΐνες hnRNP και HuR χωρίς όμως να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων κυτταρικών σειρών. Ιδιαίτερα, σημασία αποδίδεται στην απουσία διαφοροποίησης στην έκφραση των πρωτεϊνών ανάμεσα στις προ- και καρκινικές σειρές και στη μη-καρκινική αθνατοποιημένη κυτταρική σειρά C5N. Το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον υψηλό βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, χαρακτηριστικό που εμφανίζουν οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές (καρκινικές ή μη) έναντι του πνευμονικού ιστού καθώς και πρωτογενών καλλιιεργειών του πνεύμονα. Στο ιστόγραμμα της εικόνας Γ.22 παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα αντιπροσωπευτικών

πρωτεϊνών RBP, της hnRNP A1 και της HuR, στις τέσσερις κυτταρικές σειρές ποντικού.

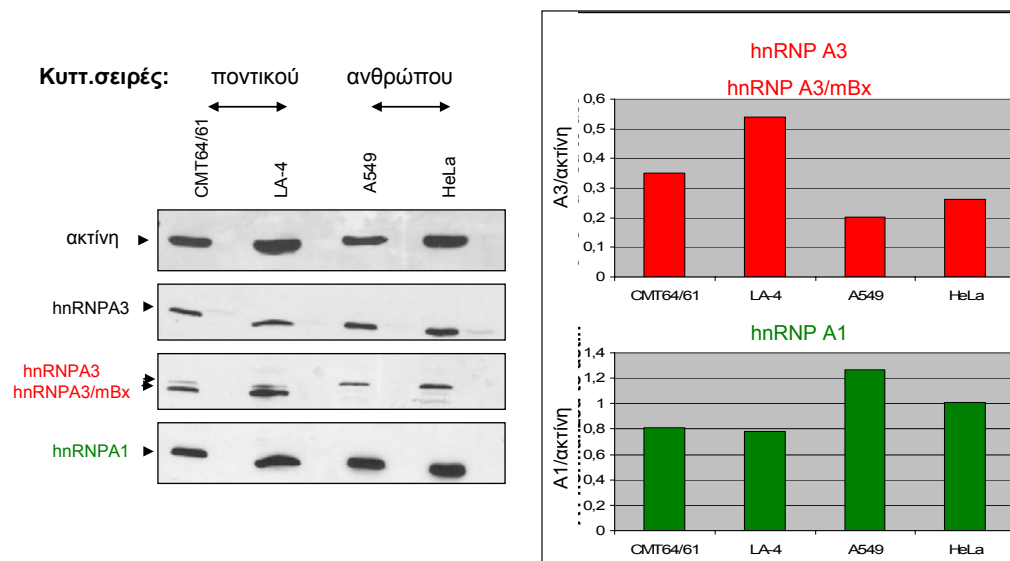


**Εικόνα Γ.22:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός και σύγκριση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών hnRNP και HuR σε ολικά εκχυλίσματα επιθηλιακών κυτταρικών σειρών ποντικού (LA-4, CMT64/61, C5N, PDVC57). Ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανοσοσύτωση με τα αντισώματα: α-actin, α-HuR, α-hnRNP A1, α-hnRNP A3(N), α-hnRNP A3/mBx, α-hnRNP C1/C2 και α-hnRNP L. Αντιπροσωπευτική παρουσίαση των σχετικών ως προς ακτίνη επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A1 και HuR, σε μορφή ιστογράμματος.

Η διαθεσιμότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα ποντικού μαζί με τις ανθρώπινες καρκινικές σειρές A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα) και HeLa επέτρεψαν μια περαιτέρω σύγκριση των πρωτεϊνικών ισομορφών της hnRNP A3 μεταξύ ανθρώπινων κυττάρων και ποντικού. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των τεσσάρων κυτταρικών σειρών. Μετά από την ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πήκτώματα SDS-PAGE και την μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πραγματοποιήθηκε ανοσοεντόπιση των ισομορφικών τύπων της hnRNP A3 (hnRNP A3 και A3/mBx) και της A1 με τα ειδικά αντισώματα. Η σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B έγινε

χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό δείκτη την ακτίνη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή ιστογράμματος στην εικόνα Γ.23.

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής διαδικασίας ήταν επιβεβαιωτικά όσον αφορά την αφθονία της ισομορφής hnRNP A3/mBx στα τρωκτικά, σε αντίθεση με την εμφανή απουσία της στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Επιπρόσθετα, στο σύνολό της η πρωτεΐνη hnRNP A3 (hnRNP A3 και A3/mBx μαζί) υπερέχει έναντι της A1 στα τρωκτικά, σε αντιδιαστολή με τα ανθρώπινα κύτταρα, όπως παρουσιάζεται στο ιστόγραμμα της εικόνας Γ.23.



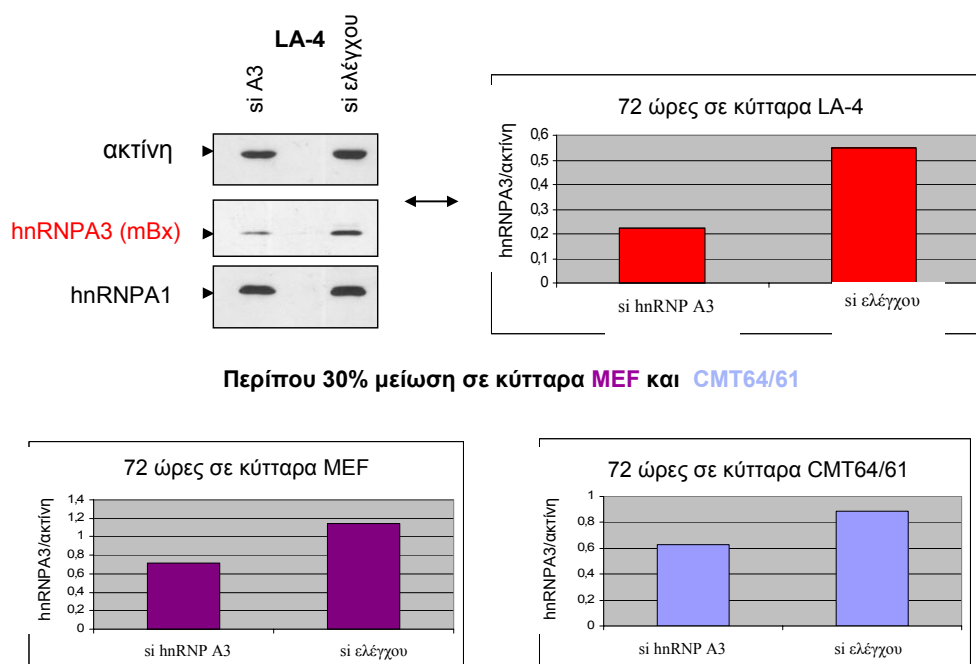
**Εικόνα Γ.23:** Ανοσοχημικός χαρακτηρισμός της hnRNP A3/mBx ως της κύριας ισομορφής στα τρωκτικά-Σύγκριση με ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Ανάλυση των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν από τις καρκινικές σειρές ποντικού: LA-4, CMT64/61 και ανθρώπου: A549 και HeLa σε πήκτωμα SDS-PAGE (10%). Ανοσοσύτωση με τα αντισώματα:  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -hnRNP A1,  $\alpha$ -hnRNP A3(N) και  $\alpha$ -hnRNP A3/mBx. Παρουσίαση των σχετικών επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A1 και hnRNP A3 στις 4 κυτταρικές σειρές, σε μορφή ιστογράμματος: αναγωγή ως προς ακτίνη.

Η παρουσία της νέας, άφθονης ισομορφής της hnRNP A3 στα τρωκτικά μαζί με την έλλειψη στοιχείων για τον ειδικό της ρόλο συγκριτικά με τις άλλες πρωτεΐνες A/B (hnRNP A1, A2/B1) καθιστά ενδιαφέρουσα την διερεύνηση του ρόλου της στα τρωκτικά. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν πειράματα με siRNA σε κυτταρικές σειρές ποντικού με στόχο την μείωση των επιπέδων της hnRNP A3. Τα πειράματα αυτά ανοίγουν τον δρόμο για την ταυτοποίηση mRNA-στόχων της πρωτεΐνης hnRNP A3 αρχικά σε κύτταρα ποντικού και μετέπειτα σε ανθρώπινα κύτταρα.

Για τον έλεγχο της αποδοτικότητας στην εφαρμογή των siRNA κατά της πρωτεΐνης hnRNP A3 δοκιμάστηκαν διάφορα σχήματα όπως: α) διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, β) διαφορετικές συγκεντρώσεις siRNA και μέσου επιμόλυνσης (lipofectamine) και γ) αλλαγές στο σχήμα (μία ή δύο επιμόλυνσεις) και στον χρόνο εφαρμογής. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε τρεις κυτταρικές σειρές ποντικού, LA-4, CMT64/61 και πρωτογενή κύτταρα MEF (εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού) με επιμόλυνση των κυττάρων με μείγμα τεσσάρων siRNA-στόχων για το mRNA της hnRNP A3 παράλληλα με μη ειδικό μείγμα siRNA ως μάρτυρα, ακολουθώντας σε γενικές γραμμές το πρωτόκολλο της εταιρίας. Εβδομήντα δύο ώρες μετά την πρώτη επιμόλυνση, μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων κάθε δείγματος και προστέθηκε στα κυτταρικά ιζήματα το αποδιατακτικό διάλυμα SDS sample buffer. Πρωτεϊνικά δείγματα που αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων αναλύθηκαν σε πηκτώματα SDS-PAGE και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης όπου και πραγματοποιήθηκε ανοσοστύπωση με τα ειδικά αντισώματα κατά της ισομορφής hnRNP A3/mBx, της hnRNP A1 και της ακτίνης (εσωτερικός δείκτης). Τα σχετικά ως προς ακτίνη επίπεδα της hnRNP A3 στις τρεις κυτταρικές σειρές και μεταξύ των δειγμάτων siRNA-control και siRNA της hnRNP A3 παρουσιάζονται με την μορφή ιστογράμματος (εικόνα Γ.24). Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης hnRNP A3 στις κυτταρικές σειρές CMT64/61 και MEF δεν ήταν σημαντική (περίπου 30%). Στα προ-καρκινικά πνευμονοκύτταρα LA-4, προσμετρήθηκε αρχικά μείωση των επιπέδων της hnRNP A3 κατά 60%. Επιπρόσθετα, η μείωση θεωρείται ειδική για την hnRNP A3, αφού δεν συνοδεύεται από παράλληλες αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεΐνης hnRNP A1 μεταξύ των siRNA-control και siRNA της A3. Σημειώνεται ότι στην εικόνα Γ.24 παρουσιάζονται τα πλέον αποδοτικά πειράματα siRNA δεδομένου ότι υπήρξε μη επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, κυρίως αναφορικά με την κυτταρική σειρά LA-4 όπου το εύρος της μείωσης κυμάνθηκε μεταξύ 20 και 60%. Απώτερος στόχος είναι η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα LA-4 με και χωρίς μείωση των επιπέδων της hnRNP A3 για την ταυτοποίηση mRNA-στόχων, με προοπτική να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης hnRNP A3 στα τρωκτικά και ο πιθανός συσχετισμός των mRNA-στόχων με τα στάδια του καρκινικού μετασχηματισμού των κυττάρων.





**Εικόνα Γ.24:** Πειράματα ελέγχου siRNA για hnRNP A3 σε τρεις κυτταρικές σειρές ποντικού.

Ανοσοστύπωση μεμβράνης με τα αντισώματα:  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -hnRNP A3/mBx και  $\alpha$ -hnRNP A1. Στην μεμβράνη έχουν μεταφερθεί, μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων έπειτα από επιμόλυνση των κυττάρων LA-4 για 6 ώρες ή δύο διαδοχικές επιμολύνσεις των MEF και CMT64/61 για 24 ώρες με siRNA κατά της hnRNP A3 ή με siRNA ελέγχου, αντίστοιχα. Τα σχετικά ως προς ακτίνη επίπεδα των πρωτεϊνών παρουσιάζονται με την μορφή ιστογράμματος.

### Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RBP: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ hnRNP ΚΑΙ HuR

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η HuR είναι μια άφθονη, κατεξοχήν πυρηνική πρωτεΐνη RBP, ικανή να παλινδρομεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, χαρακτηριστικά τα οποία μοιράζεται με τις περισσότερες πρωτεΐνες hnRNP. Παρά το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της HuR (περίπου 90%) εντοπίζεται στον πυρήνα (Keene, 1999, Gallouzi and Steitz, 2001), υπάρχουν λίγες βιβλιογραφικές αναφορές για τον πυρηνικό ρόλο της (Hinman and Lou, 2008). Επιπρόσθετα, υπάρχουν περιορισμένες δημοσιεύσεις που υποδηλώνουν την ικανότητα διασύνδεσης της HuR με μέλη της οικογένειας των hnRNPs (Gallouzi, et. al., 2001, Lal, et. al., 2004).

Στην παρούσα εργασία, ο αρχικός εντοπισμός της πρωτεΐνης HuR σε πυρηνικό ανοσοίζημα μέσω αντισώματος κατά της hnRNP A1 (ενότητα Γ.1.1, εικόνα Γ.3) μας υπέδειξε ότι ενδεχομένως η HuR να βρίσκεται σε σταθερή διασύνδεση με σύμπλοκα hnRNP. Η άμεση εφαρμογή των αντισωμάτων κατά της HuR δεν ήταν εφικτή δεδομένης της αδυναμίας του αντισώματος 3A2 να συν-κατακρημνίσει, σε κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και Novikoff, εκτός από την ίδια την HuR, άλλες πρωτεΐνες hnRNP (ενότητα Γ.1.1, εικόνα Γ.2.A). Το γεγονός μας οδήγησε στην εφαρμογή μιας σειράς ανοσοκατακρημνίσεων μέσω μονόκλωνων αντισωμάτων με δεδομένη ειδικότητα κατά πρωτεϊνών hnRNP και ικανότητα ανοσοκατακρήμνισης συμπλόκων hnRNP, με στόχο να διερευνηθεί η παρουσία της HuR στα αντίστοιχα ανοσοσυμπλέγματα.

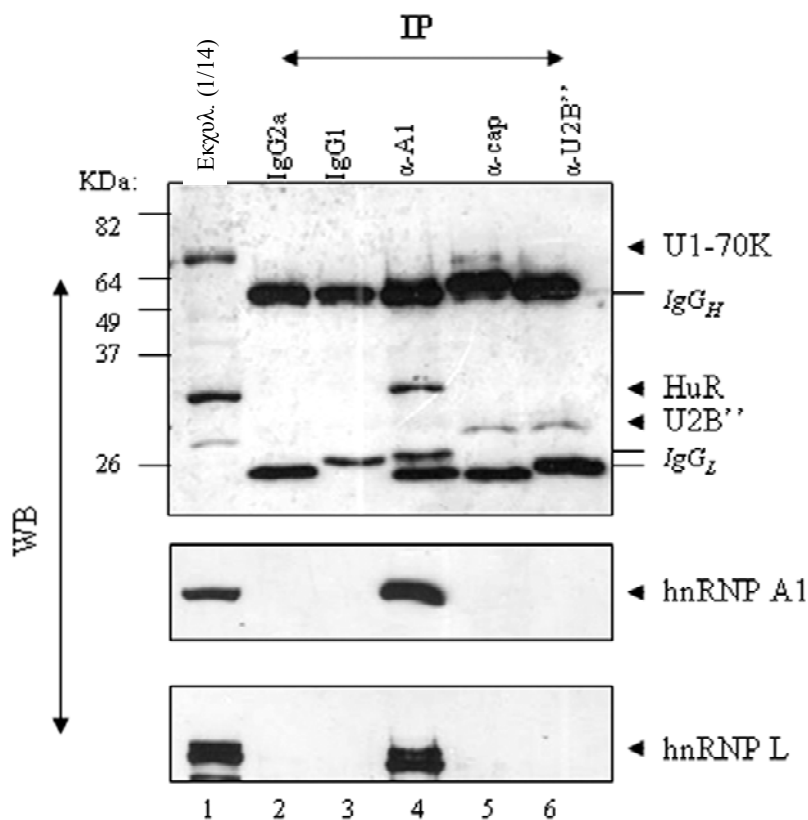
### **Γ.3.1 Η παρουσία της πρωτεΐνης HuR σε σύμπλοκα hnRNP και mRNP που απομονώθηκαν από ανθρώπινα κυτταρικά εκχυλίσματα**

Η απομόνωση πυρηνικών hnRNP/mRNP αλλά και κυτταροπλασματικών mRNP συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης (IP) σε ανθρώπινα κυτταρικά εκχυλίσματα (κύτταρα HeLa και A549) τα οποία παρασκευάστηκαν σε συνθήκες φυσιολογικής αλατότητας (150mM NaCl) (κατά Dreyfuss, et. al., 1984). Με ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, έγινε ανοσοεντόπιση μέσω των ειδικών αντισωμάτων των αντιγονικών και των συγκατακρημνιζόμενων πρωτεϊνών.

Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα της διαφαινόμενης διασύνδεσης μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP A1 και HuR, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων A549 με την χρήση αντισωμάτων κατά της hnRNP A1, χρησιμοποιώντας παράλληλα και αντισώματα κατά δύο πρωτεϊνών που είναι συστατικά των συμπλόκων U-snRNP του ματισματοσώματος (τη δομή καλύμματος-cap-των U-snRNAs και την πρωτεΐνη U2B'' του συμπλόκου U2 snRNP). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και ισοτυπικά αντισώματα ποντικού IgG1 και IgG2a ως αρνητικοί μάρτυρες. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών των ανοσοιζημάτων και του πυρηνικού εκχυλίσματος σε πήκτωμα SDS-PAGE και ανοσοσύτωση με τα αντισώματα αντι-hnRNP A1, -L, -HuR, -U1 70K και αντι-U2B''.

Στην εικόνα Γ.25 φαίνεται η ειδική παρουσία της HuR στο ανοσοίζημα μέσω του αντισώματος της hnRNP A1 και η απουσία της από τα σύμπλοκα U-snRNPs. Το

γεγονός ότι η HuR συγκατακρημνίζεται με τα σύμπλοκα hnRNP επιβεβαιώθηκε από την συνύπαρξη, στο ανοσοϊζήμα, και των άλλων hnRNP A/B καθώς και επιπλέον πρωτεϊνών hnRNP, όπως η hnRNP L που παρουσιάζεται στην εικόνα.



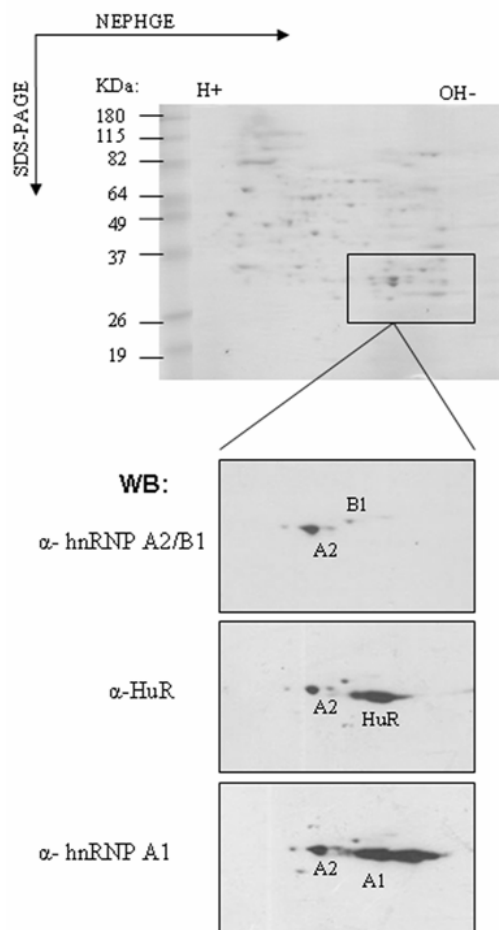
**Εικόνα Γ.25:** Ειδική διασύνδεση της πρωτεΐνης HuR με την hnRNP A1 σε πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP, από κύτταρα A549.

Παρουσία της HuR στα σύμπλοκα hnRNP έπειτα από ανοσοεπιλογή με αντίσωμα κατά της hnRNP A1. Παράλληλες ανοσοκατακρημνίσεις σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων A549 μέσω μονοκλωνων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη hnRNP A1 (διαδρομή 4), την δομή καλύμματος των U-snRNAs (5), την ειδική πρωτεΐνη U2B'' του U2-snRNP (6). Παράλληλες IP με τους ισότυπους IgG1 και IgG2a ως μάρτυρες (2 και 3). Ανάλυση των πρωτεϊνών του ανοσοϊζήματος καθώς και δείγματος του πυρηνικού εκχυλίσματος (διαδρομή 1) σε πήκτωμα SDS-PAGE και ακόλουθη ανοσοσύτωση με ειδικά αντισώματα κατά: HuR (3A2 Ab), hnRNP A1 (4B10 Ab) και hnRNP L (4D11 Ab), των πρωτεϊνών U1-70k και U2B'' των U1- και U2-snRNP, αντίστοιχα.

Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες HuR και hnRNP A1 έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος (περίπου 36-34 kDa), δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό τους στα συνήθη πηκτώματα SDS-PAGE. Για το λόγο αυτό η διαδοχική ανοσοεντόπιση και των δύο πρωτεϊνών πάνω

στην ίδια μεμβράνη προαπαιτεί απομάκρυνση των αντισωμάτων (stripping) από την μεμβράνη ανάμεσα στις δύο ανοσοστυπώσεις. Για να εξετάσουμε την δυνατότητα διαχωρισμού των δύο πρωτεϊνών σε πήκτωμα δύο διαστάσεων (2-D), πραγματοποιήθηκε ανάλυση πυρηνικού εκχυλίσματος A549 σε πήκτωμα διπλής διάστασης τύπου NEPHGE/SDS-PAGE, συνήθης μέθοδος που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών hnRNP (Dreyfuss, et. al., 1993) και παρουσιάστηκε ήδη στις ενότητες Γ.1.2 και Γ.2.1. Ακολούθησε διαδοχική ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και HuR πάνω στην ίδια μεμβράνη, ενώ ο προσδιορισμός της θέσης τους έγινε συγκριτικά με αυτή της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.26, οι θέσεις των κηλίδων που αναλογούν στην HuR και στην hnRNP A1 στο πήκτωμα υπερκαλύπτονται. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την έλλειψη, επί του παρόντος, στοιχείων για την παρουσία της HuR στα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP.



**Εικόνα Γ.26:** Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών HuR και hnRNP A1 κατόπιν διαχωρισμού σε πήκτωμα δύο διαστάσεων (2-D).

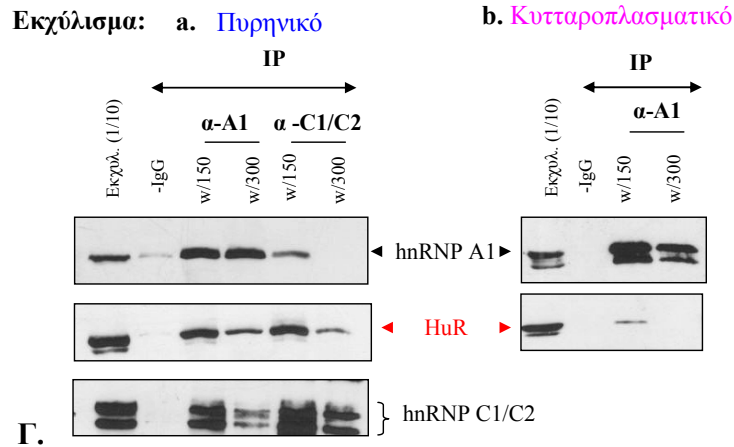
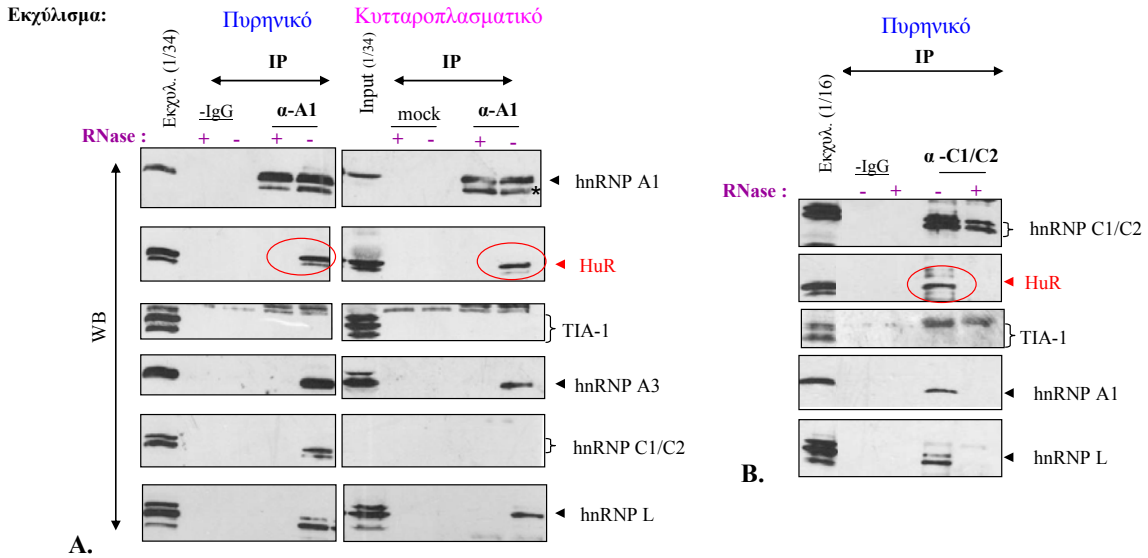
Ανάλυση πυρηνικού εκχυλίσματος κυττάρων A549 σε πήκτωμα 2-D τύπου NEPHGE/SDS-PAGE και ακόλουθη διαδοχική ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών με αντισώματα κατά των hnRNP A2/B1, HuR και hnRNP A1.

Η ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με συστατικά-μέλη των hnRNP και πιθανώς και των mRNP συμπλόκων εξετάστηκε περαιτέρω με την εκτεταμένη εφαρμογή πειραμάτων IP τόσο σε πυρηνικά όσο και σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων A549. Στην εικόνα Γ.27.A, η ειδική παρουσία της HuR στο ανοσοίζημα της hnRNP A1 μέσω του α-hnRNP A1 (4B10) αντισώματος είναι φανερή και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα (πυρηνικό και κυτταροπλασματικό), κάτι που δεν συμβαίνει για μια άλλη πρωτεΐνη που προσδένεται σε στοιχεία ARE όπως η HuR, την TIA-1. Όπως αναμένονταν, η αντιγονική πρωτεΐνη hnRNP A1 ανιχνεύτηκε κάτω από όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Παρά την προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών κατά την προετοιμασία του εκχυλίσματος, παρατηρείται ανοσοδραστική με α-A1 αντίσωμα ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους, πιθανών θραύσμα της A1 (σημειώνεται με \*). Παρόμοια ζώνη ανιχνεύεται, σε ορισμένες περιπτώσεις, με α-HuR αντίσωμα, η οποία πιθανώς να αντιστοιχεί σε πρωτεολυτικό προϊόν της HuR. Η συγκατακρήμιση της HuR μαζί με την hnRNP A1 φαίνεται να εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία του RNA και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα αφού χάνεται εντελώς έπειτα από επίδραση του κυτταρικού εκχυλίσματος με RNάση A. Η ιδιότητα αυτή είναι κοινή και με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της hnRNP A1 και άλλων πρωτεϊνών hnRNP, όπως φαίνεται και στην εικόνα Γ.27.A για τις hnRNP A3 και L καθώς και την αποκλειστικά πυρηνική hnRNP C1/C2. Η πυκνομέτρηση των ζωνών που αντιστοιχούν στην hnRNP A1 και στη HuR στο ανοσοίζημα των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών διαμερισμάτων από τρία επαναλαμβανόμενα πειράματα (παρόμοια με το εικονιζόμενο στην Γ.27) εξασφάλισε μια πρώτη εκτίμηση των επιπέδων τους, συγκριτικά με την ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα, περίπου το 15% και 6% της hnRNP A1 και της HuR, αντίστοιχα, εντοπίζεται στο ανοσοίζημα της A1. Οι αντίστοιχες τιμές για το κυτταροπλασματικό διαμέρισμα είναι 9% και 1%. Συνεπώς, φαίνεται ότι η HuR παραμένει σε διασύνδεση με την A1 στον πυρήνα σε σχετικά μεγαλύτερη αναλογία από ότι στο κυτταρόπλασμα.

Όπως και στην περίπτωση του αντισώματος 4B10 κατά της hnRNP A1, πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 υποβλήθηκαν σε μια σειρά ανοσοκατακρήμισεων χρησιμοποιώντας το μονόκλωνο αντίσωμα 4F4, ειδικό κατά της αποκλειστικά

πυρηνικής πρωτεΐνης hnRNP C1/C2. Το αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης (εικόνα Γ.27.B) έδειξε την ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με σύμπλοκα hnRNP μέσω της πρωτεΐνης hnRNP C1/C2 και ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι, όπως και στην περίπτωση της διασύνδεσης με την hnRNP A1, εξαρτώμενη από το RNA. Τα σχετικά ως προς την συνολική πρωτεΐνη επίπεδα των hnRNP C1/C2 και HuR στο ανοσοίζημα εκτιμήθηκαν περίπου στο 12% και 6%, αντίστοιχα (μη εικονιζόμενα στοιχεία), δηλαδή παρόμοια με αυτά της διασύνδεσης της hnRNP A1-HuR. Επιπρόσθετα, στο ανοσοίζημα της C1/C2 δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη TIA-1, όπως ισχύει και στην περίπτωση της A1 της εικόνας Γ.27.A (η παρουσία μιας μεγαλύτερου μοριακού βάρους από την TIA-1 ζώνης στο ανοσοίζημα της C1/C2 οφείλεται σε μη ειδική ανοσοαντίδραση).

Για να χαρακτηριστεί περαιτέρω η διασύνδεση της HuR μέσω των πρωτεϊνών hnRNP A1 και C1/C2 με τα σύμπλοκα hnRNP και mRNP, τα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά ανοσοιζήματα πλύθηκαν με διάλυμα φυσιολογικής αλατότητας 150 mM NaCl ή με διάλυμα μεγαλύτερης αλατότητας 300mM NaCl. Στην εικόνα Γ.27.Γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από ανοσοκατακρήμιση πυρηνικού εκχυλίσματος A549 μέσω των αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNPA1 και  $\alpha$ -hnRNP C1/C2 ( $\alpha$ ), καθώς και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος μέσω του  $\alpha$ -hnRNP A1 ( $\beta$ ). Συνολικά, παρατηρήθηκε μια μείωση περίπου 50% στην παρουσία της HuR στα ανοσοιζήματα της hnRNP A1 και της C1/C2 που πλύθηκαν σε αλατότητα 300 mM NaCl, ενδεικτική της ευαισθησίας που εμφανίζει η διασύνδεση της HuR με τις hnRNPs στην αυξημένη αλατότητα.

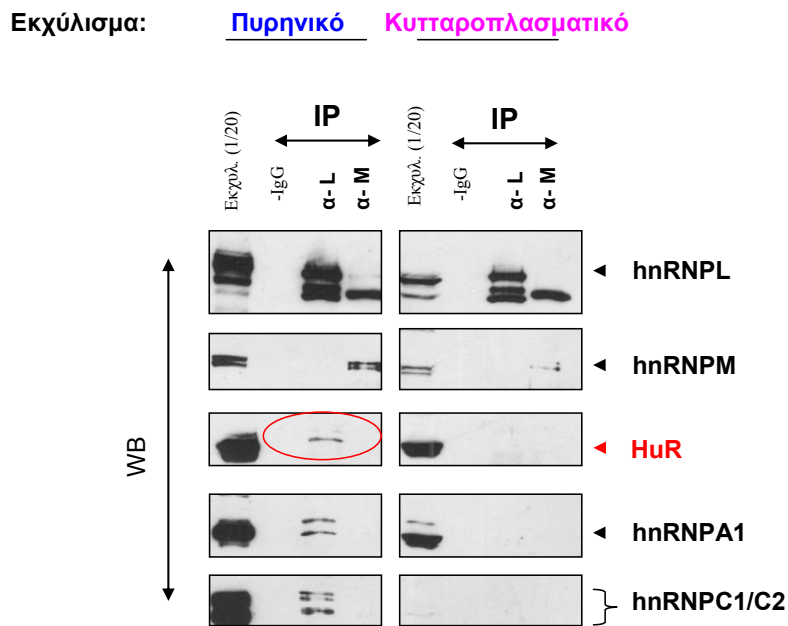


**Εικόνα Γ.27:** Ικανότητα της πρωτεΐνης HuR να δημιουργεί εκτεταμένες διασυνδέσεις με σύμπλοκα hnRNP και mRNP

Εφαρμογή μιας σειράς ανοσοκατακρημνίσεων σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 μέσω των ειδικών αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών hnRNP A1 και hnRNP C1/C2. Παράλληλη εφαρμογή αρνητικού ανοσοιζήματος χωρίς την προσθήκη αντισωμάτων (-IgG). Ανοσοσύτωση (WB) με αντισώματα κατά πρωτεϊνών RBP για την ταυτοποίηση ανοσοδραστικών πρωτεϊνών στα ανοσοιζήματα καθώς και σε κλάσμα του πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος (εκχυλ.). **Α.** Διασύνδεση εξαρτώμενη από το RNA της HuR με πυρηνικά hnRNP/mRNP και κυτταροπλασματικά mRNP σύμπλοκα που απομονώθηκαν μέσω του αντισώματος α-hnRNP A1 και **Β.** με πυρηνικά hnRNP/mRNP σύμπλοκα μέσω του αντι-hnRNP C1/C2. **Γ.** Μερική ευαισθησία της διασύνδεσης της HuR στην αυξημένη αλατότητα, σε σύμπλοκα που απομονώθηκαν μέσω αντισωμάτων (α.) αντι-hnRNP

A1 ή αντι-hnRNP C1/C2 από πυρηνικό εκχύλισμα, ή (β.) αντι-hnRNP A1 από κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων A549. Τα ανοσοζήματα πλύθηκαν με διάλυμα αλατότητας 150 ή 300 mM NaCl, όπως υποδηλώνεται (w/150, w/300).

Η δυνατότητα της πρωτεΐνης HuR να διασυνδέεται μέσω RNA με πρωτεΐνες hnRNP, εκτός των βασικών πρωτεϊνών "core" hnRNP (όπως είναι οι hnRNP A1 και C1/C2), εξετάστηκε με την εφαρμογή παράλληλων ανοσοκατακρήμισεων σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κλάσματα A549, χρησιμοποιώντας μονόκλωνα αντισώματα κατά δύο άλλων πρωτεϊνών hnRNP, της hnRNP L και της hnRNP M. Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.28 δείχνουν την ικανότητα της HuR (αν και μειωμένη σε σχέση με τις hnRNP A1 και C1/C2) να διασυνδέεται με την hnRNP L μόνο στο πυρηνικό διαμέρισμα. Στις ίδιες συνθήκες ανοσοκατακρήμισης δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη διασύνδεση με την hnRNP M.



**Εικόνα Γ.28:** Ικανότητα διασύνδεσης της HuR με την hnRNP L στον πυρήνα.

Ανοσοκατακρήμιση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος κυττάρων A549 μέσω μονόκλωνων αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών hnRNP L και M. Παράλληλη χρήση αρνητικού IP χωρίς την προσθήκη αντισωμάτων (-IgG). Ανοσοσύτωση (WB) με αντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP (L, M, A1, C1/C2) και κατά της HuR για την ταυτοποίηση των αντίστοιχων αντιγονικών πρωτεϊνών στα ανοσοζήματα, καθώς και σε κλάσμα ολικού πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος (εκχυλ.). Σημειώνεται με κύκλο η παρουσία της πρωτεΐνης HuR στο πυρηνικό ανοσοζήμα της hnRNP L.





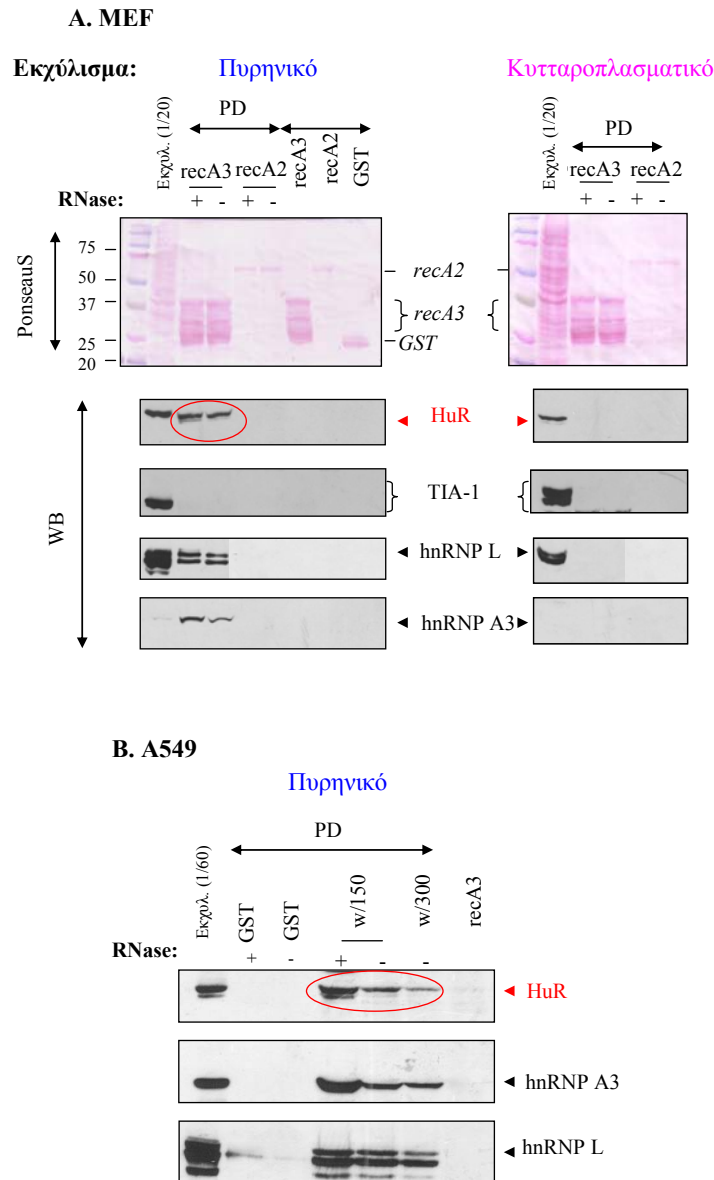
**Εικόνα Γ.29:** Ανεξάρτητη ικανότητα διασύνδεσης της HuR με hnRNP A1 ή C1/C2. Παρουσία σε πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP μετά από αμοιβαία ανοσοαφαίρεση είτε της hnRNP C1/C2 είτε της A1.

Πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 υποβλήθηκαν σε δύο διαδοχικούς κύκλους ανοσοκατακρήμνισης (IP 1+2) μέσω αντισώματος είτε κατά της C1/C2 (A.) είτε κατά της A1 (B.). Τα υπερκείμενα που προέκυψαν (από A και B) διαχωρίστηκαν ισόποσα και χρησιμοποιήθηκαν σε έναν τρίτο κύκλο IP (IP3) με την παράλληλη εφαρμογή και των δύο αντισωμάτων. Ανοσοστύπωση (WB) με ειδικά αντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP A1, C1/C2, A3 και L και HuR για τον εντοπισμό των αντιγονικών πρωτεϊνών στα ανοσοιζήματα, στα ανοσοιζήματα χωρίς προσθήκη αντισωμάτων (-IgG) καθώς και σε κλάσμα του πυρηνικού εκχυλίσματος (εκχυλ.).

### **Γ.3.2. Η διασύνδεση της HuR, ανεξάρτητη της παρουσίας RNA, με το βοηθητικό μοτίβο της hnRNP A3, in vitro**

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω το φάσμα των ενδεχόμενων αλληλεπιδράσεων της HuR με συστατικά του συμπλόκου "core" των hnRNP (hnRNP A/B και C1/C2), εφαρμόστηκε μια σειρά ανοσοκατακρήμνισεων με εμπορικά (ή μη) αντισώματα κατά δύο άλλων (εκτός της A1) βασικών μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B, τις hnRNP A2/B1 και A3. Ωστόσο, τα διαθέσιμα αντισώματα δεν ήταν ικανά να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (όπως παρουσιάστηκε στις εικόνες Γ.1 και Γ.2.B), παρά την καλή απόδοσή τους σε πειράματα ανοσοστύπωσης. Για τον λόγο αυτό έγιναν πειράματα κατακρήμνισης τύπου pull-down χρησιμοποιώντας δύο σχετικές ανασυνδιασμένες, σε σύντηξη με GST, πρωτεΐνες που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριό μας. Η πρώτη αντιπροσωπεύει ολόκληρη την πρωτεΐνη hnRNP A2 (recA2fl) και η δεύτερη αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο (βοηθητική περιοχή) της hnRNP A3 (recA3Ct). Οι ανασυνδιασμένες σε σύντηξη με GST πρωτεΐνες καθώς και η ανασυνδιασμένη GST (αρνητικός μάρτυρας) εφαρμόστηκαν σε πειράματα pull-down με χρήση σφαιριδίων γλουταθιόνης σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων MEF, με προηγούμενη επίδραση ή μη RNάσης. Έπειτα από εκτεταμένα πλυσίματα των σφαιριδίων γλουταθιόνης και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών μέσω SDS-PAGE, έγινε ανοσοχημικός προσδιορισμός των προσδεμένων ενδογενών πρωτεϊνών (εικόνα Γ.30.A). Πριν την ανοσοστύπωση, η χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με ponsau

Σ αποκάλυψε την παρουσία των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στο pull-down (*recA3*, *recA2* και *GST*). Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.30.Α, οι ενδογενείς πρωτεΐνες hnRNP (για παράδειγμα οι hnRNP L και hnRNP A3) διασυνδέονται με την *recA3Ct* αποκλειστικά στο πυρηνικό διαμέρισμα απουσία RNA μετά από επίδραση με RNάση A των εκχυλισμάτων. Επίσης, ανιχνεύτηκαν ομοημερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της *recA3Ct* και της ενδογενούς hnRNP A3 μέσω του αντισώματος  $\alpha$ -hnRNP A3 (N) ικανού να αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της A3 που δεν περιέχεται στην *recA3Ct*. Όπως και στην περίπτωση των hnRNP, η πυρηνική HuR έχει την ικανότητα να σχηματίζει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με την *recA3Ct*, σε αντίθεση με την TIA-1. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι με την χρήση RNάσης, όλες οι ενδογενείς πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και της HuR, που διασυνδέονται με την *recA3Ct* στον πυρήνα εμφανίζουν αυξημένη διασύνδεση, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης προσβασιμότητάς τους στο σύμπλοκο, συγκριτικά με το εκχύλισμα χωρίς την επίδραση RNάσης. Επιπλέον, το γεγονός ότι πρόκειται για ειδική παρουσία αλληλεπιδράσεων που εντοπίστηκαν στο πυρηνικό διαμέρισμα υποστηρίζεται από την πλήρη απουσία τους στο κυτταρόπλασμα καθώς και από την έλλειψη παρόμοιων αλληλεπιδράσεων με την *recA2fl*. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των MEF κυττάρων προέλευσης ποντικού είχε και η εφαρμογή πειραμάτων pull-down σε πυρηνικό εκχύλισμα ανθρώπινων κυττάρων A549 (εικόνα Γ.30.Β) όπου εκτός από την χρήση RNάσης έγιναν πλύσεις των σφαιριδίων με 150 ή 300mM NaCl. Η πειραματική αυτή προσέγγιση επιβεβαίωσε, σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές θηλαστικών (A549 και MEF), την ικανότητα της HuR να διασυνδέεται *in vitro* με την *recA3Ct*. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ανθεκτική στην δράση RNάσης και σχετικά σταθερή σε αυξημένη αλατότητα (300mM NaCl). Συνολικά, το νέο εύρημα που προκύπτει από αυτή την πειραματική διαδικασία αφορά αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (της HuR και του καρβοξυτελικού άκρου της *recA3*) *in vitro*, μια διαφορετική ιδιότητα συγκριτικά με τις αλληλεπιδράσεις της HuR με τις hnRNP A1 και C1/C2 οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία του RNA. Απομένει να διευκρινιστεί κατά πόσον η διασύνδεση HuR-*recA3* είναι άμεση ή οφείλεται στην διαμεσολάβηση μίας κοινής πρωτεΐνης και εάν υφίσταται *in vivo*.



**Εικόνα Γ.30:** Διασύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών HuR και του καρβοξυτελικού άκρου της hnRNP A3, in vitro

**A.** Παρασκευή πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων MEF (εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού) με (+) ή χωρίς (-) την χρήση RNάσης και ακόλουθη εφαρμογή τους σε πειράματα pull-down μέσω δύο ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών συζευγμένων με GST που αντιστοιχούν στο καρβοξυτελικό άκρο της hnRNP A3 (recA3Ct) ή το πλήρες μήκος της hnRNP A2 (recA2fl). Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η ακόλουθη χρώση της μεμβράνης με PonceauS έδειξε την παρουσία των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών recA3Ct και recA2fl (καθώς και της ανασυνδιασμένης GST) που εφαρμόστηκαν στην πειραματική διαδικασία, παράλληλα με μικρή ποσότητα πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος (εκχυλ.). Η ανοσοεντόπιση των προσδεδεμένων ενδογενών

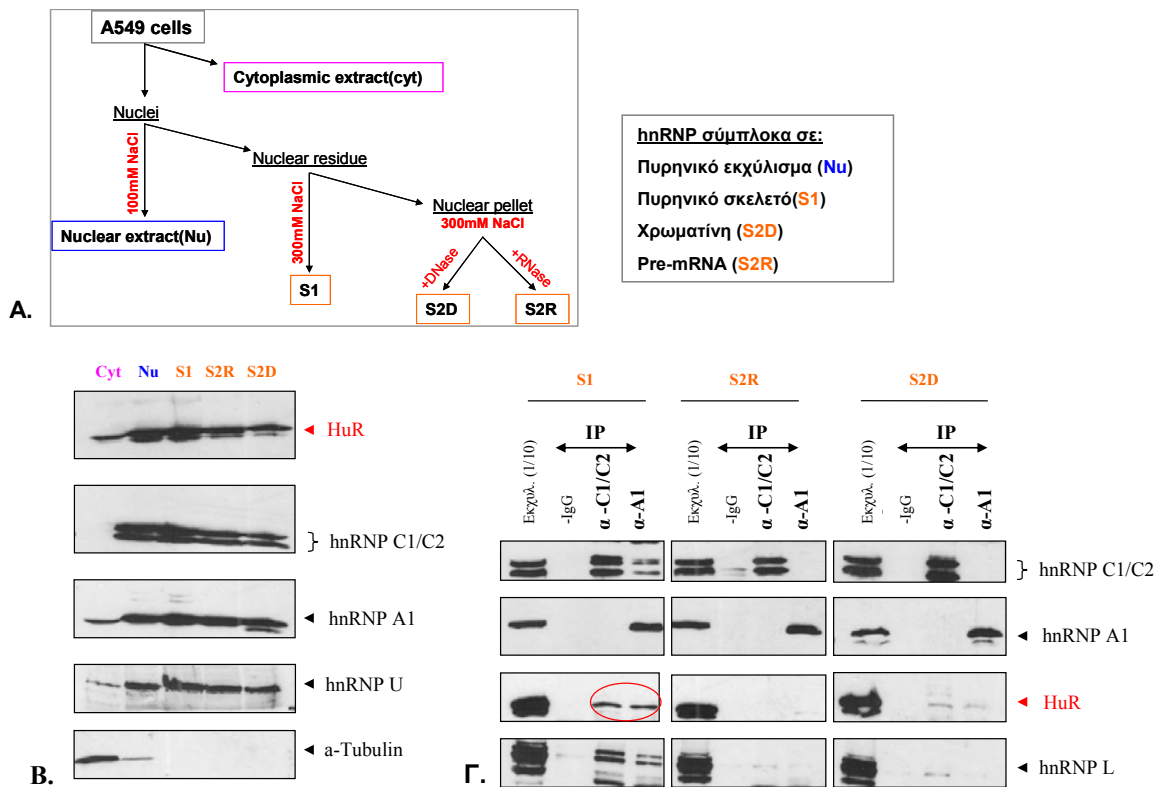
πρωτεϊνών έγινε μέσω ανοσοσύτωσης με αντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP (L και A3) και των πρωτεϊνών HuR και TIA-1. **B.** Πείραμα pull-down με την recA3 σε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων A549 αντίστοιχο της εικόνας A. Έλεγχος της επίδρασης της RNάσης (+ ή – RNase) και της αλατότητας (w/150 ή w/300) στην διασύνδεση των ενδογενών πρωτεϊνών με την recA3Ct.

### **Γ.3.3. Κυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών HuR και hnRNP και ικανότητα διασύνδεσης σε διακριτά υπο-πυρηνικά κλάσματα (επίδραση του θερμικού στρες)**

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP και mRNP καθώς και κυτταροπλασματικά σύμπλοκα mRNP. Η παρατήρηση αυτή, δεδομένης και της κύριας εντόπισης της HuR στον πυρήνα (όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή), μας οδήγησε στην διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής της HuR. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο κυτταρικής κλασμάτωσης όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα υλικά και μέθοδοι (B.2.2) και παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα Γ.31.A. Συνοπτικά, γίνεται κυτταρική λύση κατά Dreyfuss, εκχύλιση των πυρήνων σε διάλυμα φυσιολογικής αλατότητας 100mM NaCl και λήψη κυτταρικού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, το πυρηνικό υπόλοιπο επανεκχυλίζεται σε διάλυμα αυξημένης αλατότητας (300mM NaCl). Το νέο υπερκείμενο που προκύπτει (αναφέρεται ως κλάσμα S1) είναι σε μεγάλο βαθμό εμπλουτισμένο με στοιχεία που συνδέονται με τον πυρηνικό σκελετό όπου συμπεριλαμβάνονται και σύμπλοκα hnRNP (Van & Van, 1981, He, et. al., 1991). Το νέο πυρηνικό ίζημα που απομένει, επανεκχυλίζεται εκ νέου στο ίδιο διάλυμα (αλατότητας 300 mM NaCl), χωρίζεται ισόποσα και στη συνέχεια προστίθεται στο ένα μέρος RNάση και στο άλλο DNάση. Τα υπερκείμενα που προκύπτουν εκ νέου (αναφέρονται ως S2D και S2R) εμπλουτίζονται σε στοιχεία που συνδέονται με την χρωματίνη και το hnRNA, αντίστοιχα. Η κατανομή και ο σχετικός εμπλουτισμός της HuR σε όλα τα κλάσματα του πυρήνα (καθώς και του κυτταροπλάσματος) έγινε σε άμεση σύγκριση με αντιπροσωπευτικές πρωτεΐνες hnRNP, έπειτα από τον διαχωρισμό ίσης ποσότητας συνολικής πρωτεΐνης σε πήκτωμα SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.31.B., η HuR ανοσοεντοπίζεται σε όλα τα κυτταρικά κλάσματα με σχετικό εμπλουτισμό στο πυρηνικό εκχύλισμα και στο κλάσμα S1. Παρόμοια κατανομή εμφανίζουν οι πρωτεΐνες hnRNP A1 και C1/C2, με την A1 να έχει μια πιο ομοιογενή πυρηνική κατανομή, ενώ η C1/C2 απουσιάζει, όπως αναμένονταν, από το

κυτταροπλασματικό διαμέρισμα. Η παράλληλη ανοσοεντόπιση της hnRNP U, γνωστής και ως SAF-A (scaffold-attachment factor A) (Fackelmayer, et. al 1994) έδειξε μια γενική κατανομή όπως η hnRNP A1 και C1/C2 με έναν εμφανή εμπλουτισμό στο κλάσμα S1 του πυρηνικού σκελετού.

Ο συνεντοπισμός της HuR και των πρωτεϊνών hnRNP A1 και C1/C2 στο πυρηνικό εκχύλισμα και στα υπο-πυρηνικά κλάσματα S1, S2R και S2D οδήγησε στην εφαρμογή μιας σειράς ανοσοκατακρημνίσεων προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές αλληλεπιδράσεις της HuR με σύμπλοκα hnRNP στα υπο-πυρηνικά κλάσματα, όπως και στην περίπτωση των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων. Για τις ανοσοκατακρημνίσεις, μέσω των αντισωμάτων  $\alpha$ -hnRNP C1/C2 και  $\alpha$ -hnRNP A1, χρησιμοποιήθηκε ίδια ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης των εκχυλισμάτων S1, S2R και S2D. Στην εικόνα Γ.31.Γ φαίνεται η ικανότητα της HuR να συγκατακρημνίζεται, σε ίδιο βαθμό με τις hnRNP C1/C2 και A1, στο κλάσμα S1. Όπως και στην περίπτωση του πυρηνικού εκχυλίσματος (πείραμα IP εικόνας Γ.27), έγινε μια γενική εκτίμηση του ποσοστού των συγκατακρημνιζόμενων πρωτεϊνών αναφορικά με την ολική τους συγκέντρωση στο S1 κλάσμα. Στο ανοσοίζημα της hnRNP A1 οι τιμές για την A1 και την HuR ήταν 7% και 1.5%, αντίστοιχα, ενώ ανάλογες ήταν και οι τιμές που προέκυψαν από το ανοσοίζημα της C1/C2 (10% για την hnRNPC και 1.5% για την HuR). Στο κλάσμα S2D η HuR διασυνδέεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό με τα σύμπλοκα hnRNP, ενώ το ίδιο δεν ισχύει στο κλάσμα S2R υποδηλώνοντας την παρουσία αλληλεπιδράσεων εξαρτώμενων από το RNA, όπως και για το πυρηνικό εκχύλισμα. Το γεγονός ότι οι αλληλεπιδράσεις της HuR που εντοπίζονται στα υποπυρηνικά κλάσματα αφορούν σύμπλοκα hnRNP επιβεβαιώνεται από την παράλληλη ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών hnRNP, όπως της hnRNP L.



**Εικόνα Γ.31:** Ευρεία κυτταρική κατανομή της HuR. Διασύνδεση με σύμπλοκα hnRNP σε υπο-πυρηνικά κλάσματα

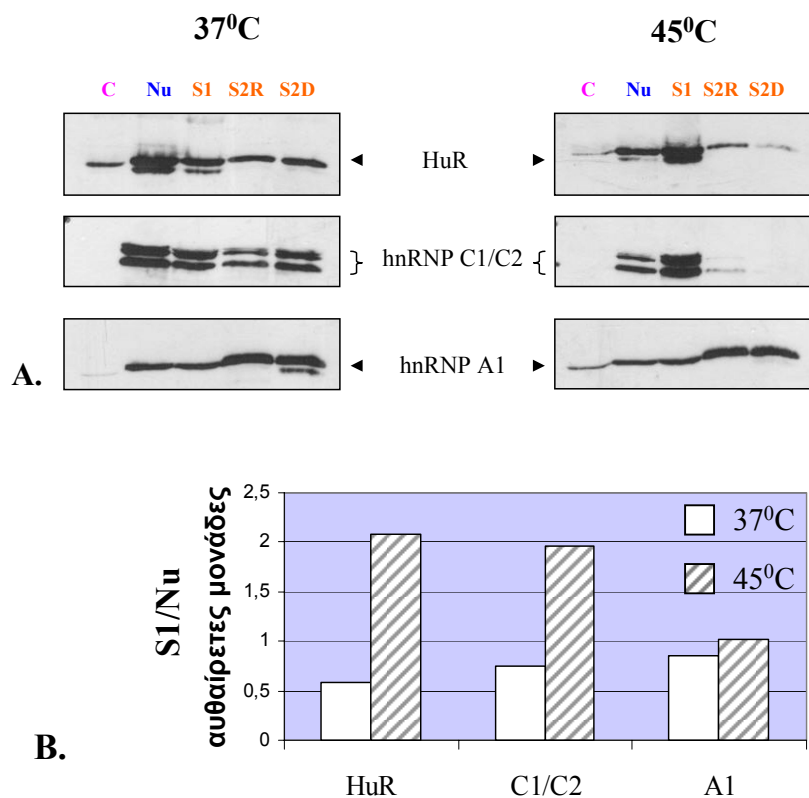
**A.** Σχηματική περιγραφή των σταδίων παρασκευής των διαφορετικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα A549. **B.** Σχετικός εμπλουτισμός της HuR στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα της εικόνας A. Ανάλυση των εκχυλισμάτων (κυτταροπλασματικό, πυρηνικό, S1, S2R και S2D κλάσμα) σε πήκτωμα SDS-PAGE, με βάση ίση ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης (30μg/διαδρομή), και ανοσοεντόπιση των προς μελέτη πρωτεϊνών έπειτα από μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. **Γ.** Ικανότητα της HuR να διατηρεί διασύνδεση με πρωτεΐνες hnRNP σε υπο-πυρηνικά κλάσματα. Ίση ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης (250μg) των κλασμάτων S1, S2R και S2D υποβλήθηκε σε μια σειρά ανοσοκατακρημνίσεων μέσω των αντισωμάτων α-hnRNP C1/C2 και α-hnRNP A1 παράλληλα με IP χωρίς την προσθήκη αντισωμάτων (-IgG). Ανοσοστύπωση για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στα ανοσοιζήματα καθώς και σε μια μικρή ποσότητα των υπο-πυρηνικών κλασμάτων (εκχυλ.).

### Γ.3.4 Επίδραση θερμικού στρες στην κατανομή και αλληλεπίδραση HuR-hnRNPs

Μια πρώτη προσέγγιση για την βιολογική σημασία των ευρημάτων, αναφορικά με διασύνδεση HuR και hnRNPs, ήταν η εφαρμογή θερμικού στρες στα κύτταρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Gallouzi et. al., 2000. Η διαδικασία περιλαμβάνει την έκθεση κυττάρων που βρίσκονται στους 37<sup>0</sup>C σε ενεργό πολλαπλασιασμό, στους 45<sup>0</sup>C για 1 ώρα και την μετέπειτα άμεση συλλογή του κυτταρικού ιζήματος. Για την συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση, παρασκευάστηκαν παράλληλα κυτταρικά ιζήματα από κύτταρα A549 που είτε παρέμειναν στους 37<sup>0</sup>C είτε δέχτηκαν το θερμικό στρες. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της κατανομής της HuR με αυτή των πρωτεϊνών hnRNP A1 και C1/C2 σε όλα τα κυτταρικά κλάσματα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας και υπο-πυρηνικά κλάσματα). Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.32 παρουσιάζουν ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης ανά κυτταρικό εκχύλισμα, όπως στην εικόνα Γ.31.B. Η σύγκριση 37<sup>0</sup>C και 45<sup>0</sup>C έδειξε μια συνολική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HuR και C1/C2. Αξιοσημείωτη είναι και η παρατήρηση για μια εμφανή μετατόπιση της HuR, μετά την επίδραση των κυττάρων με θερμικό στρες, που οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στο κλάσμα S1 και αντίστοιχη μείωση σε όλα τα υπόλοιπα κλάσματα. Η διαδοχική ανοσοσύτωση στην ίδια μεμβράνη με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών hnRNP A1 και C1/C2 έδειξε μια αντίστοιχη της HuR μετατόπιση της hnRNP C1/C2 στο κλάσμα S1, κάτι που δεν παρατηρήθηκε για την hnRNP A1. Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση των σχετικών επιπέδων (μέσω πυκνομέτρησης των ζωνών) των πρωτεϊνών HuR, hnRNP C1/C2 και hnRNP A1 στο πυρηνικό εκχύλισμα και στο κλάσμα S1 κυττάρων που υποβλήθηκαν ή μη σε θερμικό στρες. Στο ιστόγραμμα της εικόνας Γ.32.B. παρουσιάζεται ο λόγος S1:πυρηνικό κλάσμα για κάθε πρωτεΐνη χωριστά, στα κύτταρα με ή χωρίς θερμικό στρες. Φαίνεται καθαρά ο βαθμός αλλαγής (πάνω από 2 φορές αύξηση στο κλάσμα S1) στην πυρηνική κατανομή των HuR και hnRNP C1/C2, σε αντίθεση με τις μικρές αλλαγές που εμφάνισε η hnRNP A1. Επιπρόσθετα, σημειώθηκε μια σχετική μείωση της κυτταροπλασματικής HuR στους 45<sup>0</sup>C σε σύγκριση με τους 37<sup>0</sup>C, παρατήρηση που έρχεται σε αντιδιαστολή με προηγούμενες αναφορές που υποστηρίζουν την συσσώρευση της HuR σε διακριτές εστίες του κυτταροπλάσματος, γνωστές και ως stress granules (SG), και αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της έπειτα από την επίδραση θερμικού στρες (Gallouzi, et.al., 2000, Kedersha and Anderson, 2002).



Μια πιθανή εξήγηση για την παρατηρούμενη διαφορά είναι ότι η εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου κλασμάτωσης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας δεν επιτρέπει την εκχύλιση της HuR από τα SG. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η επίδραση των κυττάρων A549 με οξειδωτικό στρες (200mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 3 ώρες), σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Duan, et. al., (2005) έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του θερμικού στρες (μη εικονιζόμενα αποτελέσματα).



**Εικόνα Γ.32:** Επίδραση θερμικού στρες σε κύτταρα A549. Παράλληλη αλλαγή στην πυρηνική κατανομή των HuR και hnRNP C1/C2

**A.** Άμεση σύγκριση καλλιεργειών κυττάρων A549 που είτε παραμένουν στους 37°C είτε μεταφέρθηκαν στους 45°C, για 1 ώρα. Συλλογή κυττάρων και παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων από τους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.30, και ακόλουθη ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE, ίδιας ποσότητας συνολικής πρωτεΐνης (30μg/διαδρομή). Ανοσοσύτρωση για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών HuR, hnRNP C1/C2 και A1.

**B.** Αποτίμηση της σχέσης των HuR, hnRNP C1/C2 και A1 μεταξύ του κλάσματος S1 και του πυρηνικού εκχυλίσματος (λόγος S1/Nu) στους 37 και 45°C.

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην κυτταρική κατανομή των HuR και hnRNP κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ μας παρακίνησε στην εφαρμογή νέας σειράς ανοσοκατακρημνίσεων. Χρησιμοποιήθηκαν τα δύο κύρια πυρηνικά κλάσματα (πυρηνικό εκχύλισμα και S1) κυττάρων A549 που προέκυψαν από επώαση στους 45<sup>0</sup>C, με στόχο τον εντοπισμό αλλαγών που πιθανόν να επεκτείνονται και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της HuR και των συμπλόκων hnRNP. Η παρουσία της HuR στα σύμπλοκα hnRNP που απομονώθηκαν μέσω των αντισωμάτων α-hnRNP C1/C2 και α-hnRNP A1 εξετάστηκε και ως προς την ευαισθησία σε αυξημένη αλατότητα και εκτιμήθηκε βάση της ικανότητας συγκατακρημνίσεως των αντιγονικών πρωτεϊνών. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα Γ.33.A, έγινε σε άμεση αναφορά με τα αποτελέσματα των ανοσοκατακρημνίσεων σε κύτταρα που παρέμειναν στους 37<sup>0</sup>C (εικόνες 27 και 31). Προκειμένου να εκτιμηθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν μεταξύ των κυττάρων με ή χωρίς θερμικό στρες, έγινε πυκνομέτρηση των ζωνών που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες των ανοσοϊζημάτων που πλύθηκαν με φυσιολογικό αλάτι (w/150) και ακολούθησε σύγκριση των σχετικών επιπέδων των συν-κατακρημνιζόμενων πρωτεϊνών hnRNP A1, C1/C2 και HuR στα πυρηνικά και στα S1 κλάσματα. Αντίστοιχη πυκνομέτρηση έγινε για κύτταρα που παρέμειναν στους 37<sup>0</sup>C βάση των πειραμάτων IP των εικόνων Γ.27.Γ(α) και Γ.31.Γ (για τα πυρηνικά και S1 κλάσματα, αντίστοιχα) δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα που συγκρίνονται (στους 37<sup>0</sup> και 45<sup>0</sup>C) παρασκευάστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

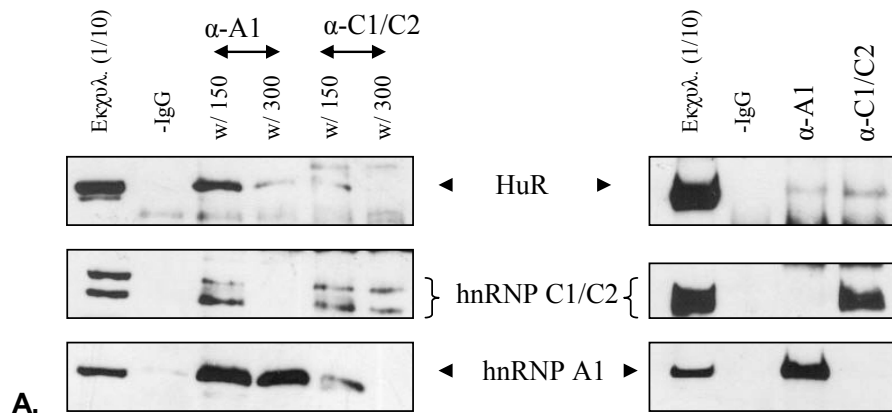
Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της πειραματικής αυτής διαδικασίας έδειξαν την ικανότητα διασύνδεσης της HuR με hnRNP A1 και C1/C2 καθώς και μερική ευαισθησία στην αυξημένη αλατότητα κάτω από συνθήκες θερμικού στρες (εικόνα Γ.33.A.), όπως και στην περίπτωση καλλιέργειας των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες (37<sup>0</sup>C) (εικόνες Γ.27 και Γ.31).

Για την καλύτερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, στην εικόνα Γ.33.B παρουσιάζονται σε μορφή ιστογράμματος οι παραπάνω εκτιμήσεις, βάση του ποσοστού (επί τις εκατό) της hnRNP A1, C1/C2 και της HuR που προσμετρούνται στο ίδιο ανοσοϊζημα, ορίζοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης μέσω της οποίας λαμβάνεται το ανοσοϊζημα (hnRNP C1/C2 ή A1) ως 100%. Στα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP που απομονώθηκαν μέσω του αντισώματος α-hnRNP A1, η συγκατακρημνίσιμη HuR, όπως επίσης και η hnRNP C1/C2, εμφάνισαν μια σχετικά μικρή μείωση (λιγότερη του 50%) στα κύτταρα με το θερμικό στρες (45<sup>0</sup>C), συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (37<sup>0</sup>C). Εν τούτοις,

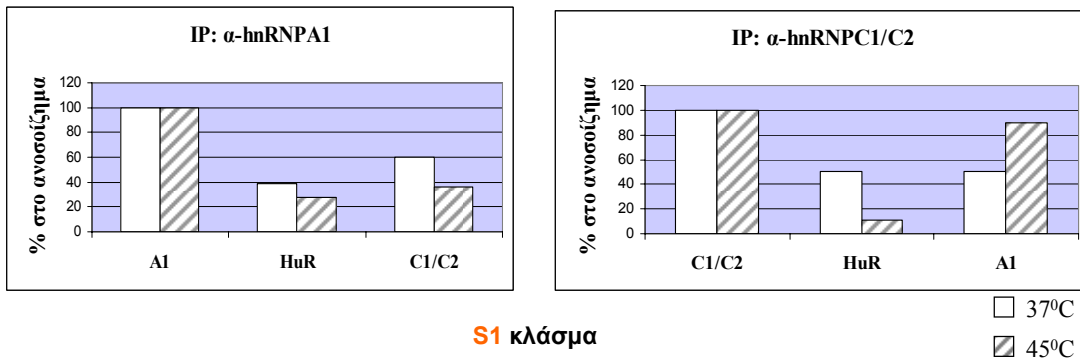
στα ανοσοιζήματα της hnRNP C1/C2, οι αντίστοιχες αλλαγές των συγκατακρημιζόμενων πρωτεϊνών HuR και hnRNP A1 ήταν πολύ μεγαλύτερης κλίμακας. Στο ίδιο IP ( $\alpha$ -C1/C2) και αναφορικά με τα κύτταρα που επώαστηκαν στους 45<sup>0</sup>C, παρατηρήθηκε επανειλημμένα μια μείωση στην διασύνδεση της HuR κάτω του 20%, η οποία σημειώθηκε με την παράλληλη αύξηση των επιπέδων της hnRNP A1. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με προηγούμενη αναφορά που υποστηρίζει, αντιθέτως, την αυξημένη ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με την hnRNP C1/C2 σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa κάτω από συνθήκες θερμικού στρες (Gallouzi, et. al., 2001). Επί του παρόντος, τα αίτια αυτής της ασυμφωνίας δεν είναι ξεκάθαρα, αλλά ενδεχομένως να σχετίζονται με διαφορές του κυτταρικού τύπου και του πρωτόκολλου κλασμάτωσης που εφαρμόστηκε στις δύο περιπτώσεις.

Όσον αφορά την παρουσία της HuR στα ανοσοιζήματα του κλάσματος S1, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν φανερά αντίθετα αφού τα επίπεδα της HuR που παρέμειναν στο ανοσοίζημα της hnRNP A1, μετά την επίδραση θερμικού στρες, ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα. Σε αντιδιαστολή, στο ανοσοίζημα της hnRNP C1/C2 το ποσοστό της HuR που συγκατακρημιζείται τόσο στο πυρηνικό εκχύλισμα όσο και στο S1 κλάσμα των κυττάρων που επώαστηκαν στους 45<sup>0</sup>C παρέμεινε σταθερό (περίπου 11%). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα επίπεδα της HuR στα ανοσοιζήματα της hnRNP A1 όπου σημειώθηκε μείωση από 30 στο 2% (εικόνα Γ.33.B). Η παρατήρηση αυτή είναι πιθανόν να υποδηλώνει την παρουσία δύο υποσυνόλων των συμπλόκων HuR-hnRNP C1/C2, το ένα εκ των οποίων είναι συγκριτικά μεγαλύτερης σταθερότητας και εμπλουτίζεται στα σύμπλοκα hnRNP του πυρηνικού σκελετού (S1). Συνολικά, η εφαρμογή θερμικού στρες σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα φαίνεται να επηρεάζει τόσο την κυτταρική κατανομή όσο και την αλληλεπίδραση της HuR με πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP.

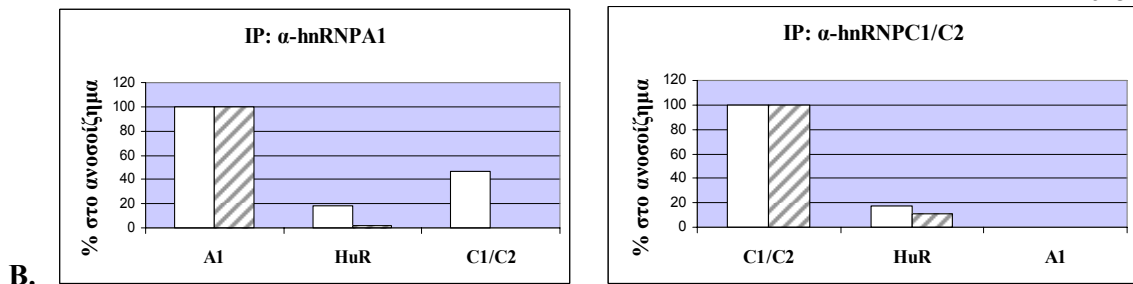
45<sup>0</sup>C: Πυρηνικό εκχύλισμα S1 κλάσμα



Πυρηνικό εκχύλισμα



S1 κλάσμα



**Εικόνα Γ.33:** Επίδραση θερμικού στρες στη διασύνδεση της HuR με πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP

**A.** Παρασκευή πυρηνικού εκχυλίσματος και κλάσματος S1 από κύτταρα που επωάστηκαν στους 45<sup>0</sup>C. Για τα IPs με τα αντισώματα α-hnRNP A1 και α-hnRNP C1/C2 καθώς και για τα -IgG (αρνητικοί μάρτυρες) χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης (250μg). Τα ανοσοιζήματα του πυρηνικού εκχυλίσματος πλύθηκαν είτε με διάλυμα 300 mM NaCl (w/300) είτε με 150 mM NaCl (w/150). **B.** Έκταση των αλληλεπιδράσεων της HuR με τις hnRNP A1 και C1/C2 στα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP κυττάρων με θερμικό στρες, σε άμεση σύγκριση με τα κύτταρα που παρέμειναν σε φυσιολογικές συνθήκες (37<sup>0</sup>C). Η εκτίμηση των επιπέδων της HuR ως προς hnRNP A1 και C1/C2 στα πυρηνικά (αντί-A1 και αντί-C1/C2

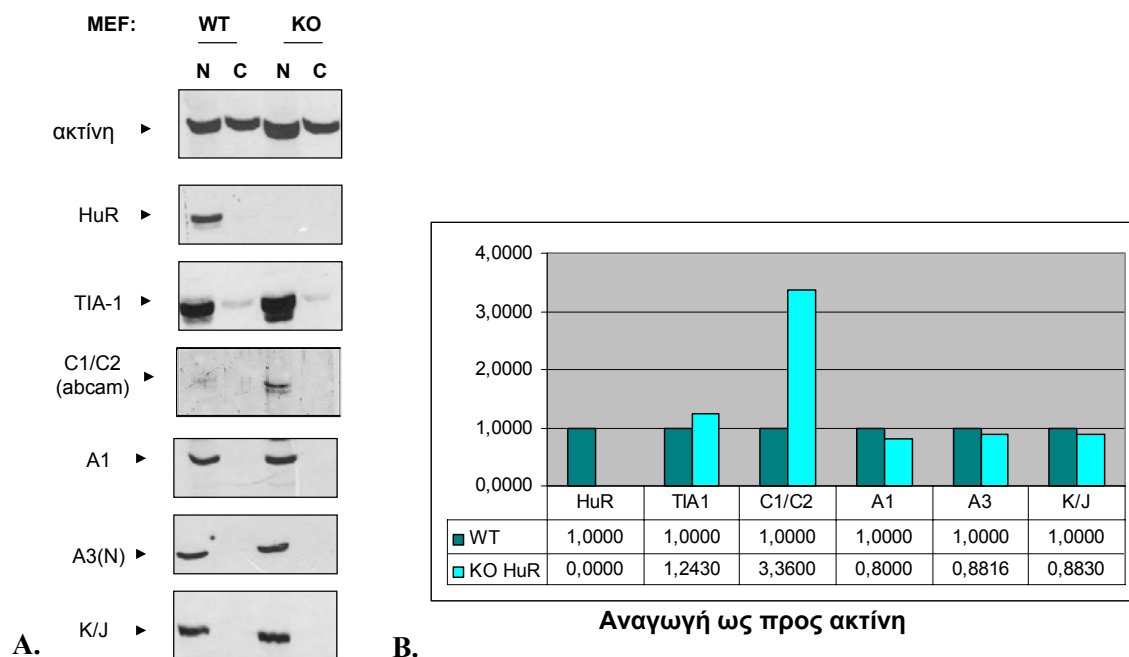
σύμπλοκα hnRNP) και S1 κλάσματα έγινε βάση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στις εικόνες Γ.27.Γ. και Γ.31.Γ για τα κύτταρα που παρέμειναν στους 37<sup>0</sup>C και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.33.Α για τους 45<sup>0</sup>C. Τα ποσοστά (επί τις εκατό) των hnRNP A1, C1/C2 και HuR στα ανοσοιζήματα προέκυψαν έπειτα από την κανονικοποίηση των τιμών ως προς τα συνολικά επίπεδα της κάθε πρωτεΐνης (εκχυλ.), θέτοντας τα επίπεδα των πρωτεϊνών hnRNP A1 και C1/C2 (μέσω των οποίων λαμβάνονται τα αντίστοιχα ανοσοιζήματα) στο 100%.

### **Γ.3.5. Διαφαινόμενη ειδική διασύνδεση hnRNP C1/C2 με HuR**

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα Γ.3.3, κάτω από συνθήκες θερμικού στρες οι πρωτεΐνες που κατεξοχήν φαίνεται να επηρεάζονται με παρόμοιο τρόπο τόσο στην πυρηνική κατανομή όσο και στον τρόπο διασύνδεσης είναι οι hnRNP C1/C2 και HuR. Η περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης hnRNP C1/C2 και HuR παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Προς την κατεύθυνση αυτή έγινε χρήση κυττάρων MEF με (wt) ή χωρίς απαλοιφή της HuR (koHuR) τα οποία ήταν διαθέσιμα από την ομάδα του Δρ.Κοντογιάννη (Φλέμινγκ). Αρχικά έγινε ανοσοχημικός έλεγχος των επιπέδων και της υποκυτταρικής κατανομής πρωτεϊνών RBPs στα κύτταρα MEF με και χωρίς την απαλοιφή της HuR προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές διαφορές.

Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν (μέσω του kit NE-PER) πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων MEF χωρίς (wt) και με απαλοιφή HuR (ko) και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοστύπωση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα κατά πρωτεϊνών hnRNP (A1, A3, C1/C2 και K/J), HuR και TIA-1, παράλληλα με αντισώματα κατά της ακτίνης ως εσωτερικού δείκτη (εικόνα Γ.34.Α.). Το αντίσωμα κατά της C1/C2 που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πολύκλωνο H-105, δεδομένου ότι μόνο το συγκεκριμένο έχει ικανότητα αναγνώρισης της πρωτεΐνης hnRNP C1/C2 στα τρωκτικά, σε αντιδιαστολή με το μονόκλωνο 4F4 (όπως παρουσιάζεται στην ενότητα Γ.2.1, εικόνα Γ.5). Τα επίπεδα των πρωτεϊνών μετρήθηκαν μέσω πυκνομέτρησης των δεσμών και η σύγκρισή τους έγινε με αναγωγή των τιμών ως προς την ακτίνη και ορίζοντας τα επίπεδα της κάθε πρωτεΐνης στα κύτταρα wt ως μονάδα (εικόνα Γ.34.Β.). Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα Γ.34.Α, η απουσία της HuR από τα κύτταρα MEF (ko) δεν φαίνεται να έχει επηρεάσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών hnRNP και της ARE-BP πρωτεΐνης TIA-1, ο

οποίος είναι κατεξοχήν πυρηνικός (όπως και στην περίπτωση άλλων εκχυλισμάτων από κύτταρα τρωκτικών, δεξ ενότητα Γ.2.1, εικόνα Γ.5). Παρατηρήθηκαν μη αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των hnRNP και TIA-1, με εξαίρεση τα επίπεδα της hnRNP C1/C2 τα οποία εμφανίζονται αυξημένα κατά 3 φορές στα κύτταρα με απαλοιφή της HuR (Γ.34.B.).



**Εικόνα Γ.34:** Ανοσοχημικός προσδιορισμός πρωτεϊνών RBP στα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά διαμερίσματα πρωτογενών κυττάρων MEF με (ko) ή χωρίς (wt) απαλοιφή της HuR.

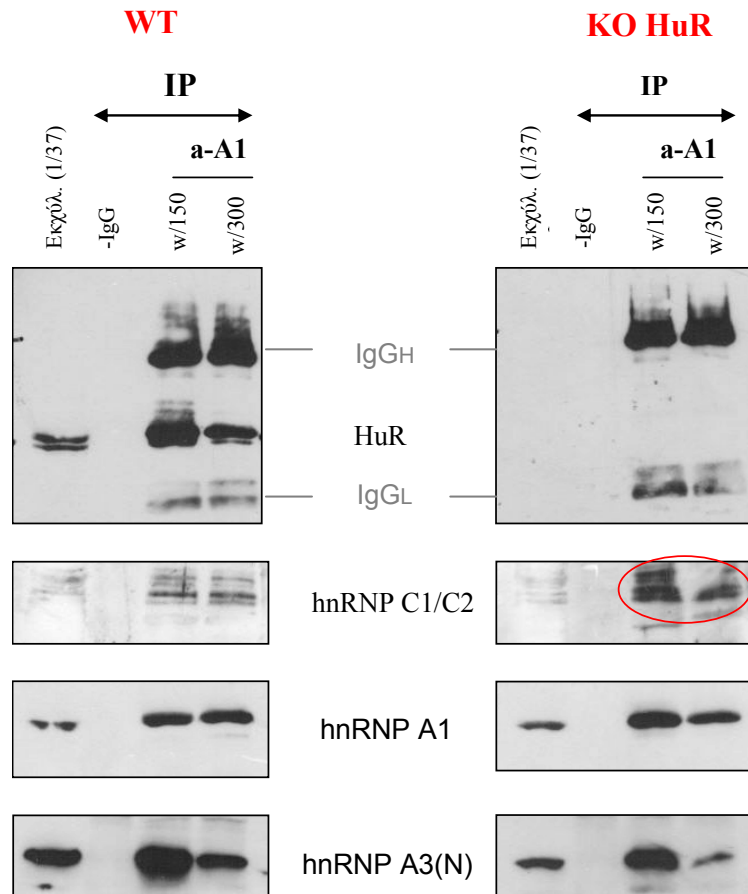
**A.** Παρασκευή πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων από αντίστοιχο αριθμό κυττάρων MEF με (KO) ή χωρίς (WT) την απαλοιφή της HuR και ακόλουθη ανάλυση των εκχυλισμάτων σε πήκτωμα SDS-PAGE. Ανοσοστύπωση για ειδική αναγνώριση πρωτεϊνών hnRNP, HuR και TIA-1 καθώς και ακτίνης. **B.** Σύγκριση των σχετικών ως προς ακτίνη επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP C1/C2, A1, A3, K/J, HuR και TIA-1 μεταξύ κυττάρων MEF με (KO HuR) ή χωρίς (WT) την απαλοιφή της HuR και ορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των κυττάρων WT στη μονάδα.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα για αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης hnRNP C1/C2 απουσία της HuR καθώς και η ικανότητα των δύο αυτών πρωτεϊνών να διασυνδέονται σε σύμπλοκα hnRNP όπως δείξαμε στην ενότητα Γ.3.1, οδήγησε στην εφαρμογή μιας νέας σειράς ανοσοκατακρημνίσεων με τους δύο πληθυσμούς κυττάρων

MEF (wt/ko HuR). Στις ανοσοκατακρημνίσεις αυτές έγινε χρήση του αντισώματος κατά της hnRNP A1 και αυτό γιατί, όπως ήδη προαναφέρθηκε (ενότητα Γ.2.1), το μονόκλωνο αντίσωμα 4F4 κατά της C1/C2 δεν αναγνωρίζει την αντίστοιχη πρωτεΐνη σε κύτταρα τρωκτικών (εικόνα Γ.5) και το πολύκλωνο αντίσωμα H-105 που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοσύτωσης δεν ήταν κατάλληλο για εφαρμογή σε πειράματα IP (μη εικονιζόμενο αποτέλεσμα). Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (κατά Dreyfuss) κυττάρων MEF με ή χωρίς απαλοιφή της HuR και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση των εκχυλισμάτων μέσω αντισώματος κατά της hnRNP A1. Τα ανοσοζήματα που προέκυψαν πλύθηκαν με 150 ή 300 mM NaCl αντίστοιχα για τον χαρακτηρισμό της σταθερότητας των ανοσοσυμπλόκων. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε για κάθε πληθυσμό κυττάρων ένα mock IP ως αρνητικός μάρτυρας καθώς και μικρή ποσότητα συνολικού (input). Οι πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE, και αφού μεταφέρθηκαν στην μεμβράνη, έγινε ανοσοσύτωση με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών hnRNP C1/C2, A1 και A3 και HuR.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Γ.35, στα πυρηνικά εκχυλίσματα η πρωτεΐνη hnRNP C1/C2 εμφάνισε σχετική αύξηση στο πυρηνικό ανοσοζήμα της hnRNP A1 κυττάρων MEF απουσία HuR (KO HuR) συγκριτικά με τα κύτταρα WT. Επισημαίνεται ότι η διαφοροποίηση αυτή φαίνεται να είναι ειδική μόνο για την C1/C2 αφού το ίδιο δεν φαίνεται να συμβαίνει στην πρωτεΐνη hnRNP A3 που συγκατακρημνίζεται στο ίδιο ανοσοζήμα μέσω της A1. Η αντίστοιχη ανάλυση των κυτταροπλασματικών hnRNP A1 συμπλόκων στα κύτταρα MEF δεν έδειξε καμία διαφορά στα επίπεδα των συγκατακρημνισιμων πρωτεϊνών μεταξύ WT και KO HuR (μη εικονιζόμενο αποτέλεσμα).

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι προκαταρκτικά και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση, υποδηλώνουν όμως μια ιδιαίτερη σχέση hnRNP C1/C2 και HuR, η οποία υποστηρίζεται και από τα πειράματα θερμικού στρες στα κύτταρα A549.



**Εικόνα Γ.35:** Αύξηση των επιπέδων της hnRNP C1/C2 στο πυρηνικό ανοσοίζημα της hnRNP A1 σε κύτταρα MEF απουσία HuR (ko HuR)

Ανοσοκατακρήμιση πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων MEF με (ko HuR) ή χωρίς (wt) απαλοιφή της HuR μέσω του αντισώματος α-hnRNP A1. Αναγνώριση των πρωτεϊνών του ανοσοιζήματος και των εκχυλισμάτων (εκχυλ.) μέσω ειδικών αντισωμάτων κατά πρωτεϊνών hnRNP (C1/C2, A1, A3) και HuR. Σημειώνεται με κόκκινο κύκλο η σχετική αύξηση της hnRNP C1/C2 στο ανοσοίζημα της A1 στα κύτταρα με απαλοιφή της HuR.



## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή, δόθηκε έμφαση στον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης RNA (RBPs) που ανήκουν στην οικογένεια των hnRNPs, καθώς και στην ομάδα πρωτεϊνών ARE-BP λόγω της ικανότητας να προσδένουν σε στοιχεία ARE μιας κατηγορίας mRNAs με αντιπροσωπευτικό εκπρόσωπο την πρωτεΐνη HuR. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην ταυτοποίηση αλλαγών στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών κατά την καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα σε ζωικά πειραματικά πρότυπα καθώς και σε κυτταρικές σειρές. Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν νέες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών hnRNP και HuR σε πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP και κυτταροπλασματικά mRNP και μελετήθηκε η επίδραση θερμικού στρες στην διασύνδεση HuR-hnRNPs.

Η συμμετοχή των πρωτεϊνών hnRNP σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες που αφορούν την βιογένεση του mRNA τις καθιστά σημαντικούς γονιδιακούς ρυθμιστές (Dreyfuss et.al., 2002). Σημαντική βαρύτητα φαίνεται να έχει η συμμετοχή τους στο εναλλακτικό μάτισμα στον πυρήνα όπου ανταγωνίζονται άλλους παράγοντες μάτισματος (πρωτεΐνες SR). Μέλη της οικογένειας των hnRNPs με ικανότητα παλινδρόμησης μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος φαίνεται να επηρεάζουν την σταθεροποίηση/αποσταθεροποίηση mRNA στόχων στο κυτταρόπλασμα λόγω της ιδιότητας να προσδένουν στοιχεία ARE των mRNA-στόχων. Κατεξοχήν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση/μετάφραση mRNA-στόχων έχει η κατηγορία των πρωτεϊνών ARE-BP (όπως η HuR, TIA-1, TIAR). Συνεπώς, η απορύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών RBP αναμένεται να επηρεάσει τα υποσύνολα των mRNAs που βρίσκονται σε ειδική διασύνδεση με κάθε μία από τις πρωτεΐνες RBP, με αποτέλεσμα την διαφορική έκφραση ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων και κατά συνέπεια τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ανάπτυξη νεοπλασιών (Carpenter, et. al., 2005).

Στον ανθρώπινο καρκίνο, υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών σχετικών με την απορύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών RBP (hnRNP και ARE-BP), όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Εισαγωγή. Η πρώτη ένδειξη εμπλοκής της πρωτεΐνης HuR στην καρκινογένεση ήταν η παρατήρηση ότι οι πρωτεΐνες Hu/ELAV αποτελούν συχνά αντιγόνα που εμφανίζονται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό (NSCLC) καρκίνο του πνεύμονα (Dalman et. al., 1990). Αργότερα,

πολλές αναφορές συνέδεσαν την υπερέκφραση της HuR με διάφορους τύπους καρκίνου (Lopez de Silanes et. al., 2005). Ειδικότερα, στον καρκίνο του πνεύμονα έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν την υπερέκφραση πρωτεϊνών hnRNP, τόσο σε κυτταρικές σειρές μικροκυτταρικού (SCLC) και μη-μικροκυτταρικού (NSCLC) καρκίνου του πνεύμονα όσο και σε βιοψίες ασθενών (Pino, et al, 2003, Wu, et. al., 2003). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης hnRNPA2 αλλά και της ισομορφής της B1 (προϊόν εναλλακτικού ματίσματος της κύριας μορφής A2) ήδη από πρώιμα στάδια πνευμονικής εξαλλαγής, γεγονός που οδήγησε στο να θεωρηθεί η υπερέκφραση της hnRNP A2/B1 ως δυνητικός πρώιμος δείκτης καρκίνου του πνεύμονα (Zech et. al., 2006). Ωστόσο, η καθιέρωσή τους ως νέων αξιόπιστων βιοδεικτών, καθώς και οι μοριακοί μηχανισμοί της υπερέκφρασης και της άμεσης ή έμμεσης συμμετοχής στην επαγωγή, καθιέρωση και εξέλιξη του φαινομένου της καρκινικής εξαλλαγής, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Η ανάπτυξη και η εφαρμογή πειραματικών προτύπων καρκίνου του πνεύμονα τα τελευταία χρόνια, κυρίως μέσω χημικής επαγωγής και διαγονιδιακών συστημάτων (Meuwissen & Berns, 2005), έχει προσφέρει το πλεονέκτημα της ελεγχόμενης ανάπτυξης καρκινωμάτων και την διερεύνηση της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων (ογκογονιδίων και κατασταλτικών γονιδίων) για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα. Ωστόσο, η εφαρμογή πειραματικών μοντέλων ποντικού στον καρκίνο του πνεύμονα είναι επί του παρόντος πολύ περιορισμένη αναφορικά με την έκφραση των πρωτεϊνών RBP, γεγονός που αφήνει περιθώρια για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου σε πειραματικά πρότυπα.

#### **Δ.1 Συγκριτική ανάλυση των προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών RBP στον άνθρωπο και στα τρωκτικά**

Βάση των παραπάνω, στην παρούσα εργασία και με την διαθεσιμότητα ειδικών αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών hnRNP αλλά και πρωτεϊνών ARE-BP (όπως HuR και TIA-1), κρίθηκε αρχικά σκόπιμο να συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP και HuR, μεταξύ καρκινικών κυτταρικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης (HeLa, A549) και αρουραίου (Novikoff). Η συγκριτική αυτή ανάλυση θεωρήθηκε αναγκαία προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές διαφοροποιήσεις και να ληφθούν υπόψη στην μετέπειτα εφαρμογή πειραματικών μοντέλων ποντικού με χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα. Όπως παρουσιάζεται στα Αποτελέσματα

(Εικόνα Γ.5), παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα κυτταρικά συστήματα ανθρώπου και τρωκτικών αναφορικά με την υποκυτταρική εντόπιση, τα επίπεδα και την παρουσία πιθανών μετα-μεταφραστικών αλλαγών. Οι διαφοροποιήσεις αυτές που παρατηρήθηκαν και αφορούν σε εξελικτικά συντηρημένες στα θηλαστικά πρωτεΐνες, όπως είναι οι hnRNP και HuR, αναμένεται να επηρεάζουν την μετα-μεταγραφική επεξεργασία των ειδικών για κάθε πρωτεΐνη mRNA-στόχων και να προσδιορίζουν συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης γονιδίων ανάμεσα στον άνθρωπο και στα τρωκτικά .

Επισημαίνεται ότι η σημαντικότερη διαφοροποίηση εντοπίστηκε στην ταυτοποίηση ειδικών ισομορφικών τύπων της πρωτεΐνης hnRNP A3, ανάμεσα στα κυτταρικά συστήματα ανθρώπου και τρωκτικών (Εικόνα Γ.6). Πρόσφατα, υπήρξε η δυνατότητα στο εργαστήριο παραγωγής σε κουνέλια ενός νέου αντισώματος κατά του απομονωμένου καρβοξυτελικού βοηθητικού μοτίβου της hnRNP A3 (Plomaritoglou, et. al., 2000). Η εφαρμογή σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης του νέου αντισώματος έδειξε την αποκλειστική παρουσία μιας κύριας ισομορφής της hnRNP A3 (A3/mBx) στα τρωκτικά (κύτταρα Novikoff) σε σύγκριση με ανθρώπινα κύτταρα HeLa και A549 σε πηκτώματα μιας διάστασης (1D) αλλά και 2D τύπου NEPHGE/SDS-PAGE (Εικόνα Γ.7). Η σύγκριση επεκτάθηκε και σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα δύο νέων κυτταρικών σειρών προέλευσης πνεύμονα ποντικού, των CMT64/61 (καρκίνωμα) και LA-4 (αδένωμα), οι οποίες εξετάστηκαν σε άμεση αντιδιαστολή με τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Εικόνα Γ.23). Από τα παραπάνω, επιβεβαιώθηκε η παρουσία δύο ισομορφικών τύπων της πρωτεΐνης hnRNPA3: της A3 με μοριακό βάρος 41/41,5 kDa η οποία αποτελεί την κοινή μεταξύ ανθρώπου και τρωκτικών ισομορφή, και της A3/mBx με μοριακό βάρος 38/39 kDa που συνιστά την κύρια ισομορφή της hnRNP A3 στα τρωκτικά και φαίνεται να απουσιάζει από τα ανθρώπινα κύτταρα. Επιπλέον, η σύγκριση ανέδειξε και την διαφορά στα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών hnRNP A1 και A3, με την hnRNP A3 (A3 και A3/mBx) να υπερτερεί στα τρωκτικά, έναντι της hnRNP A1 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας τον συμπληρωματικό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στα θηλαστικά. Η παραπάνω παρατήρηση είναι σε συμφωνία με πρόσφατη αναφορά που υποστηρίζει την συμπληρωματική δράση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A3 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε ανθρώπινα κύτταρα Colo 16 (He, et. al., 2005). Ας σημειωθεί ότι μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNP

τύπου A/B, οι hnRNP A1 και A3 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων (Ma et. al., 2002).

Λόγω της ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας που ενδέχεται να έχει η hnRNP A3 στα τρωκτικά, αλλά και της περιορισμένης κατανόησης, συγκριτικά με τις άλλες A/B, του ειδικού ρόλου της πρωτεΐνης, έγινε εφαρμογή πειραμάτων siRNA για την ειδική στόχευση του mRNA της hnRNP A3 και δραστική μείωση των επιπέδων της. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται στην στοχευμένη αδρανοποίηση του mRNA μιας πρωτεΐνης μέσω ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών για περιοχές του mRNA. Η τεχνολογία των siRNA εφαρμόστηκε σε κυτταρικά συστήματα ποντικού, τις δύο καρκινικές σειρές του πνεύμονα LA-4 και CMT64/61 που αντιπροσωπεύουν δύο διακριτά στάδια (προ-καρκινικό και καρκινικό στάδιο, αντίστοιχα), με σκοπό την ταυτοποίηση mRNA-στόχων αλλά και τον ενδεχόμενο συσχετισμό με το στάδιο της καρκινικής εξαλλαγής, σε αντιστοιχία με πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αναφορικά με άλλες πρωτεΐνες hnRNP. Ιδιαίτερη σημασία για την ανάδειξη της εμπλοκής πρωτεϊνών hnRNP A/B στην καρκινική πορεία των κυττάρων έχουν πρόσφατες μελέτες από τους Party et. al (2003, 2004). Η εφαρμογή πειραμάτων siRNA με στόχο τις πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 σε καρκινικές και μη-καρκινικές (αθανατοποιημένες) κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού, έδειξε ότι η συνδυασμένη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων τους οδήγησε σε απόπτωση τα καρκινικά αλλά όχι τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τις πρωτεΐνες hnRNP A1 και A2/B1 ως πιθανούς στόχους φαρμάκων με αντικαρκινική δράση.

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα των siRNA έναντι του mRNA της hnRNP A3. Η δοκιμασία έγινε στις δύο κυτταρικές σειρές του πνεύμονα ποντικού CMT64/61 και LA-4 (καρκίνωμα και αδένωμα, αντίστοιχα), καθώς και σε αθανατοποιημένα κύτταρα MEF (εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού). Στόχος ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης hnRNP A3 στα τρωκτικά όπου υπερτερεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης έναντι των άλλων πρωτεϊνών A/B, γεγονός που ενδέχεται να έχει ιδιαίτερη βαρύτητα στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο γονιδίων του ποντικού. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω παροδικής επιμόλυνσης με μείγμα 4 ολιγονουκλεοτιδίων στις καρκινικές σειρές CMT64/61 και LA-4 και κύτταρα MEF δεν ήταν ικανοποιητικά. Προσμετρήθηκε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης hnRNPA3 της τάξεως περίπου 30% και στις τρεις κυτταρικές σειρές (LA-4,

CMT64/61 και MEF). Λόγω της σχετικά μικρής μείωσης, αλλά κυρίως λόγω προβλημάτων επαναληψιμότητας των παραπάνω ποσοστών μείωσης, τα αποτελέσματα επιδέχονται βελτίωση. Η έλλειψη σχετικών βιβλιογραφικών αναφορών για τις κυτταρικές σειρές LA-4 και CMT64/61 μας αναγκάζει να δοκιμάσουμε διαφορετικούς τρόπους προσέγγισης. Αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι η μόνη βιβλιογραφική αναφορά που δείχνει μείωση της hnRNP A3 αφορά την ανθρώπινη καρκινική σειρά του παχέους εντέρου Colo16 μέσω σταθερής επιμόλυνσης με shRNA (He, et. al., 2005). Επι του παρόντος σχεδιάζεται η δοκιμασία σταθερής επιμόλυνσης για την αποτελεσματική μείωση της hnRNP A3 σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Απώτερο στόχο των πειραμάτων αποτελεί η ταυτοποίηση των mRNAς που βρίσκονται σε διασύνδεση με την hnRNP A3 και η συσχέτισή τους με τα mRNAς των hnRNP A/B (A1 και A2/B1), αλλά και με το στάδιο του καρκινικού μετασχηματισμού, σε κυτταρικά συστήματα τρωκτικών και ανθρώπου. Επιπλέον, αναμένεται να αναδειχθεί ο ειδικός ρόλος που ενδέχεται να έχει η πρωτεΐνη hnRNP A3 στα τρωκτικά, κατά κύριο λόγο η ισομορφή A3/mBx που αποτελεί μαζί με την A2/B1 τις κύριες μορφές πρωτεϊνών στα τρωκτικά.

## **Δ.2 Έκφραση πρωτεϊνών hnRNP/mRNP στον χημικά επαγόμενο καρκίνο του πνεύμονα του ποντικού**

Όπως προ-αναφέρθηκε, υπάρχει μικρός αριθμός δημοσιεύσεων αναφορικά με την έκφραση των πρωτεϊνών hnRNP και της HuR κατά την καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα στα τρωκτικά. Κατά κύριο λόγο, η ομάδα του Malkinson (Blaxall et al, 2000) μελέτησε την έκφραση και την υποκυτταρική εντόπιση των HuR και hnRNP D (AUF1), δύο πρωτεϊνών RBP με ανταγωνιστική δράση στην σταθεροποίηση κοινών mRNA-στόχων (Loflin et. al., 1999, P., Brennan & Steitz, 2001). Η μελέτη έγινε στον πνεύμονα ποντικών στελέχους A/J, μετά από χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα με ουρεθάνη. Ο παράλληλος έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών στον πνεύμονα ποντικών στελέχους BALB/c έπειτα από χορήγηση BHT (butylated-hydroxytoluene), παράγοντα που οδηγεί στην εμφάνιση φλεγμονής αλλά όχι καρκινικής εξαλλαγής, καθώς και σε κυτταρικές σειρές διαφορετικού ρυθμού πολλαπλασιασμού και νεοπλασματικού σταδίου, έδειξε την υπερέκφραση των πρωτεϊνών HuR και hnRNP D στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα ήδη από το στάδιο της υπερπλασίας (Blaxall et al, 2000). Από την μελέτη αυτή υποστηρίζεται η συμμετοχή των πρωτεϊνών HuR και hnRNP D στην ρύθμιση της

σταθερότητας/μεταφρασιμότητας mRNA-στόχων στο κυτταρόπλασμα, ήδη από το στάδιο της φλεγμονής έως και την καρκινική εξαλλαγή (Blaxall et al, 2000). Η ίδια ομάδα (Zerbe, et.al., 2004) συνέκρινε την έκφραση δύο ανταγωνιστικών παραγόντων του εναλλακτικού ματίσματος, την hnRNP A1 και την ASF/SF2 (γνωστού παράγοντα ματίσματος) κατά την ανάπτυξη νεοπλασίας στον πνεύμονα ποντικών στελέχους BALB/c, έπειτα από την συνδυαστική χορήγηση των παραγόντων MCA και BHT (methylcholanthrene και butylated-hydroxytoluene). Παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών σε καλοήθεις όγκους και σε μη-νεοπλασματικό, υπερπλαστικό ιστό πνεύμονα συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό. Ιδιαίτερη σημασία αποδόθηκε στην παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη hnRNP A1 παρουσίασε αύξηση 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή του παράγοντα ASF/SF2 στο στάδιο του αδενοκαρκινώματος και εξ' αυτού συμπεραίνεται ο μεγαλύτερος βαθμός συμμετοχής της hnRNP A1 στην εξέλιξη της καρκινικής εξαλλαγής. Η παρατήρηση αυτή συνοδεύεται και με παράλληλη εμφάνιση καρκινοεξαρτώμενων ισομορφών του γονιδίου CD44, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, που σχετίζονται με την μετάσταση (Zerbe, et.al., 2004).

Είναι επίσης γνωστό (Montuenga, et. al., 1998) ότι οι πρωτεΐνες hnRNP A/B, ειδικότερα η A2/B1, εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα στον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό του ενήλικα ποντικού, συγκριτικά με τα υψηλά επίπεδα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του πνεύμονα. Λόγω της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP A/B που παρατηρείται στον καρκίνο του πνεύμονα αναφέρονται ως πρωτεΐνες με ογκοεμβρυϊκή δράση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι και τα αποτελέσματα από την σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B σε ιστούς ενήλικα ποντικού στελέχους CD1 (Εικόνα Γ.9), όπου τα χαμηλότερα επίπεδα των hnRNPA/B, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς, εμφανίζονται στον πνεύμονα (με εξαίρεση την καρδιά).

Στην παρούσα διατριβή, τα πρότυπα έκφρασης των hnRNP και HuR εξετάστηκαν σε τρία πειραματικά μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα στον ποντικό, με την εφαρμογή των αμιγών στελεχών A/J και B6/129 καθώς και του μη- αμιγούς στελέχους CD1. Η χημική επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα έγινε με ουρεθάνη (στελέχη A/J και B6/129) και με τους αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες DB(a,l)P και B(b)F (στέλεχος CD-1), καρκινογόνες ουσίες γνωστές για την ικανότητά τους να προκαλούν στοχευμένη καρκινική εξαλλαγή στον πνεύμονα ποντικού (Malkinson, 1992, Titis &

Forkert, 2001, Hecht, 1999, Kim, & Lee, 1996). Η μελέτη περιλάμβανε συνδυασμό πειραματικών προσεγγίσεων όπως ανοσοχημικό προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών RBPs σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του πνεύμονα καθώς και ιστολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 στα στελέχη A/J και B6/129.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών RBP κατά την καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα (στα στελέχη που επελέγησαν και κάτω από την επίδραση των συγκεκριμένων καρκινογόνων ουσιών) δεν ήταν συμβατά με αύξηση των επιπέδων των hnRNP A/B και HuR. Αντίθετα, είναι σε προφανή αντιδιαστολή με αποτελέσματα άλλων μελετών, κυρίως αναφορικά με τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα. Από το σύνολο των ευρημάτων (βιοχημική/ανοσοϊστοχημική ανάλυση) δεν υπήρξαν ενδείξεις για εμφανή αύξηση των επιπέδων των RBP (των hnRNP A/B αλλά και HuR) στον καρκινικό πνευμονικό ιστό συγκριτικά με τον φυσιολογικό. Σε γενική συμφωνία με τα αποτελέσματα του βιοχημικού ελέγχου όπου, τα επίπεδα των πρωτεϊνών RBP στον καρκινικό ιστό πνεύμονα ήταν σε γενικές γραμμές χαμηλά, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2/B1 στον πνευμονικό ιστό των στελεχών A/J και B6/129 κατέδειξε μία χαμηλής έντασης πυρηνική χρώση στην εστία του καρκίνου, παρόμοιας έντασης με αυτή των επιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού ιστού. (Εικόνες Γ.12 και Γ.17). Σημειώνεται και η εμφάνιση ανοσοϊστοχημικής ετερογένειας με εμφανή την παρουσία κυττάρων χωρίς χρώση. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία κυτταρικών κλώνων διακριτής προέλευσης και έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Pino et al., 2003, Zerbe et al., 2004). Σημαντικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών σημειώθηκε και ανάμεσα στα στελέχη των ποντικών. Ειδικότερα, στον καρκινικό πνευμονικό ιστό των στελεχών B6/129 και CD1 σημειώθηκε μείωση των επιπέδων της HuR (Εικόνα Γ.18) και των hnRNP A/B (Εικόνα Γ.20) συγκριτικά με τα ζώα-μάρτυρες. Η παρουσία μικρής κλίμακας αλλαγών στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανάμεσα στον καρκινικό και φυσιολογικό ιστό θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στην αραίωση που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα κατά την ομογενοποίηση ολόκληρου του πνευμονικού ιστού. Αυτό θα εξηγούσε την απουσία αύξησης (μικρού βαθμού) στα επίπεδα των hnRNP A/B που παρατηρήθηκε στο στέλεχος A/J, όχι όμως την μείωση των επιπέδων των hnRNP A/B και HuR στον καρκινικό έναντι του φυσιολογικού ιστού στα ζώα B6/129

και CD1. Επιπρόσθετα, λόγω της ευαισθησίας των ποντικών A/J και της διατήρησης της αποικίας των ζώων, που αποτέλεσε και το βασικό στέλεχος προς διερεύνηση, δεν ήταν δυνατή η σταδιοποίηση της καρκινικής εξαλλαγής του πνεύμονα (Εικόνα Γ.10), με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου των επιπέδων των πρωτεϊνών hnRNP A/B σε πρώιμα στάδια.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή πειραματικών μοντέλων ποντικού έρχονται σε προφανή αντιδιαστολή με δεδομένα που αφορούν τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, όπου παρουσιάζεται η σε υψηλά ποσοστά υπερέκφραση των hnRNP και HuR σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Εικόνα Γ.21). Εντούτοις, τα παραπάνω ευρήματα είναι σε γενική συμφωνία και υποστηρίζονται από τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα των Peebles et. al (2007). Η ομάδα αυτή εξέτασε τα επίπεδα της πρωτεΐνης hnRNP A2/B1 κατά την καρκινική εξαλλαγή του πνεύμονα χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά στελέχη ποντικών (A/J και BALB) και δύο καρκινογόνες ουσίες (ουρεθάνη και MCA/BHT) για την επαγωγή νεοπλασίας. Η ανοσοχημική ανάλυση ολικών εκχυλισμάτων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού ποντικών στελέχους A/J μετά την χορήγηση ή μη ουρεθάνης έδειξε μια μικρής έκτασης αύξηση (περίπου 2x) των επιπέδων της hnRNP A2/B1 μέσα στην καρκινική εστία. Επιπρόσθετα, πειράματα ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό της A2/B1 στον πνευμονικό ιστό των A/J και BALB ποντικών μετά την χημική επαγωγή καρκινικής εξαλλαγής είτε με ουρεθάνη είτε με τον συνδυασμό των παραγόντων MCA και BHT (προαγωγός/ενισχυτής της καρκινικής εξαλλαγής του πνεύμονα), έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της hnRNP A2/B1. Το γενικό συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης του πνευμονικού καρκίνου, το γενετικό υπόβαθρο, την ευαισθησία του κάθε στελέχους και τον τύπο της χημικής επαγωγής τα επίπεδα της A2/B1 εμφανίζουν αύξηση, μείωση ή παραμένουν σταθερά κατά την σταδιοποίηση του καρκινικού φαινομένου. Τα συμπεράσματα αυτά είναι σε γενικές γραμμές συμβατά με αυτά της παρούσας διατριβής. Τα επίπεδα των υπό εξέταση πρωτεϊνών hnRNP A/B και HuR παρουσίασαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών και των διαφορετικών σχημάτων χημικής επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα που κυμάνθηκαν από μικρής έκτασης αύξηση έως σαφή μείωση στον καρκινικό συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό. Είναι γνωστή η συμμετοχή πληθώρας γενετικών τόπων υπεύθυνων για την ευαισθησία αμιγών και μη στελεχών στην χημικά επαγόμενη καρκινογένεση και στη



φλεγμονή. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γενετικό υπόβαθρο του κάθε στελέχους το οποίο καθορίζει τον τύπο και έκταση των μοριακών αλλαγών, που προκύπτουν από την έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες και οδηγούν στον καρκινικό μετασχηματισμό (Bauer, et. al., 2004, Manenti, et. al., 2003). Ως αποτέλεσμα, ένα ή περισσότερα από τα εμπλεκόμενα γονίδια επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την έκφραση πρωτεϊνών RBP (αλλαγές επιπέδων, υποκυτταρική κατανομή, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις) που με την σειρά τους καθορίζουν την μετα-μεταγραφική τύχη του υποσυνόλου των mRNAs που βρίσκονται σε διασύνδεση.

Με βάση τα προαναφερθέντα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση που προέκυψε στην παρούσα Διατριβή από την συγκριτική ανάλυση απομονωμένων, μέσω ssDNA, πρωτεϊνών RBP του καρκινικού ιστού έναντι του φυσιολογικού από τον πνεύμονα ποντικών A/J. Συγκεκριμένα, και σε αντιδιαστολή με την HuR η οποία παρέμεινε μη προσδέσιμη στο ssDNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα τόσο του φυσιολογικού όσο και του καρκινικού ιστού, οι πρωτεΐνες hnRNP A/B ,και ιδιαίτερα η A3, έχασαν την ιδιότητα αυτή στον καρκινικό ιστό (Εικόνα Γ.15). Η σημαντική αυτή αλλαγή αποτελεί ένδειξη παρουσίας, στο ζώο με τα πνευμονικά καρκινώματα, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, πολύ πιθανά φωσφορυλιώσεων που αλλάζουν το φορτίο της πρωτεΐνης και συνεπώς την ικανότητα πρόσδεσης στο ssDNA/RNA. Η διαφοροποίηση αυτή αποτελεί ένα είδος αλλαγής η οποία αναμένεται να έχει μεγάλες επιπτώσεις στις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με το RNA αλλά και μεταξύ των πρωτεϊνών. Η αλλαγή στο βαθμό φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών hnRNP είναι ένα γνωστό φαινόμενο το οποίο έχει παρατηρηθεί κατά την καρκινική εξαλλαγή και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε ογκογονικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (Matter, et. al., 2000, Perrotti & Neviani, 2007).

Τα ευρήματα που προκύπτουν από την μελέτη του χημικά επαγόμενου καρκινικού μετασχηματισμού στον πνεύμονα σε τρία διαφορετικά στελέχη ποντικών υποδηλώνουν την παρουσία σημαντικών διαφοροποιήσεων στους μηχανισμούς επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ τρωκτικών και ανθρώπου και επιβεβαιώνουν την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει το καρκινικό φαινόμενο. Είναι προφανές ότι οι διαφοροποιήσεις αυτές πρέπει να ληφθούν υπόψη στην προέκταση των ζωικών μοντέλων στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα αναφορικά με την εμπλοκή πρωτεϊνών hnRNP. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει και την ανάγκη για μια

πιο λεπτομερή ανάλυση των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών hnRNP τύπου A/B σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια καρκίνου του πνεύμονα, και την αναζήτηση και ταυτοποίηση καρκινοεξαρτώμενων αλλαγών σε μοριακό επίπεδο.

### **Δ.3 Συμμετοχή της πρωτεΐνης HuR σε σύμπλοκα hnRNP και mRNA**

Με δεδομένη την υπερέκφραση των πρωτεϊνών HuR και hnRNP στον ανθρώπινο καρκίνο, την κατεξοχήν πυρηνική εντόπισή τους και την ικανότητα να προσδένουν στοιχεία ARE που ρυθμίζουν τη σταθεροποίηση ή/και μεταφρασιμότητα του mRNA στο κυτταρόπλασμα, θεωρήθηκε σκόπιμο να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν πιθανές διασυνδέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών, κυρίως αναφορικά με την συνύπαρξή τους σε σύμπλοκα hnRNP και mRNA.

Στην παρούσα διατριβή, επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα της πρωτεΐνης HuR να συγκατακρημνίζεται με πρωτεΐνες hnRNP σε σύμπλοκα hnRNP και mRNA, από κυτταρικά εκχυλίσματα θηλαστικών. Επί του παρόντος, με εξαίρεση την διασύνδεση της HuR με την hnRNP D (AUF1), υπάρχουν περιορισμένες αναφορές που υποδηλώνουν την πιθανή διασύνδεση της HuR και με άλλες πρωτεΐνες hnRNP, σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (Gallouzi, et. al., 2001, Lal, et. al., 2004). Η ταυτοποίηση και η λεπτομερής ανάλυση των διασυνδέσεων της πρωτεΐνης HuR με σύμπλοκα hnRNP/mRNA που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή αποτελούν σημαντικά ευρήματα δεδομένου ότι η HuR είναι μια άφθονη πρωτεΐνη RBP, εκφράζεται ευρέως σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και έχει κύρια πυρηνική εντόπιση (90% της συνολικής πρωτεΐνης) με ικανότητα παλινδρόμησης μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, ιδιότητες που μοιράζεται με αρκετά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hnRNP (Ma, et.al., 1996, Fan & Steitz, 1998). Προβλέπεται ότι, λόγω της ιδιότητάς της να συμμετέχει σε διαφορετικά στάδια επεξεργασίας του mRNA, από τον πυρήνα ως το κυτταρόπλασμα, η HuR δημιουργεί ένα ευρύ φάσμα αλληλεπιδράσεων με άλλους κυτταρικούς παράγοντες, ιδιαίτερα με άλλες πρωτεΐνες RBPs. Το εύρος αυτών των πιθανών αλληλεπιδράσεων παραμένει πλήρως ανεξερεύνητο. Επί του παρόντος, οι σχετικές μελέτες αναφορικά με την ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες, αφορούν αλληλεπιδράσεις (τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) της HuR με τέσσερεις πρωτεΐνες θηλαστικών: τους αναστολείς της φωσφατάσης 2A SETa και b, pp32 και APRIL

(Brennan, et. al., 2000). Επιπρόσθετα, πρόσφατη έρευνα επιβεβαίωσε την ικανότητα της πρωτεΐνης AUF1/hnRNP D να σχηματίζει πυρηνικά και κυτταροπλασματικά ετεροδιμερή HuR/AUF1 σε κύτταρα *in vivo* αλλά και σε μονιμοποιημένα κύτταρα τρωκτικών, μέσω πειραμάτων φθορίζουσας μεταφοράς ενέργειας συντονισμού (FRET) (David, et. al., 2007).

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη με την εφαρμογή πειραμάτων IPs έδειξαν την ικανότητα της HuR να διασυνδέεται με συστατικά των συμπλόκων hnRNP και mRNP. Οι αλληλεπιδράσεις εντοπίστηκαν αρχικά στα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP καθώς και στα κυτταροπλασματικά σύμπλοκα mRNP, που απομονώθηκαν μέσω του αντισώματος κατά της πρότυπης πρωτεΐνης hnRNP A1. Σημειώνεται ότι η hnRNP A1 ανήκει μαζί με τις A2/B1 και A3 στις πρωτεΐνες τύπου A/B και συγκροτούν, μαζί με την hnRNP C1/C2, τις λεγόμενες πρωτεΐνες “core”. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και με την χρήση του αντισώματος 4F4 έναντι της αποκλειστικά πυρηνικής πρωτεΐνης hnRNP C1/C2, τα οποία έδειξαν διασύνδεση της HuR αποκλειστικά στα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP (Εικόνα Γ.27). Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σε κύτταρα HeLa (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992), παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη η αποκλειστική πυρηνική εντόπιση της hnRNP C1/C2 στην κυτταρική σειρά A549. Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που υποδηλώνουν την παρουσία της hnRNP C1/C2 και στο κυτταρόπλασμα, καθώς και την ικανότητά της να προσδένεται σε στοιχεία ARE, σε αντιστοιχία με άλλες πρωτεΐνες hnRNP όπως για τις hnRNP A1 και AUF-1/hnRNP D (Hamilton, et. al., 1993, Kandasamy & Kraft, 2008). Η κυτταροπλασματική εντόπιση της hnRNP C1/C2 σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία (σε αντίθεση με κύτταρα HeLa) αποδίδεται στον κυτταρικό τύπο καθώς και στο αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων (Hamilton, et. al., 1993). Ας σημειωθεί τέλος ότι η ικανότητα πρόσδεσης της hnRNP C1/C2 σε στοιχεία 3'UTRs και η ακόλουθη σταθεροποίηση ειδικών mRNA στόχων έχει τεκμηριωθεί (Tran, et.al., H., 2003, Esnault & Malter, 2003).

Η παράλληλη επεξεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων με RNάση A έδειξε ότι οι διασυνδέσεις μεταξύ της HuR και των πρωτεϊνών “core” hnRNP A1 και C1/C2 ήταν πλήρως εξαρτώμενες από το RNA, αποκλείοντας την παρουσία αλληλεπιδράσεων τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στα σύμπλοκα hnRNP και mRNP. Συνεπώς, οι συγκατακρημιζόμενες πρωτεΐνες hnRNP A1/HuR και hnRNP C1/C2/HuR

αντιπροσωπεύουν σύμπλοκα RNP διαφορετικά από αυτά που αναφέρονται στις διασυνδέσεις HuR με πρωτεΐνες SET από ολικά εκχυλίσματα κυττάρων με επίδραση RNάσης (Brennan, et. al., 2000). Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι η διασύνδεση της HuR με τα ανοσοσυμπλέγματα της hnRNP A1 και της C1/C2 εμφάνισε παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά άλλων πρωτεϊνών hnRNP (όπως των hnRNP A3 και L) εντός των ίδιων συμπλόκων αναφορικά με την ευαισθησία στην επίδραση RNάσης και στην αυξημένη αλατότητα.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν αποτελέσματα που έδειξαν ότι η HuR έχει δυνητικά την ικανότητα να διασυνδέεται στο πυρηνικό διαμέρισμα και με μια άλλη πρωτεΐνη hnRNP A/B (εκτός της hnRNP A1), την hnRNP A3, σε αντίθεση με την συγγενική hnRNP A2 (εικόνα Γ.30). Το αποτέλεσμα αυτό βασίστηκε σε *in vitro* πειράματα pull-down μέσω του καρβοξυτελικού βοηθητικού μοτίβου της hnRNP A3, απουσία του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης (Plomaritoglou, et. al., 2000). Λόγω της μεγάλης ομολογίας που εμφανίζουν οι αλληλουχίες των μοτίβων πρόσδεσης RNA (τα δύο μοτίβα RRM στο αμινοτελικό άκρο), είναι γνωστό ότι η εξειδίκευση των hnRNP τύπου A/B αποδίδεται κυρίως στο βοηθητικό μοτίβο του καρβοξυτελικού άκρου το οποίο είναι υπεύθυνο κυρίως για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Biamonti & Riva, 1994). Αντίθετα με τα ανοσοσύμπλοκα της hnRNP A1 και hnRNP C1/C2, η διασύνδεση *in vitro* της HuR με το καρβοξυτελικό άκρο της hnRNP A3 στο πυρηνικό διαμέρισμα δεν ήταν εξαρτώμενη από το RNA, ενδεικτικό της ικανότητας των δύο πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους χωρίς την παρεμβολή του RNA. Ωστόσο, παραμένει να αποδειχθεί εάν η αλληλεπίδραση είναι άμεση ή χρειάζεται διαμεσολάβηση μιας άλλης πρωτεΐνης καθώς και να αποδειχθεί η *in vivo* παρουσία αυτής της αλληλεπίδρασης.

Οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από την μελέτη σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της HuR με τα πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η HuR συνδέεται κυρίως με την περιοχή "core" του συμπλόκου hnRNP το οποίο συγκροτούν οι πρωτεΐνες hnRNP A/B (A1, A2/B1, A3) και hnRNP C1/C2, μαζί με το pre- και mRNA που βρίσκεται σε διασύνδεση (Lothstein, et.al., 1985). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, το σύμπλοκο "core" αποτελείται από τον ομοιογενή πληθυσμό συμπλόκων 40S hnRNP. Ο πληθυσμός αυτός εμπλουτίζεται σε πυρηνικά εκχυλίσματα έπειτα από την περιορισμένη δράση νουκλεασών σε ετερογενή πυρηνικά σύμπλοκα 100-20S που βρίσκονται σε χαλαρή διασύνδεση με

άλλες πρωτεΐνες hnRNP εκτός αυτές του core συμπλόκου (Dreyfuss, et. al., 1993). Τα ευρήματα της εικόνας Γ.29 υποστηρίζουν τον σχηματισμό εντός του "core" hnRNP πεδίου ανεξάρτητων διασυνδέσεων της HuR με την hnRNP A1 ή την C1/C2, αντίστοιχα. Συνεπώς, η HuR μπορεί και διασυνδέεται με πρωτεΐνες hnRNP με ικανότητα ή μη να παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (hnRNP A1 και C1/C2, αντίστοιχα), υποδηλώνοντας πολλαπλούς τρόπους με τους οποίους η HuR αλληλεπιδρά με πυρηνικά σύμπλοκα hnRNP/mRNP. Επιπλέον, η ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων που παρατηρήθηκαν, παράλληλα με την απουσία της HuR στα απομονωμένα ανοσοσύμπλοκα του U-snRNP ματισματοσώματος (Εικόνα Γ.25) μας οδήγησε στο να προταθεί η άποψη ότι η HuR αποτελεί ένα νέο συστατικό των πυρηνικών συμπλόκων hnRNP. Το γεγονός ότι η HuR δεν έχει μέχρι στιγμής αναγνωριστεί ως συστατικό των συμπλόκων hnRNP (Dreyfuss, et. al., 1993) πιστεύουμε ότι σχετίζεται με την συνεντόπισή της με την hnRNP A1 σε πηκτώματα SDS/PAGE, αλλά κυρίως σε πηκτώματα 2D τύπου NEPHGE/SDS-PAGE (Εικόνα Γ.26). Λόγω του ότι η κυτταρική συγκέντρωση της hnRNP A1 είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη της HuR (Myer, et. al., 1997), η παρουσία της A1 στο ίδιο πηκτώμα φαίνεται να παρεμποδίζει την άμεση ταυτοποίηση της HuR στα απομονωμένα ανοσοσύμπλοκα hnRNP.

Σε αντίθεση με την ικανότητα ταυτοποίησης της HuR στα ανοσοσύμπλοκα hnRNP/mRNP, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα 3A2 κατά της HuR δεν έδωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα (Εικόνα Γ.2). Η χαμηλής απόδοσης ικανότητα συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών hnRNP μέσω αντισωμάτων κατά της HuR έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Lal, et. al., 2004, Gallouzi, et. al., 2001) και πολύ πιθανόν να αποτελεί την αιτία για την μέχρι στιγμής απουσία πειστικών στοιχείων για αλληλεπίδραση της HuR με πρωτεΐνες hnRNP. Είναι πιθανόν το πυρηνικό κλάσμα της HuR που βρίσκεται σε διασύνδεση με τα σύμπλοκα hnRNP (περίπου το 6% της συνολικής ποσότητας της HuR στα πυρηνικά εκχυλίσματα, όπως αναφέρθηκε στα Αποτελέσματα) να μην είναι προσιτό στα αντι-HuR αντισώματα.

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκαν και νέα δεδομένα αναφορικά με την πρόσδεση της HuR σε κυτταροπλασματικά σύμπλοκα mRNP. Η συγκατακρήμνιση in vitro της HuR με τις άλλες ARE-BP πρωτεΐνες TIA-1, TTP, καθώς και πρωτεΐνες hnRNP με ικανότητα παλινδρόμησης (συμπεριλαμβανομένων των hnRNP/D/AUF1, hnRNP A1, A2/B1, A3, L, M και U) και η πρόσδεση σε στοιχεία ARE στην περιοχή

3' UTR γνωστών mRNA-στόχων έχει τεκμηριωθεί από σειρά αναφορών (Cok, et. al., 2003, Blaxall, et. al., 2000, Cok, et. al., 2004). Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στοιχεία (Εικόνα Γ.27.A και Γ) που δείχνουν την ικανότητα της HuR να συγκατακρημνίζεται με την hnRNP A1 από κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, με τρόπο παρόμοιο με τα αντίστοιχα πυρηνικά σύμπλοκα σε ότι αφορά την ευαισθησία στην RNάση και στην αυξημένη αλατότητα. Τουλάχιστον δύο ακόμη πρωτεΐνες hnRNP ( hnRNP A3 και L) αλλά όχι η ARE-BP πρωτεΐνη TIA-1, συνυπάρχουν στα ίδια σύμπλοκα (υπενθυμίζεται και η ασθενής πυρηνική διασύνδεση HuR και hnRNP L: Εικόνα Γ.28). Δεδομένου ότι ο κύριος κυτταροπλασματικός ρόλος της HuR σχετίζεται με την σταθεροποίηση/μετάφραση mRNA-στόχων (Brennan & Steitz, 2001), η συγκατακρήμιση hnRNP A1 και HuR σε κυτταροπλασματικά σύμπλοκα mRNA ενδεχομένως να υποδηλώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες δρουν από κοινού, με ανταγωνιστικό ή συνεργιστικό τρόπο, σε ένα υποσύνολο mRNA-στόχων, καθορίζοντας την μετέπειτα κυτταροπλασματική τους πορεία.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε ένα πρωτόκολλο επί μέρους κυτταρικής κλασμάτωσης προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία και ο σχετικός εμπλουτισμός της HuR σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Όπως περιγράφεται και στα Αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μια αντιστοιχία στη γενική κατανομή της HuR και των hnRNPs. Συγκεκριμένα, εκτός από το κυτταροπλασματικό και πυρηνικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκαν σε διαλύματα φυσιολογικής αλατότητας (100-150mM NaCl), ένα σημαντικό ποσοστό της HuR εμφανίστηκε στο υπ-πυρηνικό κλάσμα S1. Το κλάσμα αυτό προέκυψε από την επανεκχύλιση του πυρηνικού ιζήματος σε αυξημένη αλατότητα (300mM NaCl) και αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο σε σύμπλοκα hnRNP με ισχυρότερη πρόσδεση στον πυρηνικό σκελετό, συγκριτικά με τα σύμπλοκα του πυρηνικού εκχυλίσματος. Σημαντικό ποσοστό της HuR εκχυλίστηκε και από τα κλάσματα S2D και S2R, εμπλουτισμένα σε πυρηνικά στοιχεία που συνδέονται με την χρωματίνη (επεξεργασία με DNάση) και το RNA (επεξεργασία με RNάση), αντίστοιχα (Εικόνα Γ.31.B). Επιπρόσθετα, η συγκατακρήμιση αν και διαφορετικού βαθμού της HuR με hnRNP A1 και C1/C2 ήταν εμφανής σε όλα τα πυρηνικά κλάσματα, με εξαίρεση το κλάσμα S2R (Εικόνα Γ.31.Γ). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την ικανότητα της HuR να παραμένει σε διασύνδεση, εξαρτώμενη από την παρουσία του RNA, στα σύμπλοκα hnRNP σε όλη την πυρηνική διαδρομή τους που περιλαμβάνει τον σχηματισμό νεοσυντηθέμενου

pre-mRNA σε διασύνδεση με την χρωματίνη, μέχρι τον σχηματισμό ώριμων μορίων mRNA με την μορφή συμπλόκων mRNP στο στάδιο μεταφοράς από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω των πυρηνικών πόρων.

Τα ευρήματα για την εξαρτώμενη από το RNA διασύνδεση της HuR με συστατικά των πυρηνικών συμπλόκων hnRNP/mRNP, δεν παρέχουν πειραματικά στοιχεία αναφορικά με την πρόσδεση της HuR στο πυρηνικό pre- ή mRNA. Βάση προηγούμενων αναφορών που υποστηρίζουν την διασύνδεση in vivo της HuR σε κυτταροπλασματικό (αλλά όχι σε πυρηνικό) poly-A<sup>+</sup> RNA, προτείνεται ότι η HuR προσδένει mRNA-στόχους που περιέχουν στοιχεία ARE πριν από την έξοδό της στο κυτταρόπλασμα (Gallouzi, et. al., 2000). Όπως παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη (Εικόνα Γ.31.Γ.), ένα μικρό μέρος της πυρηνικής HuR βρίσκεται σε σταθερή διασύνδεση με σύμπλοκα hnRNP που συνδέονται με την χρωματίνη και που αναμένεται να περιέχουν νεοσυντηθέμενο pre-mRNA. Αυτή η διασύνδεση ενδέχεται να μην αντιπροσωπεύει άμεση πρόσδεση της HuR σε νεοσυντηθέμενα μετάγραφα pre-mRNA, ωστόσο υποδηλώνει την ικανότητά της να διασυνδέεται με νεοσχηματιζόμενα σύμπλοκα hnRNP. Ειδικά στα σύμπλοκα hnRNP A1/HuR, η διασύνδεση αυτή φαίνεται να παραμένει και μετά την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα.

Στα πλαίσια της ρύθμισης της σταθερότητας ή/και μετάφρασης mRNA-στόχων που περιέχουν στοιχεία ARE και χαρακτηρίζονται από μεγάλο ρυθμό αποικοδόμησης, η HuR συμμετέχει στην κυτταρική αντίδραση στο στρες, συμπεριλαμβανομένου και του θερμικού στρες. Το αποτέλεσμα είναι η σταθεροποίηση των mRNAs και συσσώρευση της HuR, αλλά όχι της hnRNP A1, σε κυτταροπλασματικά σωματίδια του στρες (SGs: stress granules) (Gallouzi, et. al., 2000, Kedersha & Anderson, 2002). Στην παρούσα εργασία, η εφαρμογή θερμικού στρες σε καλλιέργειες κυττάρων A549 είχε ως συνέπεια την εμφάνιση σημαντικών αλλαγών σχετικά τόσο με την κυτταρική κατανομή όσο και τον τρόπο διασύνδεσης της HuR με πρωτεϊνικά συστατικά των hnRNP/mRNP, όπως περιγράψαμε αναλυτικά στα Αποτελέσματα (Εικόνα Γ.32, Γ.33). Η μεγαλύτερη αλλαγή εμφανίστηκε στην πυρηνική κατανομή της HuR με εμφανή αύξησή της στο κλάσμα S1 σε σχέση με το πυρηνικό κλάσμα (πάνω από 2 φορές). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παράλληλη μετατόπιση στην κατανομή της hnRNP C1/C2 (αλλά όχι της A1) και η διατήρηση ενός παρόμοιου κλάσματος της HuR (περίπου 11% της συνολικής HuR) το οποίο παρέμεινε σε διασύνδεση με την hnRNP

C1/C2 στα ανοσοσύμπλοκα τόσο των πυρηνικών εκχυλισμάτων όσο και του κλάσματος S1 του πυρηνικού σκελετού. Αντίθετα, τα σύμπλοκα hnRNP A1/HuR εμφάνισαν έναν διαφορετικό βαθμό σταθερότητας στο στρες ανάμεσα στα αντίστοιχα υπο-πυρηνικά κλάσματα, με σχετικά υψηλά ποσοστά (περίπου 30%) στο πυρηνικό κλάσμα και μείωση στο επίπεδο του 2% στο κλάσμα S1 (Εικόνα Γ.32, Γ.33). Πρόσφατη αναφορά περιγράφει την μετατόπιση της hnRNP C1/C2 από το πυρηνόπλασμα στον πυρηνικό σκελετό έπειτα από την χορήγηση σε κύτταρα HeLa 5-χλωροδεσοξουριδίνης, ουσία η οποία προκαλεί πρόωμη κυτταρική γήρανση (Michishita, et. al., 2002). Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προέκυψε μία σοβαρή ένδειξη για πιθανή ύπαρξη δύο υπο-πληθυσμών συμπλόκων hnRNP C/HuR, με τον πλέον σταθερό υποπληθυσμό να εμπλουτίζεται στο κλάσμα S1 του πυρηνικού σκελετού. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να υποδηλώνει μια μεγαλύτερη εμπλοκή της hnRNP C1/C2, συγκριτικά με την A1, σε αλλαγές της HuR σχετιζόμενες με το στρες στα πλαίσια του πυρήνα και ιδιαίτερα αναφορικά με τον πυρηνικό σκελετό, γεγονός που ενδέχεται να έχει βιολογική σημασία. Ως ένας πιθανός μηχανισμός προτείνεται ότι κατά την διάρκεια του κυτταρικού στρες η HuR λειτουργεί συνεργιστικά με την hnRNP C1/C2 στον πυρηνικό σκελετό για την προστασία ενός υποσυνόλου pre- και/ή mRNA μεταγράφων του πυρήνα, όπως φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση της κυτταροπλασματικής HuR, η οποία προσδέεται με mRNA-στόχους εντός των σωματιδίων SG υπό μορφή συμπλόκων mRNP (Gallouzi & Steitz, 2001, Kedersha & Anderson, 2002). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από πρόσφατη αναφορά η οποία δείχνει ευαισθητοποίηση κυττάρων HeLa σε διάφορα ερεθίσματα στρες έπειτα από μείωση της hnRNP C1/C2 μέσω siRNA (Hossain, et. al., 2007).

Η παρούσα μελέτη εμπλουτίστηκε και με τον ανοσοχημικό προσδιορισμό πρωτεϊνών hnRNP σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά διαμερίσματα κυττάρων MEF με ή χωρίς απαλοιφή της HuR. Τα πειράματα αυτά δεν έδειξαν αξιόλογες διαφοροποιήσεις τόσο στα επίπεδα όσο και στην υπο-κυτταρική κατανομή των hnRNP, με εξαίρεση την πρωτεΐνη hnRNP C1/C2, της οποίας τα επίπεδα παρουσίασαν σχετική αύξηση απουσία της HuR (Εικόνα Γ.34). Αυτή η παρατήρηση, μαζί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των διασυνδέσεων της HuR με hnRNPs, υποστηρίζουν ένα διαφαινόμενο ειδικό ρόλο της διασύνδεσης της C1/C2 με την HuR. Οι ενδείξεις αυτές ενισχύθηκαν και με την εφαρμογή πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα κατά της hnRNP A1 σε πυρηνικά εκχυλίσματα



κυττάρων MEF με ή χωρίς απαλοιφή της HuR, όπου και παρατηρήθηκε αύξηση της hnRNP1/C2 στο ανοσοίζημα της hnRNPA1 απουσία της πρωτεΐνης HuR (Εικόνα Γ.35).

Από τα παραπάνω ευρήματα ανοίγονται προοπτικές για την απομόνωση του υποσυνόλου του mRNA που βρίσκεται σε ειδική διασύνδεση με σύμπλοκα hnRNP και mRNP μέσω πειραμάτων “Ribonomics”. Στους άμεσους στόχους μας (πειράματα σε εξέλιξη) είναι η ταυτοποίηση mRNA στόχων στο ανοσοίζημα της hnRNP A1, σε κύτταρα MEF με και χωρίς απαλοιφή της HuR τα οποία θα βοηθήσουν να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της παρουσίας της HuR στα σύμπλοκα hnRNP και mRNP. Η παραπάνω πειραματική προσέγγιση περιλαμβάνει την εφαρμογή παράλληλων ανοσοκατακρημνίσεων με το αντίσωμα κατά της hnRNP A1, σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων MEF με και χωρίς απαλοιφή της HuR, την απομόνωση του υποσυνόλου των mRNAs στο ανοσοίζημα, την ακόλουθη ανάλυση των αποτελεσμάτων με μικροσυστοιχίες DNA (RIP-Chip assay) και τέλος την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με την εφαρμογή καταλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρέχει πρόσθετα στοιχεία για την ενεργή συμμετοχή της HuR σε διάφορα στάδια επεξεργασίας του mRNA στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Εκτός του προβλεπόμενου πυρηνικού της ρόλου στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος (Izquierdo, 2008), στην πολυαδενυλίωση (Zhu, et. al., 2007) και στην μεταφορά mRNAs στο κυτταρόπλασμα (Brennan, et. al., 2000), η HuR μπορεί να δημιουργήσει εκτενείς αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες hnRNP συστατικά των πυρηνικών συμπλόκων hnRNP/mRNP. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πιθανόν να είναι σημαντικές για να διατηρηθεί η ακρίβεια και η αποδοτικότητα που χρειάζεται για τις διεργασίες ωρίμανσης του mRNA κάτω από διαφορετικές συνθήκες κυτταρικής ανάπτυξης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κύριος στόχος της παρούσας Διατριβής ήταν η διερεύνηση της εμπλοκής πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης RNA (**πρωτεΐνες RBP**) στην επαγωγή και εξέλιξη καρκίνου του πνεύμονα σε κυτταρικά και ζωικά πειραματικά πρότυπα. Η μελέτη εστίασε στον ειδικό ρόλο πρωτεϊνών της οικογένειας των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP), κατά κύριο λόγο στις hnRNP τύπου A/B (hnRNP A1, A2/B1 και A3), γνωστά σταθερά συστατικά συμπλόκων hnRNP και mRNP και με συμμετοχή σε όλα σχεδόν τα στάδια βιογένεσης του mRNA. Παράλληλα μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης άλλων πρωτεϊνών RBP, με έμφαση στην πρωτεΐνη HuR με πλέον γνωστό ρόλο την σταθεροποίηση/μετάφραση mRNA-στόχων.

Με δεδομένη την βιολογική σημασία της διαφαινόμενης συμμετοχής πρωτεϊνών hnRNP (κατεξοχήν της A2/B1) και της HuR στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, εφαρμόστηκαν πειραματικά μοντέλα επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα στον ποντικό. Συνολικά, έγινε εφικτή η εξέταση τριών διαφορετικών στελεχών ποντικού και δύο σχημάτων χημικής επαγωγής καρκίνου του πνεύμονα [(ουρεθάνη, και συνδυασμός αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων (PAH))]. Έγινε ανοσοχημικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών hnRNP και HuR σε ολικά εκχυλίσματα του πνεύμονα, καθώς και παράλληλη ιστολογική/ανοσοιστοχημική ανάλυση. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των τριών πειραματικών μοντέλων έδειξαν απουσία σημαντικής αύξησης έως και μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών στον καρκινικό έναντι του φυσιολογικού πνευμονικού ιστού. Τα ευρήματα είναι σε γενική συμφωνία με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα από τους Peebles KA et al (2007) αναφορικά με τις αλλαγές των επιπέδων της hnRNPA2/B1. Επισημαίνεται ότι τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των πειραματικών ζωικών μοντέλων είναι σε προφανή αντιδιαστολή με αυτά που αφορούν τις ανθρώπινες βιοψίες καρκίνου του πνεύμονα, όπου διαπιστώνεται η σε υψηλά ποσοστά υπερέκφραση των hnRNP A/B και HuR σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Κατά συνέπεια, σημειώνεται η ανάγκη να ληφθούν υπόψη στην επέκταση και εφαρμογή των ζωικών μοντέλων στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα.

Με βάση γνωστά κοινά βιοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών hnRNPA/B και HuR, προχωρήσαμε στη ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των

μεταξύ τους διασυνδέσεων με την εφαρμογή πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κλάσματα κυττάρων A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα ανθρώπου). Διαπιστώθηκε η ευρεία συμμετοχή της HuR σε σύμπλοκα hnRNP και mRNP. Ειδικότερα, χαρακτηρίστηκαν πυρηνικές διασυνδέσεις της HuR με τις hnRNP A1 και C1/C2, καθώς και κυτταροπλασματική διασύνδεση με την hnRNP A1, οι οποίες είναι τύπου πρωτεΐνης/RNA. Επιπλέον, διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση πρωτεΐνης/πρωτεΐνης της HuR με το καρβοξυτελικό άκρο της hnRNP A3, *in vitro*. Η επίδραση θερμικού στρες σε κύτταρα A549 είχε σαν αποτέλεσμα αλλαγή στην πυρηνική κατανομή της HuR και στην διασύνδεσή της με τα σύμπλοκα hnRNP. Τα αποτελέσματα αυτά ανοίγουν τον δρόμο για την ταυτοποίηση του mRNA στο ανοσοσύμπλοκο hnRNP A1:HuR, σε κύτταρα με ή χωρίς απαλοιφή της HuR, προκειμένου να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της παρουσίας της HuR στα σύμπλοκα hnRNP και mRNP.

## SUMMARY

The present dissertation refers to the involvement of RNA binding proteins (**RBP**s) in the induction and establishment of lung cancer in cellular and animal experimental models. The study has focused on the specific role of the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins family (hnRNP), with major emphasis in hnRNPs A/B type (hnRNP A1, A2/B1, A3), stable components of hnRNP and mRNP complexes. which participate in almost all cellular processes related to the biogenesis of mRNA. In parallel, the expression pattern of other RBP proteins was studied, with emphasis in HuR protein that has a major role in the stability/translation of mRNA targets.

Since the biological significance of the involvement of hnRNP (mainly A2/B1) and HuR proteins in the human lung cancer is almost established, we studied experimental mouse models of chemically induced lung cancer. Overall, three different mouse strains and two schemes of chemical lung cancer induction [urethane and aromatic polycyclic hydrocarbons (PAH)] were applied. Immunochemical detection of the expression levels of RBP proteins was performed in total extracts prepared from lung tissue as well as histological/immunohistochemical analysis. The results from the three experimental mouse models are compatible with the absence of a detectable increase in the levels of the proteins tested in lung cancer tissue compared to normal tissue samples. These findings in principle agree with current data reported by Peebles KA et al (2007), showing changes in the levels of hnRNP A2/B1. Therefore, the results obtained from the application of experimental mouse models are in obvious disagreement with those from human lung cancer biopsies, where overexpression of hnRNP A/B and HuR occurs in high proportion as compared to the adjacent normal tissue. Therefore, it is recommended that these results should be taken into consideration before applying outcome animal models in the human lung cancer.

Based on the common characteristics that hnRNP A/B and HuR proteins share, we proceeded in the identification and characterization of putative interactions between these proteins by performing a series of immunoprecipitation assays in nuclear and cytoplasmic fractions derived from A549 cells (human lung adenocarcinoma). We succeeded in identifying a broad spectrum of HuR interactions within hnRNP and mRNP complexes. More specifically, nuclear interactions of hnRNP A1:HuR and hnRNP C1/C2:HuR , as well as cytoplasmic hnRNPA1:HuR interactions were characterized. These associations refer to protein/RNA interactions. In addition, the

ability of HuR to make protein/protein interactions with the C-terminus of hnRNP A3, was characterized *in vitro*. Heat shock treatment of A549 cells modified the nuclear distribution of HuR and affected the interaction of HuR with hnRNP complexes. These findings may lead to the identification of the mRNA in the hnRNP A1:HuR immunocomplex, in cells with or without HuR knockout, in order to investigate the biological significance of the presence of HuR in hnRNP and mRNP complexes.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Aziz, H.O., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Nomoto, K., Murai, Y., Tsuneyama, K. and Takano, Y. (2007). High-density oligonucleotide microarrays and functional network analysis reveal extended lung carcinogenesis pathway maps and multiple interacting genes in NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyle)-1-butanone] induced CD1 mouse lung tumor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133, 107-115
- Akhtar, A., Faye, G. & Bentley, D.L. (1996). Distinct activated and non-activated RNA polymerase II complexes in yeast. *EMBO J.* 15, 4654-4664
- Akindahunsi, A.A., Bandiera, A., and Manzini, G. (2005). Vertebrate 2xRBD hnRNP proteins: a comparative analysis of genome, mRNA and protein sequences. *Comput. Biol. Chem.* 29, 13-23
- Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Caceres, J.F. and Krainer, A.R. (2005). Regulation of heterogeneous ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3605-3610
- Avanzo, J.L., Mesnil, M., Hernandez-Blazquez, F.J., Cristina da Silva, T., Fukumasu, H., Cabrera-Mori, C.M., Yamasaki, H. and Zaidan-Dagli, M.L. (2006). Altered expression of connexins in urethane-induced mouse lung adenomas. *Life Sci.* 79, 2202-2208
- Bagga, P.S., Arhin, G.K., and Wilusz, J. (1998). DSEF-1 is a member of the hnRNPH family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 26, 5343-5350
- Bauer, A.K., Malkinson, A.M. and Kleeberger, S.R. (2004). Susceptibility to neoplastic and non-neoplastic pulmonary diseases in mice: Genetic similarities. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287, L685-703
- Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 11, 347-351
- Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W. and LeStourgeon, W.M. (1977). Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* 11, 127-138
- Biamonti, G. and Riva, S. (1994). New insights into the auxiliary domain of eukaryotic RNA binding proteins. *FEBS Lett.* 340, 1-8

- Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Crazzolaro, C. and Keller, W. (1991). Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3' processing of messenger RNA precursors. *J. Biol. Chem.* 266, 19768-19776
- Birse, C.E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B.A., Keller, W. and Proudfoot, N.J. (1998). Cleavage of the primary transcript couples 3'- end RNA processing with termination of pol II transcription. *Science* 280, 298-301
- Black, D.L.(2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 72, 291-336
- Blaustein, M., Pelisch, F. and Srebrow, A. (2007). Signals, pathways and splicing regulation. *IJBCB*, 39, 2031-2048
- Blaxall, B.C., Dwyer-Nield, L.D., Bauer, A.K., Bohlmeier, T.J., Malkinson, A.M. and Port J.D. (2000). Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Mol. Carcinog.* 28, 76-83
- Blaxall, B.C., Pellett, A.C., Wu, S.C., Pende, A. and Port, J.D. (2000). Purification and characterization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 4290-4297
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72,248-54
- Brennan, C.M. and Steinz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 266-277
- Brennan, C.M., Gallouzi, I-E. and Steitz, J.A. (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J. Cell Biol.* 151, 1-13
- Brewer, G. (1991). An A+U- rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol. Cell Biol.* 11, 2460-2466
- Brinkman, B.M. (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.* 37, 584-594
- Buratti, E. and Baralle, F.E. (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol. Cell Biol.* 24, 10505-10514
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994). Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins. *Science.* 265, 615-21

- Caceres, J.F., Stamm S., Helfman D.M., Krainer A.R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265, 1706-1709
- Carpenter, B., MacKay, C., Alnabulsi, A., MacKay, M., Telfer, C., Melvin, W.T. and Murray, G.I. (2005). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765, 85-100
- Castelo-Branco, P., Furger, A., Wollerton, M., Smith, C., Moreira, A., and Proudfoot, N. (2004). Polypyrimidine Tract binding Protein Modulates Efficiency of Polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 24, 4174-4183
- Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 465-470
- Chen, Y-I. G., Moore, R.E., Ge, H.Y., Young, M.K., Lee, T.D. and Stevens, S.W. (2007). Proteomic analysis of in vivo-associated pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Research* 35, 3928-3944
- Cok, S.J., Acton, S.J. and Morrison, A.R. (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J. Biol. Chem.* 278, 36157-36162
- Cok, S.J., Acton, S.J., Sexton, A.E. and Morrison, A.R. (2004). Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3'-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. *J. Biol. Chem.* 279, 8196-8205
- Colgan, D.F. and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Dev.* 11, 2755-2766
- Cooper, D.L. and Dougherty, G.L. (1995). To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat. Med.* 1, 635-637
- Cusack, S. (1999). RNA-protein complexes. *Curr.Opin.Struct. Biol.* 9, 66-73
- Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II, *J.Biol.Chem.* 271, 19009-19012 (1996)
- Dalman, J., Furneaux, H.M., Grall, R.J., Kris, M.G. and Posner, J.B. (1990). Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer-a quantitative western blot analysis. *Ann. Neurol.* 27, 544-52



- David, P.S., Tanveer, R. And Port, D.J. (2007). FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *RNA* 13, 1453-1468
- Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H.H., Madsen, P., Kruse, T.A., Gesser, B., Nielsen, H. and Celis, J.E. (1994). Identification, molecular cloning expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *J. Mol. Biol.* 236, 33-48
- DeMaria C.T and Brewer G. (1996). AUF1 binding affinity to A+U rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem.* 271, 12179-12184
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Long, L., Wagner, B.J., and Brewer, G. (1997). Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements *J. Biol. Chem.* 272, 27635-27643
- Denkert, C., Weichert, W., Pest, S., Koch, I., Licht, D., Kobel, M., Reles, A., Sehouli, J., Dietel, M. and Hauptmann, S. (2004). Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer res.* 64, 189-95
- Denkert, C., Weichert, W., Winzer, K.J., Muller, B.M., Noske, A., Niesporek, S., Kristiansen, G., Guski, H., Dietel, M. and Hauptmann, S. (2004). Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 64, 5580-6
- Dixon, D.A., Balch, G.C., Kedersha, N., Anderson, P., Zimmerman, G.A., Beauchamp, R.D. and Prescott, S.M. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *Exp. Med.* 198, 475-481
- Doll, S.R. (2000). Smoking and lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 4-6
- Dreyfuss, G., Choi, Y.D and Adam, S.A. (1984). Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* 4, 1104-1114
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Mol. Cell. Biol.* 3, 195-205
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma S. and Burd, C.G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 289-321

- Dreyfuss, G., Swanson, M.S., Pinol-Roma, S. (1988). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation Trends Biochem.Sci. 13, 86-91
- Duan, J., Zhang, Z. and Tong, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. Int. J. Bioch. Cell Biol. 37, 1407-1420
- Esnault, S. and Malter, J.S. (2003). Hyaluronic acid or TNF-alpha plus fibronectin triggers granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA stabilization in eosinophils yet engages differential intracellular pathways and mRNA binding proteins. J. Immunol. 171, 6780-6787
- Evans, J.R., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D. and Willis, A.E. (2003). 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 22, 8012-8020
- Fackelmayer, F.O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A. (1994). Nucleic-acid binding properties of hnRNPU/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. Eur. J. Biochem. 221, 749-757
- Fan, X.C, and Steitz J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. EMBO J. 17, 3448-3460
- Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H. and Schwartz, S. (2009). Increased expression of cellular RNA-binding proteins in HPV-induced neoplasia and cervical cancer. J. of Medical Virol. 81, 897-907
- Ford, L.P., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. Oncogene 21, 580-583
- Forne, T., Rosse, F., Labourier, E., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. and Tazi, J. (1995.) Disruption of base-paired U4-U6 small nuclear RNAs induced by mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. J. Biol. Chem. 270, 16476-16481
- Fritz, A., Parisot, R., Newmeyer, D. and DeRobertis, E. (1984). Small nuclear U-ribonucleoproteins in *Xenopus laevis* development. J. Mol. Biol. 178, 273-285

- Furuichi, Y., LaFiandra, A. and Shatkin, A.J. (1977). 5'-terminal structure and mRNA stability, *Nature* 266, 235-239
- Galiana-Arnoux, D., Lejeune, F., Gesnel, M.C., Stevenin, J., Breathnach, R. and Del Gatto-Konczak, F. (2003). The CD44 alternative V9 exon contains a splicing enhancer responsive to the SR proteins 9G8, ASF/SF2, and SRp20. *J. Biol. Chem.* 278, 32943-32953
- Gallouzi, I-E. and Steitz, J.A. (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* 294, 1895-1901
- Gallouzi, I-E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N. And Steitz, J.A. (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3073-3078
- Gallouzi, I-E., Brennan, C.M. and Steitz, J.A. (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* 7, 1348-1361
- Garneau, D., Revil, T., Fisette, J.F. and Chabot, B. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* 280, 22641-22650
- Ge, H., Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell.* 62, 25-34
- Godin, K.S. And Varani, G. (2007). How arginine-rich domains coordinate mRNA maturation events. *RNA Biol.* 4, 69-75
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Biol.* 15, 607-660
- Gozani, O., Patton, J.G. and Reed, R. (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.* 13, 3356-67
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211
- Guialis, A., Moraitou, M., Patrino-Georgoula, M. and Dangli, A. (1991). A novel 40S multi-snRNP complex isolated from rat liver nuclei. *Nucl. Acids Res.* 19, 287-296
- Gunderson, S.I., Vagner, S., Polycarpou-Schwarz, M. and Mattaj, I. (1997). Involvement of the carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase in U1A

autoregulation and in the coupling of splicing and polyadenylation. *Genes & Dev.* 11, 761-773

- Hamilton, B.J., Nagy, E., Malter, J.S., Arrick, B.A. and Rigby, W.F.C. (1993). Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *J. Biol. Chem.* 268, 8881-8887
- Hanahan, D. and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hay, D.C., Kemp, G.D., Dargemont, C. and Hay, R.T. (2001). Interaction between hnRNPA1 and IkappaBalph is required for maximal activation of NF-kapp 3-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* 10, 3482-3490
- He, D.C., Martin, T., and Penman, S. (1991). Localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in the interphase nuclear matrix core filaments and on perichromosomal filaments at mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7469-7473
- He, Y., Brown, M.A., Rothnagel, J.A., Saunders, N.A. and Smith, R. (2005). Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J. of Cell Sci.* 118, 3173-3183
- He, Y., Rothnagel, J.A., Epis, M.R., Leedman, P.J. and Smith, R. (2009). Downstream targets of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 mediate cell proliferation. *Mol. Carcinog.* 48, 167-79
- Hecht, S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1194-210
- Hilbe, W., Dirnhofer, S., Greil, R. and Wöll, E. (2004). Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention. *European J. of Cancer Prevention* 13, 425-436
- Hinman, M.N. and Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3168-3181
- Hiraki, A., Murakami, T., Aoe, K., et. al. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 expression in malignant mesothelioma. *Cancer Sci.* 97, 1175-1181
- Hodges, D. and Bernstein, S.I. (1994). Genetic and biochemical analysis of alternatine RNA splicing. *Adv. Genet.* 31, 207-281
- Holcik, M., Gordon, B.W. and Korneluk, R.G. (2003). The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol. Cell Biol.* 23, 280-288

- Horio, Y., Chen, A., Rice, P., Roth, J.A., Malkinson, A.M. and Schrump. (1996). Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol. Carcinog.* 17, 217-223
- Hossain, M.N., Fuji, M., Miki, K., Endoh, M. and Ayusawa, D. (2007). Downregulation of hnRNP C1/C2 by siRNA sensitizes HeLa cells to various stresses. *Mol. Cell Biochem.* 296, 151-157
- Hovhannisyan R.H. and Carstens, R.P. (2007). Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J. Biol. Chem.* 282, 36265-74
- Huang, P-R., Tsai, S-T., Hsieh, K-H. and Wang, T-C.V. (2008). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 binds single-stranded telomeric DNA and inhibits telomerase extension in vitro. *Bioch. Et Biophys. Acta* 1783, 193-202
- Huang, Y., Carmichael, G.G. (1996). Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell Biol.* 16, 1534-1542
- Hui, J., Stangl, K., Lane, W.S. and Bindereif, A. (2003). hnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Natl. Struct. Biol.* 10, 33-37
- Hung, L.H., Heiner, M., Hui, J., Schreiner, S., Benes, V. and Bindereif, A. (2008). Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA* 14, 284-296
- Idriss, H., Kumar, A., Casas-Finet, JR., Guo, H., Damuni, Z. and Wilson, S.H. (1994). Regulation of in vitro nucleic acid strand annealing activity of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by reversible phosphorylation. *Biochemistry* 33, 11382-90
- Ihde, D.C. (1992). Chemotherapy of lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 327, 1434-1441
- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi C., Jarmolowski, A., McGuigan, C. and Mattaj I. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 376, 709-712
- Izaurrealde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, m., Darzynkiewicz, E. and Mattaj, I. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78, 657-668

- Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D. and Valcarcel, J. (2005). Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol. Cell* 19, 475-484
- Izquierdo, J.M. (2008). Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *JBC* 283, 19077-19084
- Janssen, K-P., Abala, M., Marjou, F.E., Louvard, D. And Robine, S. (2005). Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Bioch. Et Bioph. Acta* 1756, 145-154
- Jarmolowski, A., Boelens, W.C., Izaurrealde, E. and Mattaj, I. (1994). Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* 124, 627-635
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *Ca. Cancer J. Clin.* 56, 106-130
- Jiang, Z.H and Wu, J.Y. (1999). Alternative splicing and programmed cell death. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220, 64-72
- Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R. and Shoemaker, D.D. (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302, 2141-4
- Kamma, H., Horiguchi, H., Wan, L., Matsui, M., Fujiwara, M., Fugimoto, M., Yazawa, T. and Dreyfuss, G. (1999). Molecular characterization of the hnRNP A2/B1 proteins: tissue-specific expression and novel isoforms. *Exp. Cell. Res.* 246, 399-411
- Kandasamy, K. and Kraft, A.S. (2008). Proteasome inhibitor PS-341 (VELCADE) induces stabilization of the TRAIL receptor DR5 mRNA through the 3'-untranslated region. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1091-1100
- Kasashima, K., Sakashita, E., Saito, K. and Sakamoto, H. (2002). Complex formation of the neuron-specific ELAV-like Hu RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 30, 4519-4526
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M. (2006). Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol. Cell Biol.* 26, 3295-3307

- Kedersha, N. and Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 963-969
- Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E. and Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268
- Keene, J.D. (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5-7
- Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115, 6, 1617-1624
- Kessler, S.W. (1981). Use of protein-A-bearing staphylococci for the immune precipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* 73, 442-59
- Kiledjian, M., Burd, C.G., Portman, D.S. and Dreyfuss, G. (1994) in: RNA-protein interactions: *Frontiers in Molecular Biology*, pp. 127-149 (Nagai, K. and Mattaj, I. W., Eds.) IRL Press, Oxford
- Kiledjian, M., DeMaria, C.T., Brewer, G. and Novick, K. (1997). Identification of AUF1 (heterogeneous ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol. Cell Biol.* 17, 4870-4876
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M. and Jang, S.K. (2000). Protein-Protein Interaction Among hnRNPs Shuttling Between Nucleus and Cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 298, 395-405
- Kim, J.H., Paek, K.Y., Choi, K., Kim, T.D., Hahm, B., Kim, K.T. and Jang, S.K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 23, 708-720
- Kim, S.H. and Lee, C.S. (1996). Induction of benign and malignant pulmonary tumors in mice with benzo(a)pyrene. *Anticancer Research* 16, 465-70
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M.A., et al. (1994). Protein-protein interactions and 5' splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368, 119-124
- Krainer, A.R., Conway, G.C. and Kozak, D. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes and Development* 4, 1158-1171

- Kramer, A. (1995). The Biochemistry of pre-mRNA splicing. In Pre-mRNA processing. Ed. A.I. Lamond, R.G. Landes Co.
- Krenic, A.M. & Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 363-371
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B. and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5' UTR. *Genes Dev.* 16, 3087-3099
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M.R., Wellinger, R.J. and Chabot, B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat. Genet.* 19, 199-202
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-683
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein-HuR effected through prothymosin alpha. *Embo J.* 24, 1852-1862
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L. and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.* 23, 3092-3102
- Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J. and Gatto-Konczak, F. (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646
- Lee, M.S., Henry, M., Silver, P.A. (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes and Dev.* 10, 1233-1246
- LeStourgeon, W.M., Lothstein, L., Walker, B.W. and Beyer, A.L. (1981). The composition and general topology of RNA and protein in monomer 40S ribonucleoprotein particles. *The Cell Nucleus, Nuclear particles, Part B*, (ed. H. Busch) Acad. Press, vol. IX pp 49-87
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H. and Levy, A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* 273, 6417-23



- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743-55
- Lewis, J., Gunderson, S.I. and Mattaj, I. (1995). The influence of 3' and 5' end structures on pre-mRNA metabolism. *J. Cell Sci.* 19, 13-19
- Lewis, J., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C. and Mattaj, I. (1996). A nuclear cap-binding protein complex facilitates association of U1 snRNP with the cap proximal 5' splice site. *Genes & Dev.* 10, 1683-1698
- Li, T., Evdokimov, E., Shen, R.F., Chao, C.C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E.R., Yang, D.C. and Chock, P.B. (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8551-6
- Lin, C-H., Patton, J.G. (1995). Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *RNA* 1, 234-245
- Loflin, P., Chen, C.Y. and Shyu, A-B. (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 13, 1884-1897
- Lopez de Silanes, I., Fan, J., Yang, X., Potapova, O., Zonderman, A.B., Pizer, E.S. and Gorospe, M. (2003). Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22, 7146-54
- Lopez de Silanes, I., Lal, A. and Gorospe, M. (2005). HuR: posttranscriptional paths to malignancy. *RNA Biol.* 2, 11-13
- Lothstein, L., Arenstorf, H.P., Chung, S.Y., Walker, B.W., Wooley, J.C., and LeStourgeon, W.M. (1985). General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles. *J. Cell Biol.* 100, 1570-1581
- Lukas, J., Gao, D.Q. Keshmeshian, M., Wen, W.H., Tsao-Wei, D., Rosenberg, S. and Press, M.F. (2001). Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 61, 3212-3219
- Ma, A.S., Moran-Jones, K., Shan, J., Munro, T.P., Snee, M.J., Hoek, K.S. and Smith, R. (2002). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277, 18010-18020
- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A. and Furneaux, H. (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem.* 271, 8144-8151

- Ma, W.J., Chung, S. and Furneaux, H. (1997). The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucl. Acids Res.* 25, 3564-3569
- Malkinson, A.M. (1992). Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Research* 52, 2670s-6s
- Malkinson, A.M., Koski, K.M., Evans, W.A. and Festing, M.F. (1997). Butylated hydroxytoluene exposure is necessary to induce lung tumors in BALB mice treated with 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 2832-2834
- Manenti, G., Galbiati, F., Noci, S. and Dragani, T.A. (2003). Outbred CD-1 mice carry the susceptibility allele at the pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus. *Carcinogenesis* 24, 1143-1148
- Manley, J.L. and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* 10, 1569-1579
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J.F., Revil, T. and Chabot, B. (2007). hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 623, 123-47
- Matlin, A.J., Clark, F. and Smith, C.W. (2005). Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 386-398
- Matsuyama, S., Goto, Y., Sueoka, N., Ohkura, Y., Tanaka, Y., Nakachi, K. and Sueoka, E. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 expressed in esophageal squamous cell carcinomas as a new biomarker for diagnosis. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 658-663
- Matzner, N., Marx, M., Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. and Konig, H. (2000). Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 35353-35360
- Mayeda, A. and Krainer, A.R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365-375
- Mayeda, A., Munroe, S.H., Caceres, J.F., and Krainer, A.R. (1994) Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *EMBO J.* 13, 5483-5495
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D. and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8354-8359

- Mazan-Mamczarz, K., Hagner, P.R., Corl, S., Srikantan, S., Wood, W.H., Becker, K.G., Gorospe, M., Keene, J.D., Levenson, A.S. and Gartenhaus, R.B. (2008). Post-transcriptional gene regulation by HuR promotes a more tumorigenic phenotype. *Oncogene* 27, 6151-63
- Mazroui, R., Di Marco, S., Clair, E., von Loretz, C., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Saleh, M. and Gallouzi, I.E. (2008). Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J. Cell Biol.* 180, 113-127
- Mc Cracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G.H., Greenblatt, J., et al., (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples messenger RNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361
- Meuwissen, R. and Berns, A. (2005). Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* 19, 643-664
- Meuwissen, R., Linn, S.C., Linnoila, R.I., Zevenhoven, J., Mooi, W.J. and Berns, A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* 4, 181-189
- Meyne, J., Ratliff, R.L. and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7049-7053
- Michishita, E., Kurahashi, T., Suzuki, T., Fukuda, M., Fujii, M., Hirano, H. and Ayusawa, D. (2002). Changes in nuclear matrix proteins during the senescence-like phenomenon induced by 5-chlorodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp. Gerontol.* 37, 885-890
- Mili, S., Shu, H.J., Zhao, Y. and Pinol-Roma, S. (2001). Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21, 7307-7319
- Minvielle-Sebastia, L. and Keller, W. (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 352-357
- Minvielle-Sebastia, L., Beyer, K., Krenic, A.M., Hector, R.E., Swanson, M.S. and Keller, W. (1998). Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by yeast hnRNP. *EMBO J.* 17, 7454-7468

- Montuenga, L.M., Zhou, J., Avis, I., Vos, M., Martinez, A., Cuttitta, F., Treston, A.M., Sunday, M. and Mulshine, J.L. (1998). Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 changes with critical stages of mammalian lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 554-562
- Moran-Jones, K., Wayman, L., Kennedy, D.D., Reddel, R.R., Sara, S., Snee, M.J. and Smith, R. (2005). hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere. *Nucl. Acids Res.* 33, 486-496
- Mountain, C.F. (2002). Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin. Chest Med.* 23, 103-121
- Myer, V.E., and Steitz, J.A. (1995) Isolation and characterization of a novel, low abundance hnRNP protein: A0. *RNA* 1, 171-182
- Myer, V.E., Fan, X. C. and Steitz, J.A. (1997). Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 16, 2130-2139
- Nagai, K. (1996). RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 53-61
- Nettleship, A., Henshaw, P. and Meyer, H. (1943). Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane), *J. Natl Cancer Inst.* 309-319
- Nilsen, T.W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 25, 1147-1149
- Nyberg, P., Xie, L. and Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 3967-3979
- O' Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021
- O' Farrell, P.Z., Goodman, H.M. and O' Farrell, P.H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-1142
- O'Donnell, E.P., Zerbe, L.K., Dwyer-Nield, L.D., Kisley, L.R. and Malkinson, A.M. (2005). Quantitative analysis of early chemically-induced pulmonary lesions in mice of varying susceptibilities to lung tumorigenesis. *Cancer Letters* 1-6
- Padgett R.A, Konarska M.M, Grabowski P.J et al. (1984). Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors *Science* 225, 898-903
- Party, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R. and Chabot, B. (2003). 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.* 63, 7679-7688

- Party, C., Lemieux, B., Wellinger, R.J. and Chabot, B. (2004). Targeting heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1 and A2 proteins by RNA interference promotes cell death in transformed but not in normal mouse cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1193-1199
- Patel, J.D., Bach, P.B. and Kris, M.G. (2004). Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *JAWA.* 291, 1763-1768
- Peebles K.A., Dwyer-Nield, L.D. and Malkinson, A.M. (2007). Altered expression of splicing factor, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, in mouse lung neoplasia. *Mol. Carcinog.* 46, 887-900
- Perrotti, D. and Neviani, P. (2007). From mRNA metabolism to cancer therapy: Chronic myelogenous leukaemia shows the way. *Clin. Cancer Res.* 13, 1638-1642
- Petterson, I., Hitterberger, M., Mimori, T., Gottlieb, E. and Steitz, J. (1984). The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1) ribonucleoprotein and anti-Sm antibodies. *J. Biol. Chem.* 259, 5907-5914
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A.R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Krusys, V., Streuli, M. and Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- $\alpha$ . *EMBO J.* 19, 4154-4163
- Pino, I., Pio, R., Toledo, G., Zabalequi, N., Vicent, S., Rey, N., Lozano, M.D., Torre, W., Garcia-Foncillas, J. and Montuenga, L.M. (2003). Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* 41, 131-143
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1993). Cell-cycle regulated phosphorylation of the pre-mRNA-binding (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) C proteins. *Mol. Cell Biol.* 13, 5762-5770
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-732
- Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J. and Dreyfuss, G. (1998). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes & Dev.* 2, 215-227

- Pinol-Roma, S., Swanson, M.S., Matunis, M.J. and Dreyfuss, G. Purification and characterization of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes by affinity chromatography. *Methods in Enzymology, RNA processing* (1990), vol. 151, part B (ed. J.E. Dahlberg and J.N. Abelson), Acad. Press
- Plomaritoglou, A., Choli-Papadopoulou, T. and Guialis, A. (2000). Molecular characterization of a murine, major A/B type hnRNP protein:mBx. *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 54-62
- Pype, S., Slegers, H., Moens, L., Merlevede, W. and Goris, J. (1994) Tyrosine phosphorylation of a M(r) 38,000 A/B type hnRNP protein selectively modulates its RNA binding. *J. Biol. Chem.* 269, 31457-31465
- Rasmussen, E. and Lis, L. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7923-7927
- Rhoads, R.E. (1985). The cap structure of eukaryotic messenger RNA and its interaction with cap-binding protein. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 9, 104
- Rosonina E., Kaneko S., Manley J.L (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-1056
- Rothrock, C. R., House, A. E. and Lynch, K. W. (2005). HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *EMBO J.* 24, 2792-2802
- Rousseau, S., Morrice, N., Peggie, M., Campbell, D.G., Gaestel, M. and Cohen, P. (2002). Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J.* 21, 6505-6514
- Roychoudhury, P., Paul, R.R., Chowdhury, R. and Chaudhuri., K. (2007). HnRNP E2 is downregulated in human oral cancer cells and the overexpression of hnRNP E2 induces apoptosis. *Mol. Carcin.* 46, 198-207
- Ryan, K., Calvo, O. and Manley, J.L. (2004). Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA* 10, 565-573
- Salditt-Georgieff, M., Harpold, M., Chen-Kiang, S. and Darnell, JE..Jr (1980). The addition of 5'cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped. *Cell* 19, 69-78
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning. A practical approach". Cold Spring Harbor Laboratory press
- Sharp, P.A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* 77, 805-815

- Sheflin, L.G., Zou, A.P. and Spaulding, S.W. (2004). Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 644-51
- Shetty, S. (2005). Regulation of urokinase receptor mRNA stability by hnRNP C in lung epithelial cells. *Mol. and Cell. Biochem.* 272, 107-118
- Shih, S.C. and Claffey, K.P. (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J. Biol. Chem.* 274, 1359-1365
- Shim, J. and Karin, M. (2002). The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. *Mol. Cells* 14, 323-331
- Shin, K.H., Kang, M.K., Kim, R.H., Christensen, R. and Park, N.H. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 12, 3222-3228
- Smith, R. (2004). Moving molecules: mRNA trafficking in mammalian oligodendrocytes and neurons. *Neuroscientist* 10, 495-500
- Sommer P, Nehrbass U (2005). Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr Opin Cell Biol* 17, 294-301
- Spellman, R., Rideau, A., Matlin, A., Gooding, C., Robinson, F., McGlincy, N., Grellscheid, S.N., Southby, J., Wollerton, M. and Smith, C.W. (2005). Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 457-460
- Srebrow, A. and Kornblihtt, A.R. (2006). The connection between splicing and cancer. *J. of Cell Sci.* 119, 2635-2641
- Stephens R.M, Schneider T.D. (1992). Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites. *J Mol Biol.* 228, 1124-1136
- Sueoka, E., Sueoka, N., Goto, H., Matsuyama, S., Nishimura, H., Sato, M., Fujimura, S., Chiba, H. and Fujiki, H. (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as early cancer biomarker for occult cancer of human lungs and bronchial dysplasia. *Cancer Res.* 61, 1896-1902
- Sung, H.J. and Cho, J.Y. (2008). Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Reports.* 615-625

- Szabo A., Dalmau J., Manley G., Rosenfeld M., Wong E., Henson J., Posner J.B., Furneaux H.M. (1991). HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67, 325-333
- Tanaka, E., Fukuda, H., Nakashima, K., Tsuchiya, N., Seimiya, H. and Nakagama, H. (2007). HnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro. *Bioch. And Biophys. Res. Commun.* 358, 608-614
- Tang, F.M., Li, W.M., Chen, Y., Wang, D.M. and Han, J. (2008). Expression of hnRNP K in lung adenocarcinoma cells. *J. of Sichuan University. Medical science edition* 39, 823-6
- Thiede, B., Siejak, F., Dimmler, C., and Rudel, T. (2002). Prediction of translocation and cleavage of heterogeneous ribonuclear proteins and Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 during apoptosis by subcellular proteome analysis. *Proteomics* 2, 996-1006
- Thiele, B.J., Doller, A., Kähne, T., Pregla, R., Hetzer, R. and Regitz-Zagrosek, V. (2004). RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ. Res.* 95, 1058-66
- Titis, A.P and Forkert, P-G. (2001). Strain-related differences in bioactivation of vinyl carbamate and formation of DNA adducts in lungs of A/J, CD-1, and C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 59, 82-91
- Tockman, M.S.Gupta, P.K., Myers, J.D., Frost, J.K., Baylin, S.B., Gold, E.B., Chase, A.M., Wilkinson, P.H. and Mulshine, J.L. (1988). 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.* 6, 1685-93
- Tong, A., Nguyen, J. and Lynch, K. W. (2005). Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J. Biol. Chem.* 280, 38297-38304
- Tran, H., Maurer, F. and Nagamine, Y. (2003). Stabilization of urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol. Cell Biol.* 23, 7177-7188
- Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clin. Chest. Med.* 23, 65-81



- Tuveson, D.A. and Jacks, T. (1999). Modeling human lung cancer in mice: similarities and shortcomings. *Oncogene* 18, 5318-24
- Ushigome, M., Ubagai, T., Fukuda, H., Tsuchiva, N., Sugimura, T., Takatsuka, J. and Nakagama, H. (2005). Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int. J. Oncol.* 26, 635-640
- Van Eekelen, C.A., and Van Venrooij, W.J. (1981). hnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. *J. Cell Biol.* 88, 554-563
- Vassileva, M.T. and Matunis, M.J. (2004). SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3623-3632
- Venables, J.P., Koh, C-S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., Bramard, A., Paquet, E.R., Watier, V., Durand, M., Lucier, J-F., Gervais-Bird, J., Tremblay, K., Prinos, P., Klinck, R., Elela, S.A and Chabot, B. (2008). Multiple and Specific mRNA Processing Targets for the Major Human hnRNP Proteins. *Mol. And Cell. Biol.* Volume 28, 6033-6043
- Veraldi, K.L., Arhin, G.K., Mardncic, K., Chung-Ganster, L.H., Wilusz, J., and Milcarek, C. (2001). HnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to pre-mRNA precursors in mouse B cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 1228-1238
- Visa, N., Alzhanova-Ericsson, A.T., Sun, X., Kiseleva, E., Bjorkroth, B., Wurtz, T. and Daneholt, B. (1996). A pre-mRNA binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell.* 84, 253-264
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G. M. and Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four isoforms. *Genomes* 48, 195-202
- Wagner, E.J., and Garcia-Blanco M.A. (2001). Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3281-3288
- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H. and Gorospe, M. (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *Embo. J.* 19, 2340-2350
- Wang, Y., You. M. and Wang, Y. (2001). Alternative splicing of the K-ras gene in mouse tissues and cell lines. *Exp. Lung Res.* 27, 255-267
- Wang, Y., Zhang, Z., Lubet, R.A. and You, M. (2006). A mouse model for tumor progresion of lung in ras and p53 transgenic mice. *Oncogene*, 25, 1277-1280

- Wang, Z., Trifillis, D.P. and Kilejian, M. (1999). An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol. Cell Biol.* 19, 4552-4560
- Wickens, M., Anderson, P. and Jackson, R.J. (1997). Life and death in the cytoplasm: Messages from the 3'-end. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 220-232
- Worden, F.P. and Kalemkerian, G.P. (2000). Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 9, 565-579
- Wu, J.Y. and Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-70
- Wu, S., Sato, M., Endo, C., Sakurada, A., Dong, B., Aikawa, H., Chen, Y., Okada, Y., Matsumura, Y., Sueoka, E. and Kondo, T. (2003). hnRNP B1 protein may be a possible prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 41, 179-186
- Xie, J., Lee, J.A., Kress, T.L., Mowry, K.L. and Blank, D.L. (2003). Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8776-8781
- Xu, N., Chen, C.Y. and Shyu, A.B. (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol. Cell Biol.* 20, 6960-6971
- Yan-Sanders, Y., Hammons, G.J. and Lyn-Cook, B.D. (2002). Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells. *Cancer Lett.* 183, 215-220
- Yuan, A., Yu, C.J., Kuo, S.H., Chen, W.J., Lin, F. Y., Luh, K.T., Yang, P.C. and Lee, Y.C (2001). Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 19, 432-441
- Yugami, M., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H. (2007). hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. *FEBS Lett.* 581, 1-7
- Zamore, P.D. and Green, M.R. (1989). Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9243-47
- Zamore P.D., Patton, J.G. and Green, M.R. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* 355, 609-14

- Zech, V.F.E., Dlaska, M., Tzankov, A. and Hilbe, W. (2006). Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Detection and Prevention* 30, 395-402
- Zerbe, L.K., Pino, I., Pio, R., Cosper, P.F., Dwyer-Nield, L.D., Meyer, A.M., Port, J.D., Montuenga, L.M. and Malkinson, A.M. (2004). Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: Implications for pre-mRNA processing. *Mol. Carcinogenesis* 41, 187-196
- Zhang, Q-S, Manche, L., Xu, R-M. and Krainer, A.R. (2006). HnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA* 12, 1116-1128
- Zhou, J., Allred, D.C., Avis, I., Martinez, A., Vos, M.D., Smith, L., Treston, A.M. and Mulshine, J.L. (2001). 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.* 66, 217-224
- Zhou, J., Mulshine, J.L., Unsworth, E.J., Scott, E.M., Avis, I.M., Vos, M.D. and Treston, A.M. (1996). 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.* 271, 10760-10766
- Zhu, H., Zhou, H-L, Hasman, R.A. and Lou, H. (2007). Hu proteins Regulate Polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J. Biol. Chem.* 282, 2203-2210