

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mojca TAJNIK

**IZRAŽANJE GENOV IN VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH
REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA
PRI MALIGNIH TUMORJIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENE EXPRESSION AND INFLUENCE OF INTRONIC SEQUENCE
POLYMORPHISMS ON ALTERNATIVE SPLICING REGULATION IN
MALIGNANT TUMORS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Biomedicine, področje genetike. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Oddelku za molekularno genetiko, Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani ter na MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Velika Britanija.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem dokorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetike. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Damjan Glavač. Po sklepu Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 14. 3. 2012 je bil za somentorja imenovan prof. dr. Jernej Ule.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Simon Horvat

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Metka Volavšek, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

Član: prof. dr. Damjan Glavač

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

Član: prof. dr. Jernej Ule

UCL Institute of Neurology, London, Velika Britanija

Datum zagovora: 6. maj 2013

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mojca Tajnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 575:616-006.04(043.3)=163.6
KG	izražanje genov/rak glave in vratu/možganski tumorji/gliomi/cDNA mikromreže/qPCR/BBC3 /imunohistokemija/biomarkerji/polimorfizmi/alternativno izrezovanje/regulacija/ elementi Alu /eksonizacija/hnRNP C/kompeticija
AV	TAJNIK, Mojca, univ. dipl. bioteh.
SA	GLAVAČ, Damjan (mentor)/ULE, Jernej (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje genetike
LI	2013
IN	IZRAŽANJE GENOV IN VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA PRI MALIGNIH TUMORJIH
TD	Doktorska disertacija
OP	XVII, 101 str., 8 pregl., 26 sl., 2 pril., 166 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z uporabo cDNA mikromrež ter njihovo primerjavo z rezultati ostalih študij, qPCR in imunohistokemijo smo analizirali izražanje genov pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu (PKGTV) in gliomih. Pri PKGV smo ugotovili, da več izmed spremenjeno izraženih genov sodeluje pri endopeptidazni aktivnosti, med drugim <i>SLPI</i> in <i>CTSK</i> . V primeru gliomov smo s primerjavo astrocitomov in oligodendrogliomov določili 20 spremenjeno izraženih genov. Za <i>VIM</i> , <i>EEF1A1</i> in <i>SPARC</i> smo ugotovili, da se razlikuje med skupinami tumorjev, kar smo preverili z analizo izražanja v ostalih študijah. Preučevali smo izražanje apoptotičnih biomarkerjev v PKGV in določili zmanjšano izražanje <i>BBC3</i> ter povezavo med velikostjo tumorjev. Z analizo izražanja ostalih genov apoptoze ter z imunohistokemijsko analizo TP53, TP63, BCL2 ter BAX smo potrdili model, kjer BBC3 deluje odvisno ali neodvisno od TP53. V nadaljevanju smo določali molekularne funkcije RNA-vezavnega proteina hnRNP C z uporabo podatkov iCLIP in RNA-seq. Vezava hnRNP C je bila v veliki meri opažena v intronskih regijah, hnRNP C pa določen kot utiševalec alternativnih eksonov, pri katerih se veže na polipirimidinska zaporedja navzgor od 3' izrezovalnih mest. Preverjali smo njegovo kompeticijo s faktorjem U2AF65 ter s semikvantitativno analizo RT-PCR potrdili regulacijo globalnega izražanja kriptičnih elementov Alu. Z reporterskimi minigeni smo pokazali, da znižano izražanje <i>HNRNPC</i> vodi do povečanja vezave U2AF65, kar ima za posledico drastično povečanje vključitve Alu eksona v mRNA. Z usmerjeno mutagenezo smo spremenili zaporedja polipirimidinskih traktov elementov Alu. Dokazali smo, da kompeticija med hnRNP C in U2AF65 uravnava eksonizacijo elementov Alu. Za preverjanje vpliva eksonizacije elementov Alu v bolezenskih stanjih smo pripravili minigen z regijo gena <i>PTS</i> , kjer delecija dela Alu privede do hiperfenilalaninemije. Kontrola vezave U2AF65 je ključnega pomena za preživetje celic, saj zmanjšana možnost vezave hnRNP C povzroči porušenje integritete transkriptoma zaradi škodljive eksonizacije elementov Alu.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd
 DC UDC 575:616-006.04(043.3)=163.6
 CX gene expression/head and neck cancer/brain tumors/glioma/cDNA microarrays/qPCR/BBC3/immunohistochemistry/biomarkers/polymorphisms/alternative splicing/regulation/Alu elements/exonization/hnRNP C/competition
 AU TAJNIK, Mojca
 AA GLAVAČ, Damjan (supervisor)/ULE, Jernej (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, field of genetics
 PY 2013
 TI GENE EXPRESSION AND INFLUENCE OF INTRONIC SEQUENCE POLYMORPHISMS ON ALTERNATIVE SPLICING REGULATION IN MALIGNANT TUMORS
 DT Doctoral Dissertation
 NO XVII, 101 p., 8 tab., 26 fig., 2 ann., 166 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB We analysed gene expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and glioma samples using cDNA microarrays and performed comparisons of the results from other public available datasets, qPCR and immunohistochemistry. In HNSCC we detected differentially expressed genes enriched in endopeptidase activity, such as *SLPI* and *CTSK*. In glioma we detected 20 differentially expressed genes between astrocytic and oligodendroglial tumors. For *VIM*, *EEF1A1* and *SPARC* we evaluated our results with other datasets. Analysis of apoptotic biomarkers in HNSCC revealed downregulation of *BBC3* to be in correlation with tumor size. Using gene expression data of other apoptotic markers and immunohistochemistry of TP53, TP63, BCL2 and BAX we confirmed the model, where BBC3 functions dependent or independent of TP53. Next we investigated molecular functions of RNA-binding protein hnRNP C using data from iCLIP and RNA-seq experiments. Crosslinking of hnRNP C was observed in intronic regions and hnRNP C determined as a silencer of alternative exons due to its binding to polypyrimidine tracts upstream of 3' splice sites. Using semiquantitative RT-PCR we verified its competition with U2AF65 as a regulator of global cryptic Alu exonization. Our reporter minigene results shown that *HNRNPC* knockdown leads to increased amount of U2AF65 binding following drastic increase of Alu exonizations. We disrupted Alu polypyrimidine tract sequences using site-directed mutagenesis and demonstrated that Alu exonization is regulated through the competition of hnRNP C and U2AF65. Minigene *PTS* was constructed in order to evaluate importance of Alu exonization in disease, where deletion of a part of Alu element leads to hyperphenylalaninemia. The control of U2AF65 binding is crucial for the healthy cells, since decrease in hnRNP C binding cause disruption of transcriptome integrity due to deleterious exonization of Alu elements.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
SEZNAM OKRAJŠAV	XII
SLOVARČEK	XVI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	3
1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	5
2 PREGLED OBJAV	6
2.1 ANALIZA REGULACIJE IZRAŽANJA GENOV PRI RAKAVIH OBOLENJIH	6
2.1.1 Molekularno profiliranje z uporabo DNA mikromrež.....	7
2.1.1.1 Uporaba DNA mikromrež v genetskih analizah raka glave in vratu	9
2.1.1.2 Uporaba DNA mikromrež v genetskih analizah možganskih tumorjev	10
2.1.2 Spremenjeno izražanje genov apoptoze glede na različne histopatološke značilnosti ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu.....	13
2.2 REGULACIJA ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA.....	17
2.2.1 RNA-vezavni proteini in prepoznavanje zaporedij pre-mRNA	19
2.2.2 Regulacija AI z interakcijo RNA-vezavnih proteinov in cis-delujočih elementov pre-mRNA	19
2.2.3 Metoda navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja (iCLIP)	22
2.2.4 Določitev vezavnih mest hnRNP C na pre-mRNA.....	24
2.3 VPLIV POLIMORFIZMOV NA REGULACIJO AI IN NASTANEK BOLEZENSKIH STANJ	26
2.3.1 Deregulacija AI pri raku	27
2.3.2 Določanje vpliva polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo AI s sistemom reporterskih minigenov	29

2.4	EKSONIZACIJA ELEMENTOV ALU	30
2.4.1	Elementi Alu v intronih in alternativno izrezovanje	30
2.4.2	Negativne posledice eksonizacije elementov Alu: vpliv na nastanek bolezni	32
3	MATERIALI IN METODE	34
3.1	IZRAŽANJE GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH	34
3.1.1	Bolniki in tumorski vzorci	34
3.1.1.1	Vzorci PKGV	34
3.1.1.2	Vzorci možganskih tumorjev	36
3.1.2	Ekstrakcija RNA	37
3.1.3	cDNA mikromreže: priprava vzorcev, hibridizacija, analiza podatkov	37
3.1.4	Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)	39
3.1.5	Imunohistokemijska detekcija TP53, TP63, BCL2 in BAX proteinov	40
3.1.6	Analiza podatkov qPCR, imunohistokemije in javno dostopnih podatkov cDNA mikromrež	40
3.2	VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO AI ...	42
3.2.1	Celične kulture	42
3.2.2	Znižanje izražanja <i>HNRNPC</i> in sistem reporterskih minigenov	42
3.2.3	Bioinformacijska analiza podatkov pridobljenih z metodami nove generacije sekveniranja: iCLIP in RNA-seq	43
3.2.4	Priprava reporterskih minigenov s tehnologijo rekombinantne DNA	43
3.2.5	Kvantifikacija alternativnih spojitvenih oblik sistema reporterskih minigenov	46
3.2.6	Kvantifikacija vključitve endogenih Alu eksonov	46
4	REZULTATI	47
4.1	ANALIZA IZRAŽANJA GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH	47
4.1.1	Rezultati analize mikromrež pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu ...	47
4.1.2	Rezultati mikromrež vzorcev možganskih tumorjev	50
4.1.3	Izražanje apoptotičnih biomarkerjev pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu	57
4.2	VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA	62
4.2.1	Analiza in validacija iCLIP in RNA-seq podatkov	62
4.2.2	Vpliv polimorfizmov na vključitev alternativnih Alu eksonov	69
4.2.3	Vpliv polimorfizmov v elementih Alu na razvoj bolezni	72

5	RAZPRAVA	74
5.1	ANALIZA IZRAŽANJA GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH.....	74
5.2	VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA	78
6	SKLEPI	82
7	POVZETEK (SUMMARY).....	84
7.1	POVZETEK	84
7.2	SUMMARY	87
8	VIRI.....	90

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Demografski podatki bolnikov PKGV, histopatološke značilnosti ter lokacije tumorjev	35
Preglednica 2: Seznam uporabljenih vzorcev bolnikov možganskih tumorjev pri analizi cDNA mikromrež, njihovi demografski podatki in histopatološke značilnosti.	36
Preglednica 3: Potek hibridizacije na hibridizacijski postaji HS400.....	38
Preglednica 4: Podatki objavljenih študij za analizo z orodjem Oncomine s pripadajočim številom vzorcev v vsaki analizirani skupini tumorjev z astrocitno in oligodendrogliarno diferenciacijo ter število vzorcev normalnega tkiva, uporabljenega pri analizi mikromrež.	39
Preglednica 5: PCR oligonukleotidni začetniki za molekularno kloniranje reporterskih minigenov ter kvantifikacijo izooblik z RT-PCR.	45
Preglednica 6: Seznam spremenjeno izraženih genov PKGV v primerjavi s pripadajočimi normalnimi tkivi, dobljenih z analizo cDNA mikromrež	49
Preglednica 7: Seznam spremenjeno izraženih genov pri možganskih tumorjih v primerjavi z referenčno RNA, dobljenih z analizo cDNA mikromrež.....	53
Preglednica 8: Rezultati statistične analize rezultatov cDNA mikromrež možganskih tumorjev.	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Priprava in izvedba poskusov z dvobarvnimi mikromrežami (Macgregor in Squire, 2002).....	8
Slika 2: Genetske poti, ki vodijo do primarnih in sekundarnih glioblastomov (Ohgaki in Kleihaus, 2007).	11
Slika 3: Poenostavljen prikaz zunanje in notranje poti apoptoze (Cotter, 2009)	14
Slika 4: Model dvosmernega delovanja BBC3 v procesu apoptoze (Yu in Zhang, 2008).....	16
Slika 5: Reakcija procesiranja pre-mRNA s povezovalno-izrezovalnim kompleksom (Chen in Manley, 2009).	17
Slika 6: Shematski prikaz možnosti alternativnega izrezovanja (Cartegni in sod., 2002)	18
Slika 7: Vezava RNA-vezavnih proteinov na pre-mRNA (Keren in sod., 2010)	20
Slika 8: Shematska predstavitev metode iCLIP (König in sod., 2010)	23
Slika 9: hnRNP C uravnava izražanje alternativnih eksonov z vezavo na uridinska zaporedja (König in sod., 2010)	25
Slika 10: Proces eksonizacije obratnosmernih elementov Alu (Keren in sod., 2010).....	31
Slika 11: Primeri patološke eksonizacije obratnosmernih elementov Alu (Vorechovsky in sod., 2010)	32
Slika 12: Prikaz rezultatov analize cDNA mikromrež vzorcev PKGV	48
Slika 13: Relativno izražanje genov <i>CTSK</i> , <i>SLPI</i> in <i>CTSG</i> , določeno s kvantitativnim PCR v realnem času (qPCR) pri PKGV	50
Slika 14: Prikaz rezultatov analize cDNA mikromrež vzorcev možganskih tumorjev	52
Slika 15: Analiza izražanja <i>VIM</i> , <i>SPARC</i> in <i>EEF1A1</i> pri vzorcih možganskih tumorjev z orodjem Oncomine	55
Slika 16: qPCR rezultati izražanja <i>BBC3</i> pri PKGV in korelacija s pTNM parametri in lokacijo tumorjev.....	58
Slika 17: Izražanje apoptotičnih biomarkerjev z analizo mikromrež iz prosto dostopnih podatkovnih zbirk.....	59
Slika 18: Izražanje TP53, BCL2, TP63 in BAX proteinov, detekcija z imunohistokemijo.....	60
Slika 19: Vennov diagram analize izražanja TP53, BCL2 in BAX	61

Slika 20: Izražanje proteina U2AF65 ni bilo spremenjeno v celicah z znižanim izražanjem <i>HNRPNPC</i>	63
Slika 21: Validacija vključitve elementov Alu v transkripte kontrolnih HeLa celic ter celic z znižanim izražanjem <i>HNRNPC</i>	64
Slika 22: Rezultati kvantifikacije DEXSeq Alu eksonov z analizo RT-PCR in kapilarno elektroforezo.....	67
Slika 23: Kvantifikacija RT-PCR produktov detektiranih elementov Alu, ki so vsaj 2-kratno spremenjeno izraženi v celicah z znižanim izražanjem <i>HNRNPC</i> , vendar niso bili detektirani z DEXSeq.....	68
Slika 24: Točkovne mutacije, ki spremenijo vezavo hnRNP C povzročijo vključitev Alu eksona v <i>CD55</i> minigenu	70
Slika 25: hnRNP C preprečuje eksonizacijo elementa Alu v <i>NUP133</i> minigenu preko kompeticije z U2AF65	71
Slika 26: hnRNP C preprečuje eksonizacijo elementa Alu v <i>PTS</i> genu in nastanek bolezni...	73

KAZALO PRILOG

Priloga A: Validacija spremembe vključitve novih Alu eksonov, detektiranih z DEXSeq, v transkripte celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*.

Priloga B: Validacija spremembe vključitve novih Alu eksonov, ki niso bili detektirani z DEXSeq, ampak so imeli najmanj 2-krat spremenjeno izražanje v transkriptih celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*.

SEZNAM OKRAJŠAV

AI: alternativno izrezovanje

APAF1: aktivacijski faktor 1 apoptozne proteaze (angl. apoptotic peptidase activating factor 1)

APC: protein adenomatozne polipoze črevesa (angl. adenomatous polyposis coli)

ANOVA: analiza variance

ATP: adenzin trifosfat

BAX: BCL2-povezani protein X (angl. BCL2-associated X protein)

BBC3: BCL2 vezavna komponenta 3 (angl. BCL2 binding component 3)

BCL2: B-celični CLL/limfoma 2 protein (angl. B-cell CLL/lymphoma 2)

BCLX: BCL2-podoben protein 1 (angl. BCL2-like 1); uradni simbol BCL2L1

BRCA1: protein dovzetnosti za raka dojke 1 (angl. breast cancer 1, early onset)

CD55: komplement dejavnika pospešenega razkroja 55 (angl. CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group))

CDKN2A: od ciklina odvisni kinazni inhibitor 2A (angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

cDNA: komplementarna DNA

CTSG: katepsin G

CTSK: katepsin K

Cy3: cianin 3

Cy5: cianin 5

EEF1A1: evkariotski translacijski faktor elongacije 1 (angl. eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1)

EGFR: receptor za epidermalni rastni dejavnik (angl. epidermal growth factor receptor)

ESE: ojačevalci spajanja eksonov (v eksonih)

ESS: utiševalci spajanja eksonov (v eksonih)

FADD: protein, ki se veže na Fas in vsebuje domeno smrti (angl. Fas (TNFRSF6)-associated via death domain)

GAPDH: gliceraldehid-3-fosfat

GBM: glioblastom

GUSB: beta-glukoronidaza

hnRNP: heterogeni jedrni ribonukleoproteini

hnRNP C: heterogeni jedrni ribonukleoproteini C1/C2

iCLIP: metoda navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja

ISE: ojačevalci spajanja eksonov (v intronih)

ISS: utiševalci spajanja eksonov (v intronih)

LOH: izguba heterozigotnosti

mRNA: informacijska RNA

NF1: nevrofibromin 1

NUP133: nukleoporin 133

PCR: verižna reakcija s polimerazo

PK: ploščatocelični karcinom

PKG: ploščatocelični karcinom glave in vratu

pre-mRNA: prekurzorska mRNA

PTB: protein, ki se veže na polipirimidinsko zaporedje (angl. polypirimidine tract binding)

PTEN: homolog fosfataze in tenzina (angl. phosphatase and tensin homolog)

PTS: 6-piruviltetrahidropterin sintaza

RIN: vrednost integritete RNA

RNA-seq: določanje nukleotidnega zaporedja celotnega transkriptoma

RNP: ribonukleoproteinski

RRM: RNA-vezavni modul

RT-PCR: obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

RVI: relativna vrednost izražanja

qPCR: kvantitativen PCR (v realnem času)

SF1: faktor izrezovanja 1

SLPI: sekretorni inhibitor levkocitne peptidaze

SMA: spinalna mišična atrofija

SMN1: protein preživetja motoričnega nevrona 1 (angl. survival of motor neuron 1)

snRNP: mali jedrni RNP delci

SPARC: osteonektin (angl. secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin))

TIA1: citotoksični z granulami povezani RNA vezavni proteini (angl. cytotoxic granule-associated RNA binding protein)

TNF: dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)

TP53: tumorski protein 53 (angl. tumor protein 53)

TP63: tumorski protein 63 (angl. tumor protein 63)

U2AF65: faktor spajanja U2AF, podenota 65 kDa (angl. U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2)

VIM: vimentin

WHO: Svetovna zdravstvena organizacija

SLOVARČEK

Element Alu: kratka ponovljiva DNA zaporedja, transpozicijski elementi (pribl. 300 bp) v genomih primatov; predstavljajo približno 10 % človeškega genoma

Alternativno izrezovanje (intronov): proces izražanja genov; omogoča, da iz enega gena nastanejo različni proteini preko regulacije vključitve/izključitve alternativnih eksonov

Apoptoza: programirana celična smrt, lahko jo sprožijo zunanji dejavniki z vezavo na membranske receptorje (ekstrinzična, zunanja apoptoza) ali pa znotrajcelični signali, ki delujejo na mitohondrije (intrinzična, notranja apoptoza)

Biomarker: biokemijska, genetska ali molekularna lastnost; indikator določenega biološkega stanja ali procesa; pogosto orodja/tehnologije, ki omogočajo razumevanja vzroka, spremljanje zdravljenja, postavitev diagnoze oz. imajo napovedno vrednost

cDNA mikromreže: kratki odseki DNA, nanešeni na nosilec z namenom vezave komplementarnih zaporedij in njihove identifikacije/kvantifikacije; večinoma se uporabljajo za analizo izražanja genov

Cis-delujoči elementi: regije DNA ali RNA, ki regulirajo izražanje genov

Eksonizacija: tvorba/pojav novega eksona, kot posledice mutacij v intronskih regijah

FDR korekcija: angl. false discovery rate; statistična metoda testiranja več hipotez z namenom odstranitve lažno pozitivnih rezultatov pri analizi več primerjav istih podatkov

iCLIP: spremljanje vezave RNA-vezavnih proteinov na vezavna mesta pre-mRNA v celotnem transkriptomu z ločljivostjo posameznega nukleotida

Izražanje genov: proces, s katerim se genomska informacija uporabi za tvorbo delujočega genskega produkta – proteinov ali funkcionalnih nekodirajočih RNA

Izrezovalno-povezovalni kompleks: angl. spliceosome; kompleks petih snRNA in več proteinskih faktorjev (snRNP), ki odstranijo introne iz pre-mRNA

Minigen: genomsko zaporedje z vključenim alternativnim eksonom, sosednjimi introni in konstitutivnimi eksoni; z molekularnim kloniranjem vstavljen v ekspresijski vektor

pre-mRNA: primarni oz. začetni transkript genov, vsebuje introne in eksone

pTNM klasifikacija: angl. tumor-node-metastasis; mednarodno uveljavljena patohistološka klasifikacija stadija tumorjev glede na velikost (T), prizadetost področnih bezgavk (N) in pojavnost oddaljenih metastaz (M)

RIN: angl. RNA integrity number; parameter za oceno integritete oz. kvalitete RNA

RNA-seq: uporaba visokozmogljivih tehnologij nove generacije sekveniranja z namenom določitve zaporedij RNA (oz. cDNA) na nivoju celotnega transkriptoma; omogoča analizo izražanja genov, alternativnega izrezovanja, nekodirajočih regij itd.

RNA-vezavni proteini: proteini, ki se vežejo na RNA z RNA-prepoznavnim modulom (domena RRM); večinoma so udeleženi pri regulaciji nastajanja mRNA ali translaciji

RVI: angl. fold change; razmerje izražanja (gena) med testnim in kontrolnim vzorcem

qPCR: merimo količine pomnoženih PCR produktov po inkorporaciji fluorescentnih barvil, katerih signal se povečuje glede na količino produkta

Serinska proteaza: encimi, ki cepijo peptidne vezi v proteinih, na katerih se na aktivnih mestih pojavijo serinske aminokisline

Sinonimne mutacije: nukleotidne zamenjave brez spremembe aminokislinskega zaporedja

SR proteini: angl. serine/arginine-rich proteins; sodelujejo pri regulaciji in izbiri izrezovalnih mest v procesu izrezovanja

Trans-delujoči faktorji: proteini, ki se vežejo na cis-delujoča zaporedja in regulirajo izražanje genov

Transfekcija: proces vključitve eksogene DNA v celice

Transkriptom: skupina vseh RNA molekul (mRNA, rRNA, tRNA ter ostale nekodirajoče RNA), ki jih proizvede ena celica ali njihova populacija

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Rak je kompleksna genetska bolezen do katere vodijo različne biokemijske poti. Vsaka od njih vključuje veliko število sodelujočih genov - potencialnih tarč škodljivih mutacij, ki s kopičenjem vplivajo na pojav genetske nestabilnosti, spremenjenega izražanja genov ter napačno količino ali obliko proteinskega produkta. To povzroča neovirano delitev, neodzivnost na zunajcelične sporočevalce ter izgubo sposobnosti apoptoze, s čimer sta rakavim celicam omogočena rast in preživetje (Vogelstein in Kinzler, 2004). Eden izmed glavnih ciljev raziskav rakavih obolenj je določitev molekularnih sprememb, ki vodijo do zgoraj omenjenih posledic, in sicer že pred ali v čim zgodnejši fazi karcinogeneze. Tovrstni biomarkerji lahko pripomorejo k obogatitvi znanja o molekularno-genetskih poteh nastanka posameznega tipa raka, boljši postavitvi diagnoze in ustreznijem izboru zdravljenja. Kljub temu, da se je v zadnjih 30. letih znanje o genetskih biomarkerjih raka izredno povečalo, je njihova rutinska uporaba v klinični praksi še vedno zelo omejena. Eden izmed razlogov je zagotovo dejstvo, da uporaba le enega oz. nekaj biomarkerjev ne more zagotoviti zadosti klinično uporabne informacije (Newsheen in sod., 2012).

Genomske tehnologije, kamor spadajo tudi cDNA mikromreže, nam omogočajo hkratno spremljanje izražanja več tisoč genov, npr. določimo lahko spremenjeno izražanje genov tumorskega v primerjavi z normalnim tkivom in s profili spremenjenega izražanja genov v posameznih tipih raka pod tipe posameznih vrst glede na različno izražanje genov. S tovrstnimi informacijami raziskujemo vzroke nastanka oz. različne poti diferenciacije celic pri rakavih spremembah. V primerih ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu (PKGV) ter možganskih tumorjih molekularno-genetsko ozadje še vedno ni povsem pojasnjeno. S cDNA mikromrežami in validacijo potencialnih biomarkerjev lahko detektiramo predhodno nepoznane spremembe, ki vodijo v karcinogenezo oz. se razlikujejo glede na histopatološke značilnosti tumorjev in različne poti diferenciacije (Macgregor in Squire, 2002).

Veliko število znanih genetskih biomarkerjev spada v družino apoptotičnih proteinov. Znano je, da lahko apoptozo sprožijo zunanji dejavniki z vezavo na membranske receptorje

(t.i. ekstrinzična ali zunanja pot) ali znotrajcelični signali, ki delujejo na mitohondrije (intrinzična ali notranja pot). V tem procesu sodeluje več kot 200 različnih proteinov, kjer je ključno delovanje proteinov kaspaz. Njihovi regulatorji spadajo v družino proteinov BCL2, in sicer so to pro-apoptotični proteini BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA in BBC3 ter njihovi inhibitorji oz. anti-apoptotični proteini BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1 in A1 (Cotter, 2009). Njihovo spremenjeno izražanje tako na genetskem kot na proteinskem nivoju je pomembno pri razumevanju poti nastanka rakavih tvorbo. Njihove interakcije in sočasna pojavnost imajo velik vpliv na preživetveno sposobnost celic – ali se bodo še naprej nenadzorovano delile in postale nesmrtno ali pa bodo prešle v fazo celične smrti - apoptozo (Vogelstein in Kinzler, 2004). V doktorski nalogi smo na primeru PKGV analizirali izražanje nekaterih najpomembnejših apoptotičnih faktorjev, kot so TP53, BAX, BCL2, TP63, NOXA ter BBC3, katerega delovanje v procesu apoptoze oz. sodelovanje z ostalimi faktorji regulacije apoptoze še ni povsem pojasnjeno (Yu in Zhang, 2008).

V drugem delu smo se osredotočili na raziskovanje vpliva polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo alternativnega izrezovanja. Reakcijo izrezovanja uravnava proteinski izrezovalno-povezovalni kompleks (angl. spliceosome), ki prepozna izrezovalna mesta v zaporedju prekurzorske mRNA (pre-mRNA). Pri večini genov se lahko eksoni med seboj povežejo na različne načine (t.i. alternativno izrezovanje), kar povzroča raznolikost proteinov, pridobljeno iz istega genskega zapisa preko tvorbe več različic zrelih informacijskih RNA molekul (mRNA). Predpostavlja se, da se približno 10 % patoloških mutacij pojavlja v zaporedjih izrezovalnih mest (Ward in Cooper, 2010). Tovrstne mutacije se lahko pojavijo v mestih izrezovanja ter tako spremenijo način izrezovanja ali pa ustvarijo nova mesta, kar povzroči vključitev ali izključitev alternativnega eksona. Do napak lahko pride tudi zaradi spremenjene vezave RNA-vezavnih proteinov kot posledice nukleotidnih zamenjav v zaporedju RNA. To vodi v neučinkovito prepoznavanje izrezovalnih mest in tako tvorbe (patoloških) alternativnih spojitvenih oblik. Tovrstne nukleotidne zamenjave so velikokrat sinonimne ali pa se nahajajo v intronskih regijah. Dolgo so bile definirane kot šum brez funkcijskega vpliva, danes pa je znano, da imajo preko uravnavanja alternativnega izrezovanja velik vpliv na razvoj različnih bolezenskih stanj, tudi rakavih obolenj (Zhang in Stamm, 2011).

Najpogosteje uporabljena metoda analize vključitve oz. izključitve eksonov ter vpliva nukleotidnih zamenjav na izbiro mesta izrezovanja je analiza z uporabo reporterskih minigenov (Singh in Cooper, 2006). Na ta način smo v doktorski nalogi analizirali funkcijski vpliv spremenjene vezave proteinov hnRNP C in U2AF65, ki je posledica nukleotidnih zamenjav v regulatornih regijah izrezovanja. Na primeru klinično pomembnih nukleotidnih sprememb smo pojasnili vlogo spremenjega delovanja RNA-vezavnih proteinov tudi pri pojavu bolezenskih stanj. Podatki tehnologij nove generacije sekveniranja nam omogočajo ustvarjanje povezav med identificiranimi polimorfizmi ter globalno analizo spremenjenega izražanja genov.

1.2 NAMEN RAZISKAVE

V prvem delu doktorske naloge smo se osredotočili predvsem na analizo spremenjenega izražanja genov apoptoze v procesih diferenciacije malignih tumorjev z namenom določitve morebitnih novih biomarkerjev. S cDNA mikromrežami smo preverjali spremenjeno izražanje genov v primarnih tumorjih ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu (PKGTV) ter v možganskih tumorjih – gliomih. V primeru PKGTV nas je zanimalo spremenjeno izražanje genov v primerjavi s pripadajočim normalnim tkivom ter kako se izražanje nekaterih apoptotičnih biomarkerjev spreminja glede na histopatološke parametre, kot so faktorji pTNM klasifikacije in lokacija tumorjev. Pri analizi izražanja možganskih tumorjev smo se osredotočili na analizo sprememb v izražanju med tumorskim tkivom in referenčno možgansko RNA z uporabo cDNA mikromrež ter kako se izražanje spremenjenih genov razlikuje glede na tip diferenciacije tumorjev. Za preverjanje rezultatov mikromrež smo uporabili metode kvantitativnega PCR v realnem času, imunohistokemijo ter primerjavo s predhodno objavljenimi študijami analiz izražanja genov s cDNA mikromrežami.

Namen prvega dela doktorske naloge je bil:

- določitev novih potencialnih biomarkerjev pri posamezni vrsti malignih tumorjev (PKGTV in gliomi),

- analiza izražanja predpostavljenih apoptotičnih biomarkerjev PKGV nekaterih drugih raziskav ter
- iskanje potencialnih biomarkerjev različnih poti diferenciacije tumorjev (gliomi).

Znano je, da je spremenjeno izražanje genov lahko posledica različne regulacije transkripcije zaradi genetskih in epigenetskih dejavnikov ter različnih post-transkripcijskih sprememb, kot so stabilizacija RNA pred degradacijo in izrezovanje intronov (Cairns in sod., 2011). V drugem delu doktorske naloge smo se osredotočili na analizo regulacije mehanizmov alternativnega izrezovanja. Še posebej nas je zanimalo kako spremembe v nukleotidnih zaporedjih intronskih regij vplivajo na proces izrezovanja. Za ta namen smo uporabili metodo sistema reporterskih minigenov, ki nam omogoča študij analize posledic sprememb v nukleotidnih zaporedjih regulatornih regij na izbiro mest izrezovanja ter posledično vključitev alternativnih eksonov v zrelo mRNA. Z njihovo uporabo smo preverjali vpliv sprememb nukleotidov v intronskih regijah na vezavo RNA-vezavnih proteinov v procesu izrezovanja intronov, ki lahko vplivajo na pojav oz. razvoj bolezenskega stanja ali kako drugače povzročajo spremenjeno izrezovanje intronov. Kot vhodne podatke naših analiz smo uporabili podatke metode navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja (iCLIP) za proteina hnRNP C in U2AF65 ter podatke izražanja RNA na nivoju celotnega transkriptoma (RNA-seq).

Namen drugega dela doktorske naloge je bil:

- preverjanje bioinformacijsko pridobljenih podatkov vezavnih mest RNA-vezavnih proteinov ter vpliva vezave RNA-vezavnih proteinov na izražanje različnih spojitvenih oblik,
- analiza vpliva polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo alternativnega izrezovanja s proteinoma hnRNP C in U2AF65 ter
- določitev vpliva polimorfizmov v intronskih regijah na pojav bolezenskih stanj.

1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

V okviru doktorske naloge smo postavili naslednje hipoteze:

- Z metodologijo cDNA mikromrež bomo preko profilov spremenjenega izražanja našli nove kandidatne gene, pomembne pri nastanku in razvoju PKGV ter gliomov.
- Skupine različnih histopatoloških značilnosti tumorjev imajo različne profile izražanja genov, vključenih v apoptotske poti.
- Spremembe zaporedja pre-mRNA v regulatornih regijah izrezovanja spremenijo način uporabe alternativnih eksonov v končni obliki prepisa zaporedja.
- Sistem analize z reporterskimi minigeni je primerno orodje za študij vpliva bioinformacijsko izbranih polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo alternativnega izrezovanja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANALIZA REGULACIJE IZRAŽANJA GENOV PRI RAKAVIH OBOLENJIH

Izražanje genov je ključni proces uporabe genomske informacije pri sintezi funkcionalnega genskega produkta. V primerih kodirajočih DNA zaporedij so produkti proteini, lahko pa so funkcionalni produkti tudi nekodirajoče RNA. Proces vključuje več med seboj tesno povezanih korakov: transkripcijo, mRNA procesiranje (kamor uvrščamo tudi izrezovanje intronov), translacijo in različne post-translacijske modifikacije. Preko kontroliranega izražanja genov celica izvaja vse potrebne strukturne in funkcijske procese, vključno s celično diferenciacijo, morfogenezo in odzivom na signale iz okolja (DeRisi in sod., 1997).

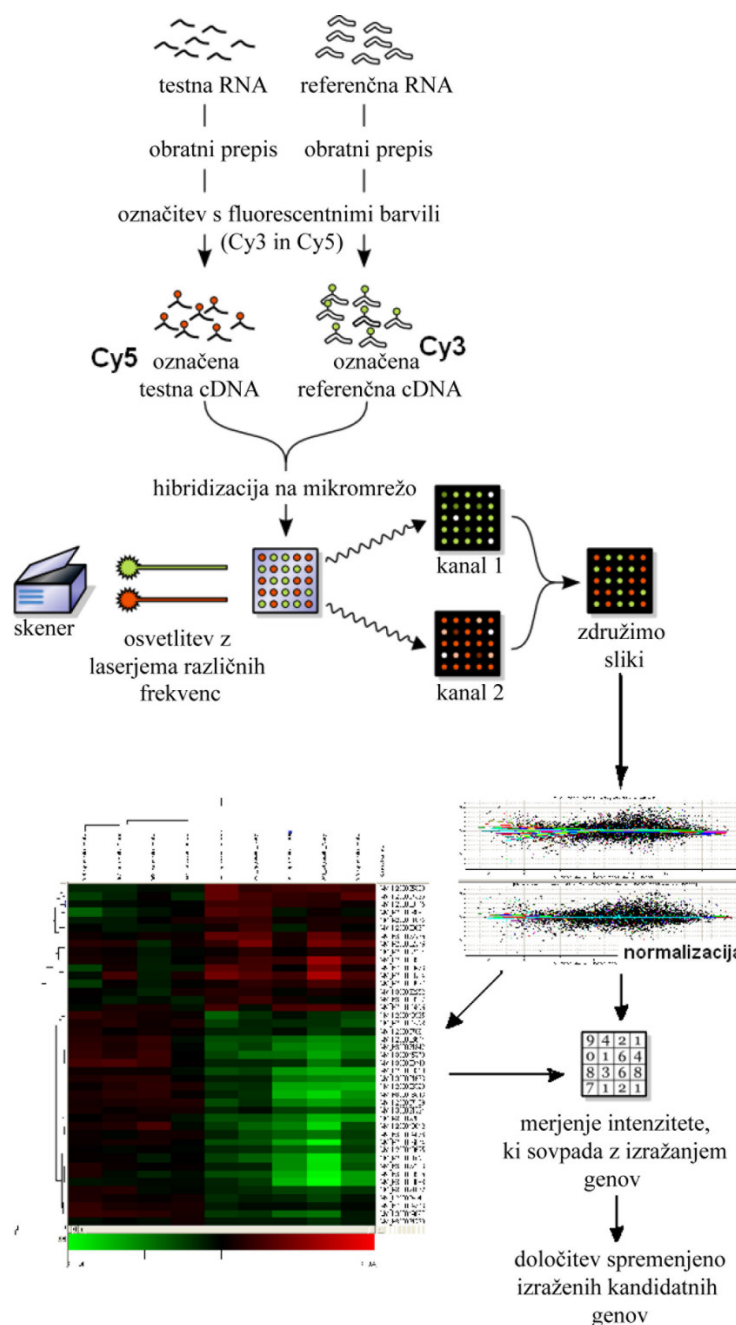
Rak je skupina kompleksnih genetskih bolezni, katerim je skupna nekontrolirana celična rast. Celice se delijo in rastejo nenadzorovano, kar ima za posledico tvorbo malignih tumorjev zaradi sprememb v izražanju treh tipov genov: onkogenov, tumor-supresorskih genov ter genov, potrebnih za stabilnost genoma. Mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih vodijo neoplastični proces preko stimulacije tvorbe novih celic, inhibicije apoptoze ali ustavitve celičnega cikla. Stabilnostni geni ščitijo genom pred spremembami. Kopičenje zarodnih in/ali somatskih mutacij v teh genih poveča predispozicijo za rakava obolenja (Vogelstein in Kinzler, 2004).

Rak je torej bolezen, ki nastane zaradi sinergističnega vpliva več mutacij, kar ima za posledico različno izražanje genov. Tradicionalno se kategorizacija različnih tumorjev izvaja s pomočjo histologije in biokemijskimi testi. Vendar pa je na tem nivoju zapletene molekularne poti, ki vodijo neoplastični proces karcinogeneze, nemogoče popolnoma razvozlati. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja človeškega genoma leta 2001 (Lander in sod., 2001; Venter in sod., 2001) se je začel razcvet molekularno-genetske dobe, kateremu je sledil napredek tehnologij, ki omogoča spremljanje izražanja genov na nivoju celotnega genoma. Sočasno spremljanje genetskega dogajanja s tehnologijo DNA mikromrež je omogočilo natančnejši vpogled v patogenezo nastanka rakavih obolenj, natančnejšo postavitev diagnoze, napoved uspeha zdravljenja in identifikacijo novih terapevtskih tarč (Liotta in Petricoin, 2000). V nadaljevanju je razvoj tehnologij bliskovito napredoval, tako da so tehnološke omejitve analize genomske informacije oz. regulacije izražanja genov s tehnologijami nove generacije sekveniranja presežene (Shendure in Ji, 2008).

2.1.1 Molekularno profiliranje z uporabo DNA mikromrež

Profiliranje izražanja genov z uporabo cDNA in oligonukleotidnih mikromrež je omejeno na nivo analize transkripcije tako da sočasno spremljamo izražanje več tisoč genov. S sistematskim pristopom odkrivamo nove skupine tumorjev ali pa že znane tumorje razporedimo v skupine glede na njihovo napovedano odzivnost na zdravljenje (Liotta in Petricoin, 2000). Tovrsten koncept temelji na dejstvu, da se vsako biološko stanje kot so npr. stopnja razvoja, celični odziv, patološka stanja, reflektira v različnem izražanju genov (Nevins in Potti, 2007).

Mikromreže z oligonukleotidnimi sondami so pripravljene z nanašalnimi roboti, s katerimi sonde naneseemo na steklene nosilce. Zaporedja sond so glede na raziskovalna vprašanja izbrana iz podatkovnih zbirk ali pa vsebujejo informacije za analizo genov na nivoju celotnega transkriptoma. V primeru dvobarvnih mikromrež izvedemo hkratno analizo izražanja genov kontrolnega in testnega vzorca. Primerjamo izražanje genov dveh bioloških vzorcev, npr. kontrolne in tretirane celice oz. rakavo in okoliško zdravo tkivo. Pri običajnih poskusih z mikromrežami izolirano RNA obratno prepisemo v cDNA v prisotnosti fluorescentnih barvil cianin 3 in 5 (Cy3 in Cy5). Po očiščenju in denaturaciji označene tarče hibridiziramo na mikromreže in odstranimo nespecifično vezane tarče. Mikromreže nato izpostavimo laserski svetlobi različnih valovnih dolžin glede na izbrana fluorescentna barvila ter z optičnim čitalcem proizvedemo visokokvalitetne slike. Pridobljene slike nato analiziramo in izračunamo intenziteto signalov posameznih sond z odštetim signalom ozadja. Tako za vsako sondo pridobimo začetna razmerja intenzitet signalov testnega in referenčnega vzorca. Nadalje se izvede normalizacija podatkov, ki uredi intenzitete signalov posamezne mikromreže na način, da razmerja intenzitet predstavljajo približek razmerja izražanja genov med različnimi vzorci. Sledi statistična analiza s katero določimo spremenjeno izražene gene v analiziranih vzorcih. Običajno izražanje kandidatnih spremenjeno izraženih genov nato še preverimo s kvantitativnim PCR v realnem času (qPCR) na naboru večjega števila vzorcev (Macgregor in Squire, 2002). Princip priprave in izvedbe poskusov z dvobarvnimi mikromrežami je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Priprava in izvedba poskusov z dvobarvnimi mikromrežami (Macgregor in Squire, 2002). Testna in kontrolna RNA se obratno prepiše in označi s fluorescentnimi barvili (Cy3 in Cy5). Vzorca se združi in hibridizira na mikromrežo, ki se jo nato osvetli z laserjema različnih frekvenc in pridobi slike z optičnim čitalcem. Po filtraciji in normalizaciji pridobimo razmerja intenzitet signalov testnega in kontrolnega vzorca ter kandidatne spremenjeno izražene gene.

Figure 1: Experiments with dual-color microarrays (Macgregor and Squire, 2002). Test and control RNAs are reverse transcribed and labelled with fluorescent dyes (Cy3 and Cy5). Samples are combined and hybridized on microarrays. Microarray image processing uses differential excitation and emission wavelengths of the two fluors to obtain a scan of the array for each emission wavelength. After filtration and normalization of the data we obtain ratio of signal intensities between test and control sample for each target. The results are candidates of differentially expressed genes.

Golub in sod. so bili med prvimi, ki so pokazali, da vzorci izražanja različnih skupin genov nosijo informacije, na podlagi katerih lahko tumorje razporedimo v skupine glede na podobno izražanje genov (Golub in sod., 1999). Brez predhodnih bioloških informacij so na primeru levkemije na podlagi spremljanja izražanja genov razlikovali med akutno mieloidno in akutno limfoblastno vrsto levkemije. Tako so sklepali, da je spremljanje izražanja genov pomembno pri patologiji tumorjev v smislu določitve celic izvora tumorjev, stopnje, gradusa, klinične obravnave in odzivnosti na terapijo (Golub in sod., 1999). V nadaljevanju so do podobnih zaključkov prišli tudi pri ostalih vrstah tumorjev. Na primer, s hierarhičnim klastiranjem podatkov cDNA mikromrež so na primeru difuznega velikoceličnega B celičnega limfoma odkrili dve molekularno različni podvrsti s signifikantno različno stopnjo preživetja (Alizadeh in sod., 2000). Vendar pa molekularno profiliranje tumorjev ni le iskanje vzorcev in razporejanje v skupine. Pomemben rezultat je lahko odkritje in potrditev genov, ki so funkcijsko pomembni za rast tumorjev, njihovo invazivnost in sposobnost zasevanja.

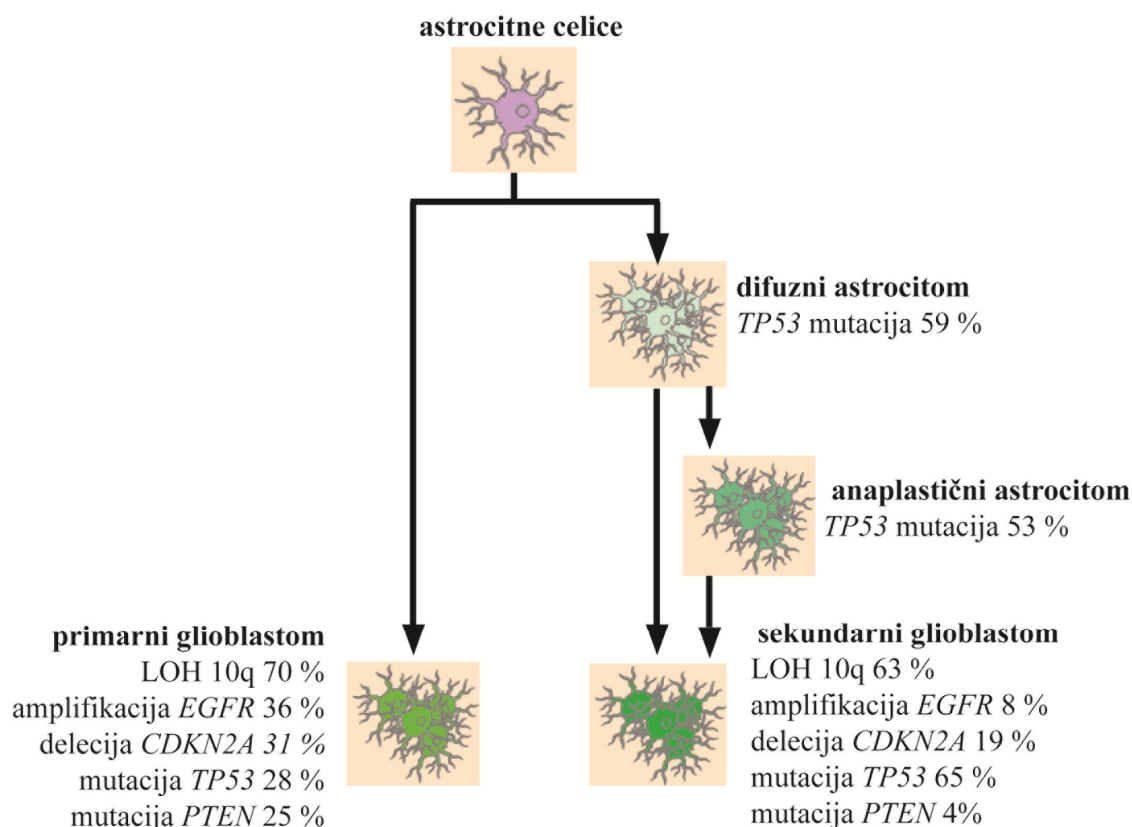
2.1.1.1 Uporaba DNA mikromrež v genetskih analizah raka glave in vratu

Do danes je bila objavljena vrsta študij, ki so za analizo genetskega ozadja maligne transformacije ter molekularnega profiliranja raka glave in vratu uporabili tehnologijo DNA mikromrež. Villaret in sod. so pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu (PKG) odkrili vrsto potencialnih biomarkerjev in terapevtskih tarč. Med drugim so določili 9 čezmerno izraženih genov v ploščatoceličnih karcinomih (PK) s primerjavo pripadajočih normalnih tkiv, od katerih štirje pred tem še niso bili povezani s PKGV (Villaret in sod., 2000). Alevizos in sod. so analizirali transkriptom PK na področju ustne votline ter našli okoli 600 kandidatnih genov: onkogenov, tumor supresorskih genov, transkripcijskih faktorjev, markerjev diferenciacije in metastaziranja ter ksenobiotičnih encimov, ki so bili različno izraženi v tumorskem tkivu (Alevizos in sod., 2001). Lu in sod. so uporabili tehnologijo mikromrež za določitev profilov izražanja genov med začetkom in razvojem PK požiralnika glede na pripadajoče histopatološko določene stopnje tumorjev (Lu in sod., 2001). Schmalbach in sod. so prikazali, da imajo primarni PK ustne votline in ustnega žrela s prizadetimi bezgavkami različne profile izražanja genov kot tumorji brez prizadetih bezgavk (Schmalbach in sod., 2004). Do podobnih predpostavk in rezultatov so prišli tudi avtorji ostalih študij (Chung in sod., 2004; Cromer in sod., 2004; O'Donnell in

sod., 2005). S profili izražanja genov lahko napovemo tudi v katero skupino N statusa pTNM sistema lahko uvrstimo posamezen tumorski vzorec. Roepman in sod. so vzpostavili napoved prizadetosti bezgavk na podlagi profila izražanja 102 genov, določenih z analizo 82 primarnih PK ustne votline in ustnega žrela (Roepman in sod., 2005). Naraščajoče število študij mikromrež je omogočilo združevanje rezultatov različnih analiz izražanja genov oz. metaanaliz. Metaanaliza s področja izražanja genov PKGV je bila objavljena s strani Choi in Chen, ki sta z analizo večih študij določila 84 spremenjeno izraženih genov. Produkti teh genov so med drugim matrične metaloproteinaze, integrini, kolageni, interleukin-6 in -8, fibronektin, katepsin L itd. Po analizi genske ontologije so avtorji zaključili, da so najbolj pogosto spremenjeno izraženi geni pri PKGV tisti, ki kodirajo proteine zunajceličnega matriksa, integralne membranske proteine ter proteine, ki sodelujejo pri razvoju in diferenciaciji epiderma (Choi in Chen, 2005).

2.1.1.2 Uporaba DNA mikromrež v genetskih analizah možganskih tumorjev

Z več kot 70 % zastopanostjo so gliomi najpogostejša vrsta primarnih tumorjev centralnega živčnega sistema. Po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) jih delimo v skupine astrocitomov, oligodendrogliomov, oligoastrocitomov in mešanih gliomov (Louis in sod., 2007). Med njimi so najpogostejši in najbolj maligni tumorji astrocitne diferenciacije – glioblastomi (GBM). Primarni glioblastomi nastanejo *de novo*, sekundarni pa preko prestopenj tumorjev astrocitne diferenciacije. Čeprav kažejo enake histopatološke značilnosti, so s pomočjo profiliranja spremenjenega izražanja genov z mikromrežami ugotovili, da do obeh podtipov vodijo različne genetske poti. Pri 59 % difuznih astrocitomih je bila ugotovljena mutacija v genu *TP53* ter 53 % pri anaplastičnih astrocitomih. Pri sekundarnih glioblastomih je prisotna izguba heterozigotnosti (LOH) regije 10q v 63 % primerih, amplifikacija gena receptorja za epidermalni rastni dejavnik (EGFR) v 8 %, delecija gena za od ciklina odvisni kinazni inhibitor 2A (*CDKN2A*) v 19 %, mutacija gena tumorskega proteina 53 (*TP53*) v 65 % ter mutacija gena homologa fosfataze in tenzina (*PTEN*) v 4 % primerih (Ohgaki in Kleihues, 2009). Pri primarnih glioblastomih je statistično značilno večji delež tumorjev z amplifikacijo *EGFR* (36 %) ter mutacijo *PTEN* (25 %) in nižji delež z mutacijo *TP53* (28 %). Najpomembnejše genetske spremembe, ki vodijo do primarnih in sekundarnih glioblastomov prikazuje slika 2.



Slika 2: Genetske poti, ki vodijo do primarnih in sekundarnih glioblastomov (Ohgaki in Kleihaus, 2007). Izguba heterozigotnosti (LOH) 10q je pogosta pri obeh podtipih. Mutacije *TP53* so zgodnji in pogost pojav, ki vodi do nastanka sekundarnih glioblastomov. Statistično značilne spremembe so prikazane z rdečo.

Figure 2: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma (Ohgaki and Kleihaus, 2007). Loss of heterozygosity (LOH) 10q is frequent in both primary and secondary glioblastomas. *TP53* mutations are early and frequent in the pathway leading to secondary glioblastomas. Significantly different alterations in frequency between primary and secondary glioblastomas are shown in red.

Značilnost skoraj vseh vrst gliomov je njihova visoka stopnja malignosti, katere lastnosti se razlikujejo glede na posamezni histološki tip tumorja. Zaradi heterogenosti tumorskega tkiva in težavne postavitve diagnoz le z uporabo morfoloških markerjev, je razvoj ustreznih molekularno-genetskih biomarkerjev nujen korak pri določitvi podtipov posameznih vrst gliomov, izbora zdravljenja ter napovedi odzivnosti na terapijo. V tem pogledu predstavlja analiza izražanja genov s pomočjo cDNA mikromrež primerno orodje, s katerim lahko določimo spremenjeno izražanje genov glede na različne poti diferenciacije in stopnje malignosti.

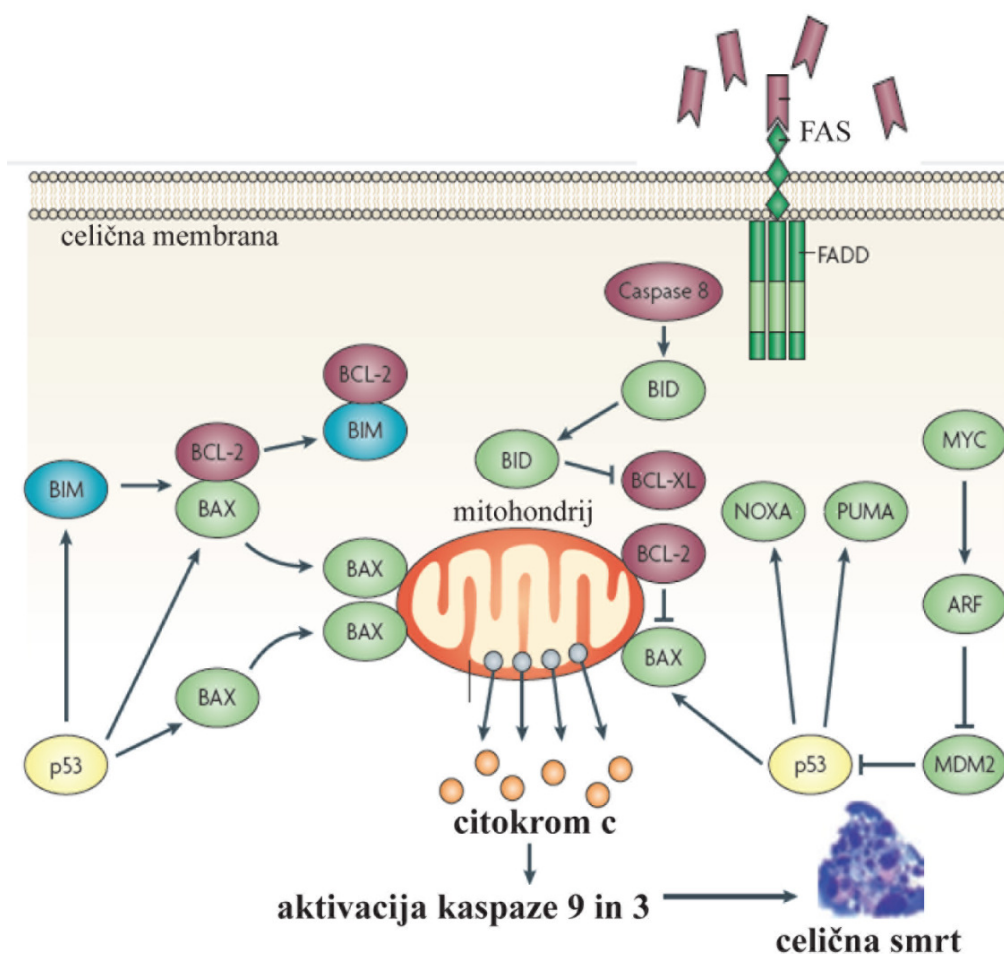
Najzgodnejše študije molekularnega profiliranja gliomov so vključevale primerjave izražanja genov med posameznimi morfološki skupinami tumorjev. S tovrstnimi primerjavami so odkrili spremenjeno izražene gene med astrocitomi nižjih in višjih stopenj (Rickman in sod., 2001), oligodendrogliomi višjih stopenj in GBM (Nutt in sod., 2003; Shirahata in sod., 2007), med primarnimi in sekundarnimi GBM (Godard in sod., 2003; Shai in sod., 2003) ter med skupinami morfološko različnih gliomov (Godard in sod., 2003; Shai in sod., 2003; van den Boom in sod., 2003). Z uporabo hierarhičnega združevanja spremenjeno izraženih genov se je izkazalo, da imajo različne skupine glialnih tumorjev različne profile izražanja genov, kar je potrdilo, da so morfološke razlike posameznih skupin posledica spremenjenega izražanja na mRNA nivoju. V študiji Shirata in sod. (2007) so identificirali 168 genov v spremenjenem izražanjem s primerjavo 32 GBM in anaplastičnih oligodendrogliomov ter pripravili diagnostični test, ki je temeljil na skupini 67 genov. Na ta način so lahko s 96,6 % verjetnostjo razlikovali med dvema vrstama gliomov z visoko stopnjo malignosti. V študiji Freije in sod. (2004) so analizirali 74 gliomov štirih različnih histoloških vrst in določili 595 diferenčno izraženih genov, katerih profil izražanja je sovpadal z napovedjo preživetja bolnikov. Prognostična vrednost te analize je bila potrjena na neodvisni skupini vzorcev v študiji Nutt in sod. (2003). Podobno listo genov pri napovedi preživetja so določili tudi v študiji Liang in sod. (2005), kjer so pokazali, da lahko glioblastome razdelimo v dve skupini glede na različen tip prognostičnih markerjev (različna napoved preživetja 2,1 oz. 0,3 leta). Z uporabo objavljenih podatkovnih setov cDNA mikromrež ter analizo 86 vzorcev GBM so Lee in sod. (2008) določili 377 spremenjenih genov, ki so nakazovali na 4 različne podtipe GBM. Prav tako so ugotovili, da je preživetje bolnikov v povezavi s starostjo močno povezano z različnimi molekularnimi profili (Lee in sod., 2008).

2.1.2 Spremenjeno izražanje genov apoptoze glede na različne histopatološke značilnosti ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu

PK predstavlja več kot 90 % vseh primerov raka glave in vratu, ki se pojavlja na različnih anatomskih lokacijah, najpogosteje v ustni votlini, ustnem delu žrela (lat. oropharynx), nosnem delu žrela (lat. nasopharynx) in grlu (lat. larynx) (Dobrossy, 2005). Trenutni sistem klasifikacije PKGV z namenom določitve stadija temelji na histopatološkem pTNM sistemu (angl. tumor-node-metastasis classification system), kjer najpomembnejši prognostični faktor predstavlja status prizadetosti področnih bezgavk oz. status N (Gold in Kim, 2009). Vendar pa sistem, ki temelji le na histopatološki sliki, predstavlja določene omejitve: predvsem je problematična določitev zajetosti področnih bezgavk, kar se običajno odraža v postavitvi lažno-negativnih diagnoz. To lahko povzroči odločitev o napačnem zdravljenju, zato se preventivno običajno odstrani bezgavke tudi pri bolnikih, kjer to ne bi bilo potrebno. Predvideva se, da le 23 % vseh bolnikov s PKGV prejme popolnoma ustrezno zdravljenje (Roepman in sod., 2005). Težavnost pa zagotovo predstavlja tudi dejstvo, da več kot 70 % vzrokov za razlike v preživetju bolnikov s PKGV še vedno ni pojasnenih (Choi in Chen, 2005). Analiza genetskega ozadja z uporabo genomskih tehnologij nam omogoča dopolnitev sistema klasifikacije pTNM, z namenom natančnejše določitve podtipov molekularno različnih PKGV tumorjev z določenim enakim pTNM statusom (Baatenburg de Jong in sod., 2001; Gold in Kim, 2009).

Apoptotična pot oz. pot programirane celične smrti je močno uravnavan in hkrati zapleten sistem velikega števila korakov. Gre za morfološke spremembe celic, in sicer se le-te razgradijo na manjše fragmente (apoptotska telesca) z aktivacijo družine proteinov znotrajceličnih cisteinskih proteaz kaspaz in so kasneje odstranjena s procesom fagocitoze. Aktivacija kaspaz se lahko doseže na več načinov. Najbolj raziskana je pot preko receptorjev dejavnikov tumorske nekroze (TNF), ki preko aktivacije kaspaz sprožijo signalni mehanizem apoptoze na površini celic (ekstrinzična oz. zunanja pot). Druga pot (intrinzična oz. notranja) je mitohondrijska, ki se začne s sprožanjem proteinov, ki aktivirajo kaspaze. Čeprav je delovanje obeh poti lahko ločeno in neodvisno, se njuni dejavniki pogosto prekrivajo in sprožajo enak mehanizem. Pri zunanji poti je prisotna mreža proteinskih interakcij, vključno z adaptorskimi proteini. Tak primer je protein, ki se veže na Fas in vsebuje domeno smrti (FADD). To ima za posledico aktivacijo kaspaze 8. V

primeru notranje poti sproščanje citokroma c iz mitohondrija povzroči aktivacijo kaspaz z vezavo na aktivacijski faktor 1 apoptotne proteaze (APAF1). Večina aktivatorjev kaspaz spada v družino proteinov BCL2, in sicer so to pro-apoptotični proteini BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA in BBC3 ter njihovi inhibitorji oz. anti-apoptotični proteini BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1 in A1 (Reed, 2000; Cotter, 2009). Poenostavljen mehanizem apoptoze je predstavljen na sliki 3.



Slika 3: Poenostavljen prikaz zunanje in notranje poti apoptoze (Cotter, 2009). Pri zunanji poti je kaspaza 8 aktivirana s proteinom, ki se veže na Fas in vsebuje domeno smrti (FADD). V notranji poti aktivacijo kaspaz sproži sproščanje citokroma c iz mitohondrija kot posledica delovanja proteinov družine BCL2.

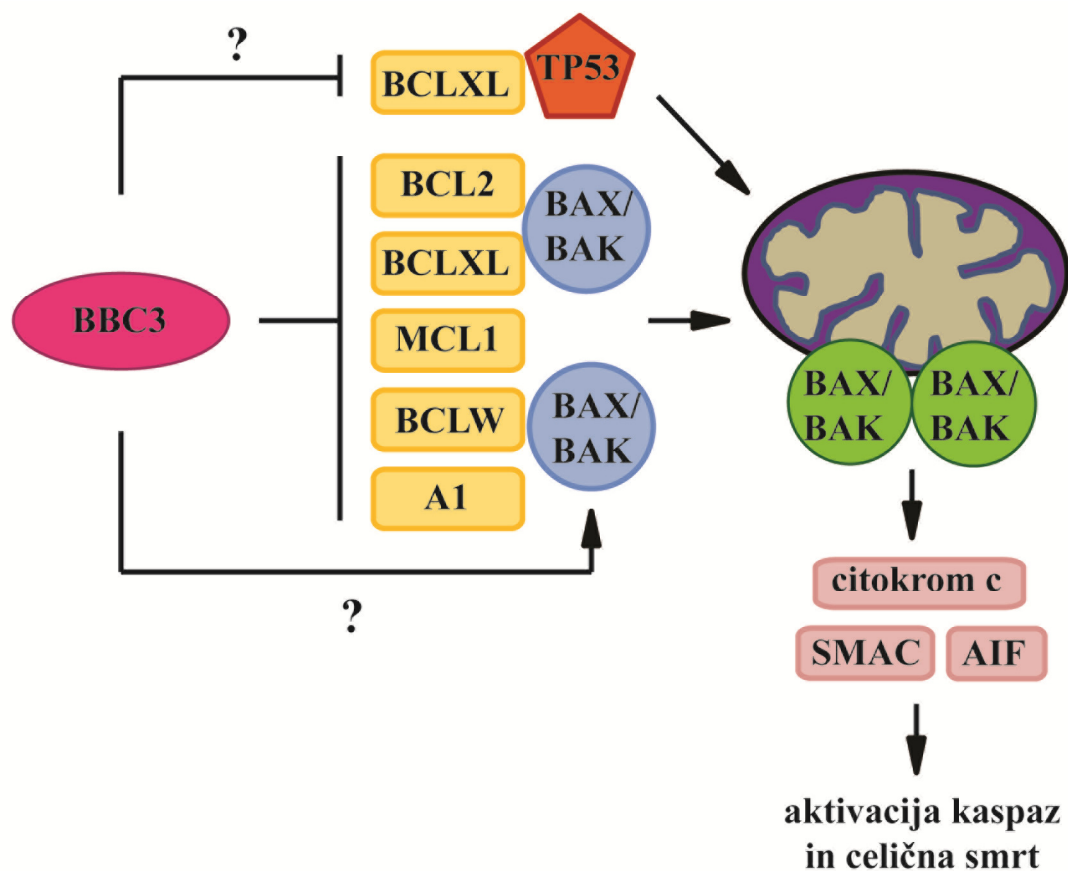
Figure 3: Simplified representation of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways (Cotter, 2009). During extrinsic pathway, caspase 8 is activated by Fas-associating protein with death domain (FADD). In intrinsic pathway caspases are activated by cytochrome c release from the mitochondria as a consequence of interaction network of BCL2 family proteins.

BBC3 (BCL2 vezavna komponenta 2, tudi znan kot PUMA) je eden izmed obetavnejših in nedavno odkritih potencialnih biomarkerjev in molekurno-terapevtskih tarč. Gre za protein družine BCL2, ki je uravnava proces apoptoze in za katerega je bilo pokazano, da lahko povzroči ustavitev rasti tumorjev (Yu in Zhang, 2008). Kljub temu, da je deregulacija apoptotičnih faktorjev povezana s pojavnostjo in razvojem rakavih obolenj (Reed, 2000), so profili izražanja *BBC3* zelo slabo raziskani na primarnih tumorskih vzorcih. Pred začetkom naše študije je bilo izražanje *BBC3* pri PKGV določeno le na celičnih linijah (Hoque in sod., 2003).

Mehanizem in vloga proteina BBC3 v patogenezi še vedno ni popolnoma pojasnjena. V procesu nastanka tumorjev je znano, da je vloga BBC3 predvsem v TP53-inducirani poti apoptoze, kjer TP53 deluje neposredno na BBC3 in tako sproži proces apoptoze. Vendar pa so dokazi, da lahko deluje tudi neodvisno od TP53 (Yu in Zhang, 2008). Model tega dvosmernega delovanja prikazuje slika 4. Pri rakavih obolenjih je *TP53* pogosto mutiran, kar ima za posledico tvorbo nedelujočega proteina (Vogelstein in Kinzler, 2004). V teh primerih delovanje BBC3 ne more biti sproženo po poti TP53. Za študije modela delovanja BBC3 oz. njegovega izražanja na genetskem in proteinskem nivoju je nujno hkratno določevanje izražanja TP53 in ostalih faktorjev apoptoze.

Kadar se BBC3 veže na ostale proteine družine BCL2, kot je npr. protein BCL2, se proces apoptoze začne preko mitohondrijske poti z aktivacijo proteina BAX. Posledica je nastanek heterodimera z BCL2, ki je aktivator apoptoze. To vodi v prepustnost mitohondrijske membrane in depolarizacije preko sproščanja mitohondrijskih apoptotičnih proteinov in aktivacijo kaspaz (Reed, 2000).

Predhodno še ni bilo objavljenih študij analize izražanja *BBC3* na biopsijskih vzorcih PKGV, prav tako analize z določenimi histopatološkimi parametri ter sočasnim izražanjem z ostalimi faktorji procesa apoptoze.



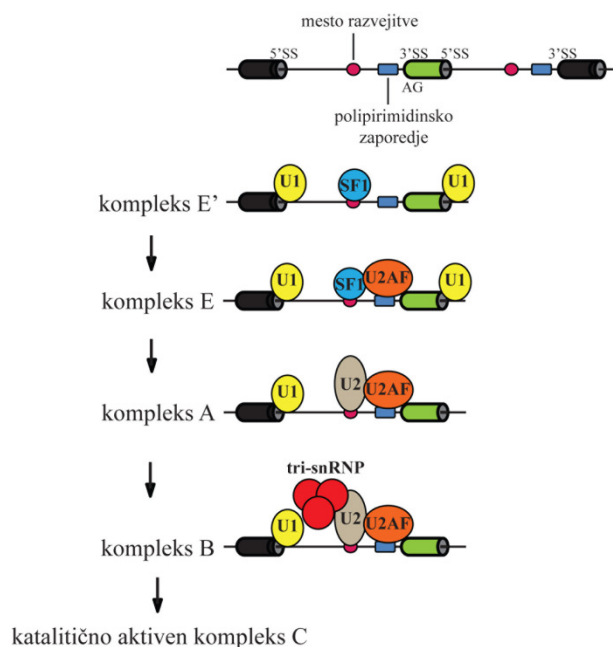
Slika 4: Model dvosmernega delovanja BBC3 v procesu apoptoze (Yu in Zhang, 2008). BBC3 aktivira kompleks BAX/BAK posredno z razbremenitvijo zaviranja antiapoptotičnih proteinov družine BCL2. To ima za posledico nepravilno delovanje mitohondrija in sproščanje proapoptotičnih proteinov: citokroma c, SMAC in inducirajočega faktorja apoptoze (AIF), kar vodi do aktivacije kaspaz in celične smrti. Alternativno pa lahko BBC3 deluje kot neposredni aktivator kompleksa BAX/BAK oz. citoplazmičnega TP53 (preko BCLXL), kar povzroči celično smrt preko mitohondrijske poti.

Figure 4: Schematic model of BBC3-mediated apoptosis (Yu and Zhang, 2008). BBC3 activates BAX/BAK indirectly by relieving the inhibition of all five antiapoptotic BCL2 family proteins. The consequence is mitochondria dysfunction and release of the mitochondrial proapoptotic proteins: cytochrome c, SMAC and apoptosis-inducing factor (AIF). This leads to activation of caspases and finally cell death. Under some conditions can BBC3 directly activates BAX/BAK or cytoplasmic TP53 by displacing it from BCLXL to promote cell death through the mitochondria.

2.2 REGULACIJA ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA

Izrezovanje intronov in spajanje eksonov je uravnava s proteinskim izrezovalno-povezovalnim kompleksom (angl. spliceosome). Sestavljen je iz U1, U2, U4/6 in U5 malih jedrnih RNP delcev (snRNP) in več sto ostalih proteinskih faktorjev (Wahl in sod., 2009). Delovanje izrezovalno-povezovalnega kompleksa je pomembno pri prepoznavi mest izrezovanja na pre-mRNA (Saltzman in sod., 2011).

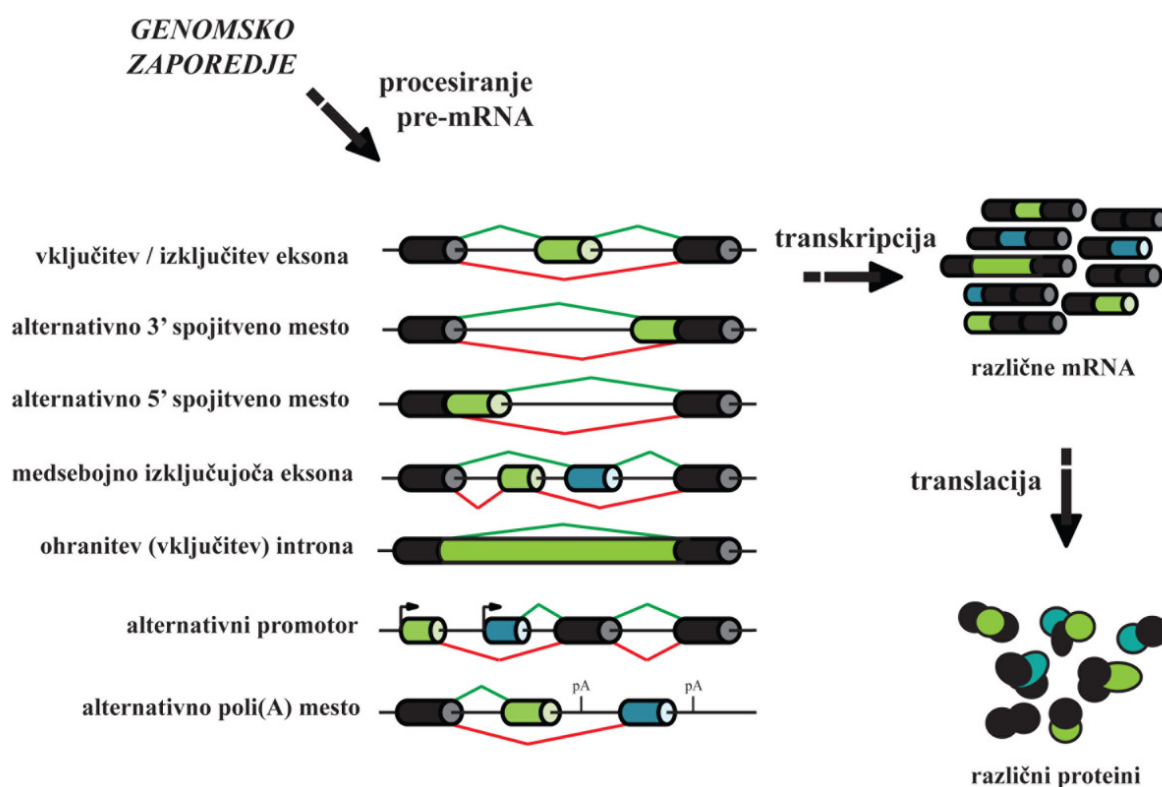
Reakcija procesiranja pre-mRNA s povezovalno-izrezovalnim kompleksom je sestavljena iz dveh delov (slika 5). Sklop izrezovalno-povezovalnega kompleksa se začne s prepoznavo 5' izrezovalnega mesta z snRNP U1 in vezavo faktorja izrezovanja 1 (SF1) na mesto razvejitve ter heterodimera U2 pomožnega faktorja (U2AF) na polipirimidinsko in 3' končno AG zaporedje (Berglund in sod., 1997; Nelson in Green, 1989; Zamore in Green, 1989). Ta sklop je neodvisen od prisotnosti adenozin trifosfata (ATP) in tvori E kompleks, ki se spremeni v ATP-odvisen izrezovalni kompleks A preko zamenjave faktorja SF1 z U2 snRNP na mestu razvejitve. Nadaljnji nabor U4/6-U5 snRNP-jev (tri-snRNP) vodi do tvorbe kompleksa B, ki se spremeni v katalitično aktiven kompleks C preko remodeliranja in konformacijskih sprememb (Chen in Manley, 2009).



Slika 5: Reakcija procesiranja pre-mRNA s povezovalno-izrezovalnim kompleksom (Chen in Manley, 2009).

Figure 5: Reaction of pre-mRNA processing with the spliceosome (Chen and Manley, 2009).

Odločitev, kateri ekson bo odstranjen in kateri vključen v zrelo mRNA, je odvisna od zaporedja pre-mRNA in regulatornih proteinov. Alternativno izrezovanje intronov (AI) je ključen proces izražanja genov, ki omogoča raznolikost proteinskih produktov. Alternativni ekson je lahko vključen ali izključen iz končnega prepisa genov, kar ima za posledico spremenjen protein (slika 6). Intronska zaporedja, ki so običajno izključena iz transkriptov, so zaradi spremenjenega AI lahko ohranjena oz. se zaporedje eksonov podaljša z uporabo alternativnih 3' ali 5' spojitvenih mest. Uporaba eksonov je lahko medsebojno izključujoča kar pomeni, da nastale mRNA vsebujejo le enega izmed več alternativnih eksonov. Iz istega gena nastanejo različne mRNA tudi zaradi alternativnih promotorjev, ki povzročijo začetek prepisovanja genov iz različnih mest ali pa zaradi uporabe različnih poliadenilacijskih mest (Cartegni in sod., 2002).



Slika 6: Shematski prikaz možnosti alternativnega izrezovanja (Cartegni in sod., 2002). Alternativni ekson je lahko vključen ali izključen iz mRNA, kar ima za posledico spremenjen protein. Predstavljene so različne možnosti uporabe alternativnih eksonov, začetnih mest prepisovanja genov oz. uporabe različnih poliadenilacijskih mest. Konstitutivni eksoni so označeni s črno, alternativni pa z zeleno in modro barvo.

Figure 6: Schematic representation of alternative splicing (Cartegni et al., 2002). Alternative exons can be included or excluded from the final mRNA, resulting in different proteins. Alternative exons can be used in different ways, including alternative transcription start-sites or polyadenylation. Constitutive exons are shown in black and alternative in green and blue colors.

Predpostavlja se, da več kot 95 % genov sestavljenih iz več eksonov preide alternativno izrezovanje (Wang in sod., 2008). Poleg omogočanja genetske raznolikosti spremenjeno uravnavanje AI lahko vodi do pojava različnih bolezenskih stanj. Kompleksno stanje RNA-proteinske mreže šele v zadnjih letih odkriva pomembnost pravilnega delovanja AI za vzdrževanje homeostaze celic (Chen in Manley, 2009).

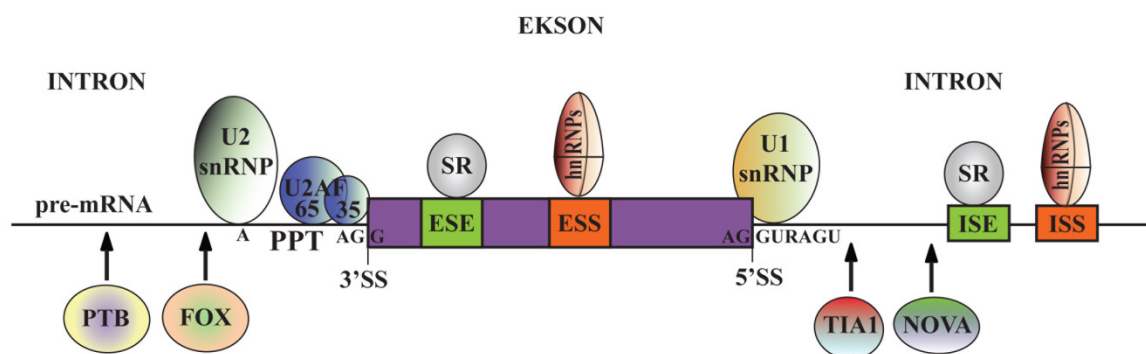
2.2.1 RNA-vezavni proteini in prepoznavanje zaporedij pre-mRNA

Pri izražanju genov in njegovi regulaciji imajo velik vpliv RNA-vezavni proteini. V času transkripcije v jedru celic nastajajo molekule mRNA v obliki pre-mRNA. Tam poteka serija reakcij in nato se mRNA prenesejo v citoplazmo, kjer poteka biosinteza proteinov in razgradnja mRNA. V vsaki fazi se na mRNA vežejo različni RNA-vezavni proteini, ki usmerjajo reakcije nastanka, delovanja in razgradnje. Primer RNA-vezavnih proteinov so heterogeni jedrni ribonukleoproteini (hnRNP) v fazi transkripcije in izrezovanja intronov (Wahl in sod., 2009). Raznolikost funkcij RNA-vezavnih proteinov sovpada z raznolikostjo struktur, ki so pomembne pri prepoznavi RNA zaporedij. Večina teh proteinov je sestavljena iz podobnih modulov oz. več kopij RNA-vezavnih domen ter encimskih domen, ki določajo njihovo katalitično aktivnost (Lunde in sod., 2007). Motiv, ki prepozna signal na pre-mRNA, se imenuje RNA-vezavni modul (ang. RNA-recognition motif, RRM). Običajno je RRM sestavljen iz 80-90 aminokislin, ki tvorijo štiriverižno antiparalelno beta ploskev, nasproti katere sta dve vijačnici (Oubridge in sod., 1994). Posamezen RRM lahko prepozna 4-8 nukleotidov. Specifičnost prepoznavanja zaporedij se poveča s prisotnostjo več kopij tovrstnih domen, kar omogoča prepoznavo daljših zaporedij (Auweter in sod., 2006; Maris in sod., 2005). Interakcije RNA-vezavnih domen posameznih proteinov omogočajo prepoznavo RNA zaporedij preko protein-RNA in protein-protein interakcij (Lunde in sod., 2007).

2.2.2 Regulacija AI z interakcijo RNA-vezavnih proteinov in cis-delujočih elementov pre-mRNA

Katero 3' in 5' izrezovalno mesto bo prepoznano z izrezovalno-povezovalnim kompleksom proteinov je močno povezano z zaporedjem pre-mRNA molekul. V tem procesu ima pomembno vlogo afiniteta izrezovalnih mest. Mesta, ki imajo večjo afiniteto do U1 in U2AF, so bolj učinkovito prepoznana z izrezovalno-povezovalnim kompleksom. Vendar

pa so si zaporedja izrezovalnih mest med seboj zelo podobna, tako da le zaporedje tukaj ne določa učinkovite regulacije sklopa izrezovalno-povezovalnega kompleksa. Prepoznavna in izbira izrezovalnih mest je v večini primerov določena z regulatornimi cis-elementi na pre-mRNA v bližini izrezovalnih mest (slika 7). To so t.i. cis-delujoča utiševalna in ojačevalna zaporedja, ki so prisotna tako v eksonih in intronih in lahko imajo pozitiven ali negativen vpliv na izbiro izrezovalnih mest (Cartegni in sod., 2002; Singh in Valcarcel, 2005). Cis-delujoči elementi delujejo večinoma kot vezavna mesta za trans-delujoče faktorje, ki privabijo podenote snRNP izrezovalnega aparata na bližnja mesta izrezovanja oz. v primeru negativne regulacije preprečijo njihovo vezavo. Ojačevalci spajanja eksonov se nahajajo v eksonih (angl. exonic splicing enhancers, ESE) in intronih (angl. intronic splicing enhancers, ISE) ter se običajno vežejo z SR proteini, medtem ko se na utiševalce (ESS in ISS) večinoma vežejo hnRNP proteini (Chen in Manley, 2009).



Slika 7: Vezava RNA-vezavnih proteinov na pre-mRNA (Keren in sod., 2010). Poleg vezavnih mest za faktorje izrezovalno-povezovalnega kompleksa (U2 snRNP, U2AF in U1 snRNP), eksoni in introni vsebujejo tudi vezavna mesta za proteine, ki uravnavajo proces izrezovanja intronov. Ojačevalci spajanja eksonov (ISE in ESE) se običajno vežejo z SR proteini, utiševalci (ESS in ISS) pa z hnRNP proteini. Izrezovalna mesta so označena kot 3'SS in 5'SS ter polipirimidinsko zaporedje kot PPT.

Figure 7: RNA-binding proteins bind to pre-mRNA (Keren et al., 2010). Pre-mRNA is bound by spliceosome factors (U2 snRNP, U2AF and U1 snRNP) and other splicing regulatory proteins that bind to enhancers (ESE and ISE) and silencers (ESS and ISS). Enhancers are usually bound by SR proteins and silencers by hnRNPs. Splice sites are marked as 3'SS and 5'SS and polypyrimidine tract as PPT.

Pomembno vlogo pri regulaciji AI predstavlja tudi inhibicija prepoznavne izrezovalnih mest. V primeru prisotnosti utiševalcev izrezovanja v bližini izrezovalnih mest ali v bližini ojačevalcev se prepoznavna lahko prepreči s steričnim oviranjem dostopa snRNP proteinov oz. pozitivnih regulatornih faktorjev. Npr. protein, ki se veže na polipirimidinsko zaporedje oz. PTB (ang. polypyrimidine-tract binding protein) z vezavo na polipirimidinsko

zaporedje prepreči vezavo U2AF in posledično povzroči negativno regulacijo AI (Sauliere in sod., 2006; Singh in sod., 1995; Spellman in Smith, 2006). Proteini družine Hu/ELAV preprečijo vezavo U1 snRNP preko kompeticije vezave citotoksičnih z granulami povezanimi RNA vezavnimi proteini (TIA1) na zaporedja navzdol od 5' izrezovalnega mesta eksona 23a pre-mRNA gena za nevrofibrin 1 oz. NF1 (Zhu in sod., 2008).

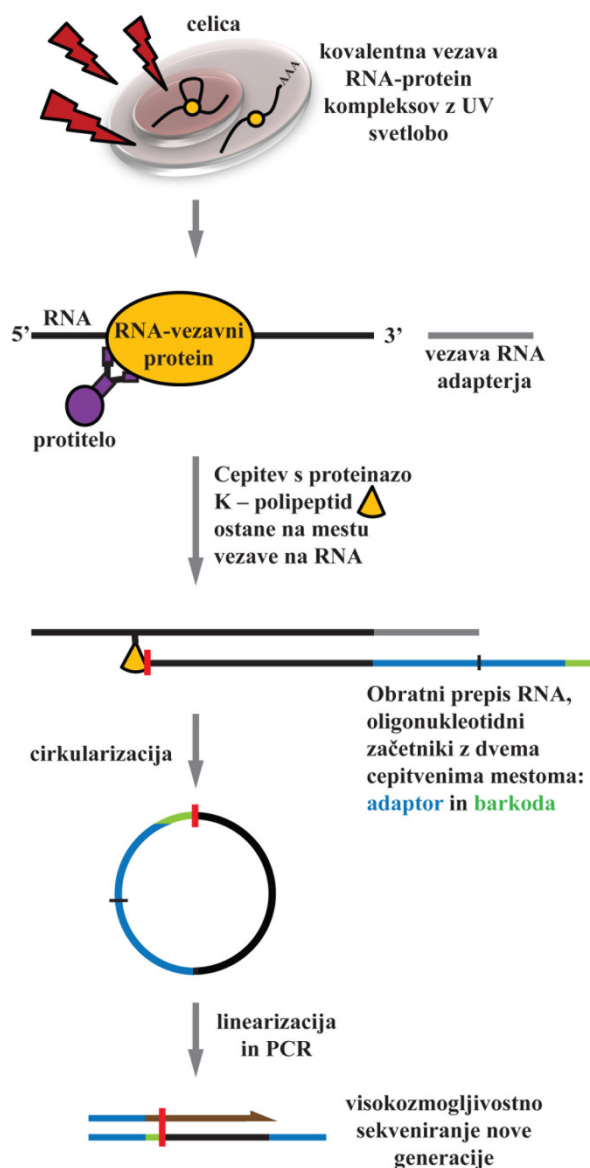
SR in hnRNP skupini proteinov imata nasprotujoče si funkcije pri regulaciji izbire mest izrezovanja, ki je rezultat delovanja več faktorjev s pozitivnimi in negativnimi učinki (slika 7). Le-ti končno določijo ali bo posamezno mesto prepoznano s strani izrezovalno-povezovalnega kompleksa in posledično ali bo ekson vključen v zreli mRNA (Black, 2003). Ta odločitev je pogosto posledica koncentracije ali aktivnosti posameznega tipa regulatorja, vendar pa je na tem mestu nujna sistematična analiza funkcij posameznih faktorjev in njihovih morebitnih antagonističnih vplivov na AI. Prav tako imajo lahko posamezni proteini različne funkcije (lahko tudi nasprotujoče si funkcije), odvisno od tega kje je mesto njihovo vezave relativno do reguliranega eksona. Več proteinov, med drugim NOVA1, NOVA2, FOX1, FOX2, hnRNP L, hnRNP F in hnRNP H lahko deluje kot aktivatorji ali represorji na različnih vezavnih mestih (Chen in Manley, 2009).

Tehnološki napredek, predvsem metode nove generacije sekveniranja, nam v zadnjih letih omogočajo raziskovanje interakcij med RNA in RNA-vezavnimi proteini na nivoju celotnega transkriptoma z namenom določitve vezavnih mest posameznih RNA-vezavnih proteinov, njihovih interakcij in sočasnega delovanja pri regulaciji AI. Mesta protein-RNA interakcij predstavljajo glavno vlogo pri regulaciji alternativnega izrezovanja. S tvorbo združenih profilov funkcij RNA-vezavnih proteinov na nivoju celotnega transkriptoma lahko raziščemo njihove vplive in odnose pri regulaciji AI (Witten in Ule, 2011).

2.2.3 Metoda navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja (iCLIP)

Metoda navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja (iCLIP) nam omogoča spremljanje vezave RNA-vezavnih proteinov na vezavna mesta pre-mRNA na nivoju celotnega transkriptoma z ločljivostjo posameznega nukleotida (König in sod., 2010). Tovrstna tehnologija se uporablja za natančno določitev mest interakcije med proteini in RNA v celicah. Podatke o vezavnih mestih lahko funkcijsko nadgradimo z uporabo določanja nukleotidnega zaporedja celotnega transkriptoma (RNA-seq). Z ustreznim načrtovanjem eksperimentov lahko vplivamo na fiziološko stanje celic z zmanjšanjem izražanja RNA-vezavnega proteina in spremljamo lastnosti njegovega delovanja. V primeru analize AI določamo, kakšen vpliv ima vezava proteina na uporabo določenega dela pre-mRNA v končnem prepisu gena (Zarnack in sod., 2013).

iCLIP je bil predstavljen s strani König in sod. (2010), ki so razvili metodo na primeru proteina hnRNP C. Ta protein je eden izmed najbolj zastopanih proteinov v jedrih celic in njegova funkcija pri uravnavanju procesiranja še ni povsem pojasnjena. Nadgradnja metode CLIP (Ule in sod., 2003) je omogočila določitev mest vezave hnRNP C z ločljivostjo posameznega nukleotida (iCLIP). Na kratko, HeLa celice se izpostavijo UV svetlobi tako, da poteče kovalentna vezava proteinov na RNA. Nato se lizat celic HeLa izpostavi protitelesu za izbran protein (npr. hnRNP C) z namenom selekcije RNA-protein kompleksov, ki so vezani z izbranim proteinom. Po delni razgradnji RNA se izvede vezava RNA adaptorjev ter nato razgradnja s proteinazo K do stopnje, ko na mestu vezave ostane le še majhen del polipeptida. Sledi obratni prepis RNA z DNA oligonukleotidnimi začetniki, ki vsebujejo prepoznavno zaporedje oz. barkodo, preko katere lahko v kasnejših stopnjah izločimo PCR duplikate, cirkularizacija, linearizacija ter visokozmogljivostno sekveniranje (slika 8). Z mapiranjem na referenčni genom določimo vezavna mesta posameznih RNA-vezavnih proteinov z ločljivostjo enega nukleotida (König in sod., 2010).



Slika 8: Shematska predstavitev metode iCLIP (König in sod., 2010). Celice se izpostavijo UV svetlobi z namenom kovalentne vezave proteinov in RNA. Nadalje se izvede selekcija RNA-protein kompleksov z imunoprecipitacijo RNA-vezavnih proteinov s specifičnimi protitelesi. Na selekcionirano RNA vežemo adaptor na 3' konec ter izvedemo delno razgradnjo proteina s proteinazo K do stopnje, ko na mestu vezave ostane le še majhen del polipeptida. Izvedemo obratni prepis RNA z oligonukleotidnimi začetniki s cepitvenimi mesti in barkodami, ki se predčasno konča na mestu ostanka vezanega proteina. Zadnji dodan nukleotid je prikazan z rdečo označbo. Tako pridobljene cDNA molekule cirkulariziramo in nato lineariziramo na mestu cepitve oligonukleotidnega začetnika, pomnožimo z metodo PCR ter izvedemo visokozmogljivostno sekveniranje nove generacije.

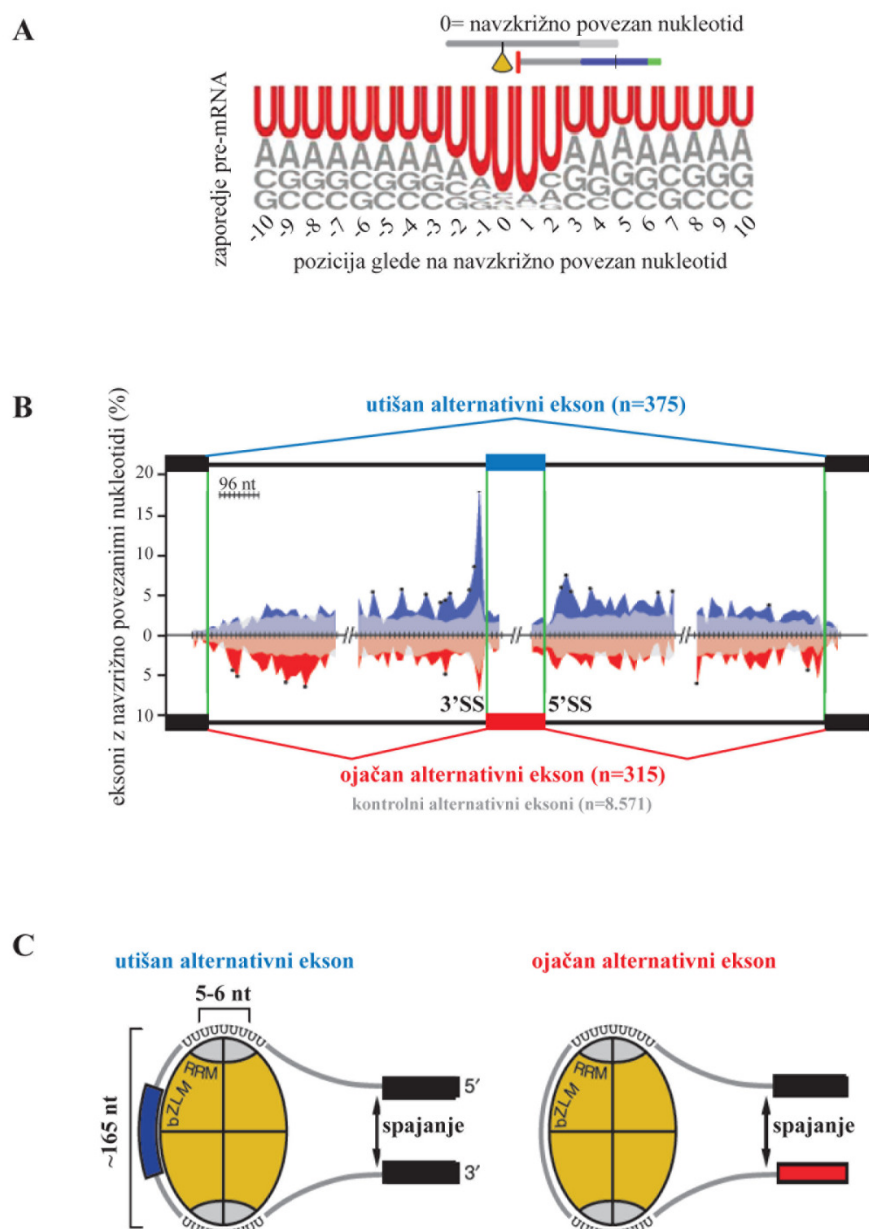
Figure 8: Schematic representation of the iCLIP protocol (König et al., 2010). After UV irradiation, the RNA and RNA-binding proteins (RBPs) are covalently linked. Next, cross-linked RNAs are co-immunoprecipitated with RBP-specific antibody and ligated to an RNA adapter at the 3' end. After the protease digestion, proteinase K leaves a covalently bound polypeptide fragment on the RNA that causes premature truncation of reverse transcription (RT) at the cross-link site. The red bar indicates the last nucleotide added during reverse transcription. Resulting cDNA molecules are circularized, linearized using cleavage sites from the RT primers, PCR-amplified and subjected to high-throughput sequencing.

2.2.4 Določitev vezavnih mest hnRNP C na pre-mRNA

Za protein hnRNP C je bilo z metodo iCLIP v študiji König in sod. (2010) ugotovljeno, da se le-ta veže na uridinska zaporedja pre-mRNA in ima pomembno vlogo pri regulaciji nastajajočih transkriptov, saj je bila opažena njegova vezava na 55 % vseh protein-kodirajočih genov. Uridini so predstavljali kar 85 % vseh navzkrižno povezanih nukleotidov, kar je pojasnilo visoko specifičnost vezave hnRNP C na uridinska zaporedja. Sosednja mesta so bila prav tako v veliki meri obogatena z uridini. Več kot 65 % vseh navzkrižno povezanih nukleotidov je pripadalo zaporedjem z več kot 4 zaporednimi uridini (slika 9 (A)). Afiniteta vezave hnRNP C se večja z naraščajočim številom zaporednih uridinov. Natančno mesto vezave hnRNP C je določeno na tretjem uridinu navzgor od 3' konca eksona. Poleg tega je bila določena pri zaporedjih daljših od 9 uridinov močna vezava tudi 5-6 nukleotidov navzgor od prvega vezavnega mesta, kar je potrdilo model vezave tetramera hnRNP C na pre-mRNA z dvema RNA-prepoznavnima moduloma oz. domenama RRM (König in sod., 2010).

Poleg določitve dvojne vezave znotraj istega uridinskega zaporedja je bila določena tudi korelacija med bližnjimi uridinskimi zaporedji. Ugotovljeno je bilo, da se vezava hnRNP C pojavlja v intervalih razdalj 165 in 300 nukleotidov, kar je v skladu z modelom vključitve nastajajoče RNA v hnRNP delce pri procesiranju pre-mRNA (König in sod., 2010).

S kombinacijo podatkov ekson-specifičnih mikromrež in določene vezave hnRNP C z metodo iCLIP na pre-mRNA je bilo pokazano, da vezava hnRNP C vpliva tako na utišanje kot na ojačitev uporabe alternativnih eksonov (slika 9 (B)). V primeru utišanih alternativnih eksonov je pojavnost navzkrižno povezanih nukleotidov z hnRNP C močno povečana okoli izrezovalnih mest. Navzgor od 3' izrezovalnih mestih se večinoma veže na polipirimidinska zaporedja in tako, podobno kot protein PTB, povzroča utišanje alternativnega eksona. V primeru ojačanih alternativnih eksonov je vezava določena po dolžini celotnih intronov brez močnega povečanja okoli izrezovalnih mest. To nakazuje, da vezava hnRNP C v pripadajočih intronskih zaporedjih povzroča ojačitev uporabe eksona (slika 9 (C)). Predlagani model delovanja tetramera hnRNP C tako določa funkcijo utišanja alternativnih eksonov z vključitvijo regije alternativnega eksona v hnRNP C delce ter ojačitev, kadar so vključene regije navzgor od alternativnega eksona (König in sod., 2010).



Slika 9: hnRNP C uravnava izražanje alternativnih eksonov z vezavo na uridinska zaporedja (König in sod., 2010). A) Zastopanost navzkrižno povezanih nukleotidov z hnRNP C in zaporedja baz okoli določenih vezavnih mest. B) Mesta navzkrižno povezanih nukleotidov okoli utišanih in ojačanih alternativnih eksonov. Prikazan je delež eksonov, ki vsebujejo vsaj en navzkrižno povezan nukleotid. Utišani eksoni so predstavljeni z modro, ojačani z rdečo in kontrolni eksoni s sivo barvo. Svetlejše nianse prikazujejo prekrivajoče se regije. Utišani alternativni eksoni so vezani z hnRNP C okoli 3' in 5' izrezovalnih mest (3' SS in 5' SS). C) Model vezave tetramera hnRNP C pri uravnavanju izražanja ojačanih in utišanih alternativnih eksonov.

Figure 9: hnRNP C regulates alternative splicing with binding to uridine tracts (König et al., 2010). A) Base frequencies of cross-link nucleotides and 20 nucleotides of surrounding genomic sequence. B) RNA map of cross-link sites within silenced and enhanced alternative exons. Shown is percentage of exons that have at least one cross-link nucleotide within a given window. Silenced exons are shown in blue, enhanced in red and control exons in gray color. Ligher shades of blue and red represent regions of overlap. Silenced alternative exons show strong enrichment of cross-link nucleotides proximal to 3' and 5' splice sites (3' SS and 5' SS). C) A model of hnRNP C tetramer binding at silenced and enhanced alternative exons.

2.3 VPLIV POLIMORFIZMOV NA REGULACIJO AI IN NASTANEK BOLEZENSKIH STANJ

Cis- in trans-delujoče mutacije, ki vplivajo na izrezovanje intronov, bodisi v smislu pravilnega delovanja izrezovalno-povezovalnega kompleksa ali pa regulacije AI, imajo pomembno vlogo v različnih bolezenskih stanjih. Lahko so direktno odgovorne za nastanek bolezni, pripomorejo k njeni težavnosti ali pa povzročijo večjo dovzetnost za razvoj obolenja (Wang in Cooper, 2007). Velik del mutacij v kodirajočih regijah povzroča bolezni zaradi spremenjenega zaporedja izrezovalnih mest in ne samo zaradi sprememb odprtega bralnega okvirja. Običajno mutacije v cis orientaciji povzročijo napačno izražanje posameznih genov, mutacije v trans orientaciji pa delujejo na izražanje več genov (Wang in Cooper, 2007). Cis-delujoče mutacije lahko prekinejo normalni mehanizem AI s tvorbo lažnih oz. kriptičnih izrezovalnih mest ali s spremenjeno sekundarno strukturo RNA (Hu in sod., 2001). Predpostavlja se, da ima približno 50 % vseh patoloških mutacij vpliv na izrezovanje intronov (Krawczak in sod., 1992). Trans-delujoče mutacije so posledice sprememb v zaporedjih proteinov izrezovalno-povezovalnega kompleksa. Spinalna mišična atrofija (SMA) in retinitis pigmentosa sta primera bolezni, ki sta posledica mutacij v genih, pomembnih pri sklopu in funkciji snRNP (Briese in sod., 2005; Mordes in sod., 2006). SMA je primer avtosomne recesivne bolezni, ki prizadene motorične nevrone zaradi nepravilnega proteina preživetja motoričnega nevrona 1 (SMN1), ki je potreben za sklop snRNP faktorjev v citoplazmi pred vstopom v celično jedro (Briese in sod., 2005). Retinitis pigmentosa je primer pogoste genetske bolezni, ki se običajno razvije v slepoto in je lahko avtosomno dominantno, recesivno ali na kromosom X vezano obolenje. Poznani so trije dominantni geni, ki so homologi faktorjem procesiranja pre-mRNA, in sicer gre za *PRPF31*, *PRPF8* in *HRP3*, ki kodirajo proteine pomembne za pravilen sklop in funkcijo U4-U5-U6 snRNP, osnovne komponente izrezovalno-povezovalnega kompleksa (Chakarova in sod., 2002; McKie in sod., 2001; Vithana in sod., 2001).

Pravi obseg vpliva polimorfizmov AI na pojav bolezni se bo pokazal v naslednjih letih, ko bomo z računalniškimi orodji lahko podrobneje analizirali podatkovne zbirke mutacij in podatkov, pridobljenih z novo generacijo sekveniranja. To bo omogočilo rutinsko uporabo pridobljenega znanja v smislu postavitve boljših diagnoz, izbire načina zdravljenja ter natančnejše razumevanje mehanizmov različnih patoloških stanj (Pagani in Baralle, 2004).

2.3.1 Deregulacija AI pri raku

Spremembe v izrezovanju intronov so pogoste pri rakavih obolenjih. Njihova posledica so večinoma spremembe v izražanju genov, ki vodijo do spremenjene migracije in rasti celic, odzivnosti na hormone, apoptoze in različne odzivnosti na kemoterapijo. Cis-delujoče mutacije imajo vpliv na AI onkogenov, tumor supresorskih genov in ostalih mediatorjev onkogeneze. Običajno uravnavajo proces prepoznavne eksonov ali pa tvorijo nova donorska ali akceptorska mesta, ki spremenijo običajen proces izrezovanja (Wang in Cooper, 2007). Primer je tumor supresorski gen *TP53*, eden izmed pomembnejših genov pri razvoju raka, katerega različne spojivne oblike določajo njegove različne funkcije v karcinogenezi (Mills, 2005). Pomemben vpliv sinonimnih mutacij se je prav tako pokazal na primeru *TP53*, kjer tovrstne spremembe vplivajo na izrezovanje preko tvorbe novih izrezovalnih mest v kodirajočih regijah (Lamolle in sod., 2006). Prav tako imajo mutacije v izrezovalnih mestih velik vpliv pri razvoju oz. dovzetnosti za raka jajčnikov ter pri raku dojke, kjer so določeni genetski markerji prisotni v genu dovzetnosti za raka dojke 1 oz. *BRCA1*. Pokazano je bilo, da mutacija v eksonu 18 prepreči pravilno delovanje ESE elementa, ki je vezavno mesto SR proteina SF2/ASF, kar ima za posledico izključitev eksona iz zrele mRNA (Mazoyer in sod., 1998). Z računalniško analizo je bilo določenih 23 ohranjenih ESE zaporedij v 22 eksonih *BRCA1* in v kar 60 % so bile ugotovljene nukleotidne spremembe prisotne v vzorcih raka dojke (Pettigrew in sod., 2005). Podobna odkritja so bila objavljena za mnoge ostale gene, povezane s pojavom raka, in sicer *BRCA2*, *FHIT*, *KIT*, *MLH1*, *MDM2*, *MSH2* in *LKB1* (Bartel in sod., 2002; Fackenthal in sod., 2002; Hastings in sod., 2005; Lee in sod., 2002; Sjoblom in sod., 2006; Venables in Burn, 2006). Prav tako je bilo pokazano, da je posledica mutacij v genu adenomatozne polipoze črevesa oz. *APC* razvoj družinske adenomatozne polipoze, kjer dodatna vključitev le enega T med drugim in tretjim mestom introna 4 povzroča izključitev eksona 4 in tako izražanje skrajšanega proteina (Neklason in sod., 2004).

Večji vpliv v karcinogenezi se pripisuje trans-delujočim faktorjem oz. proteinom SR in hnRNP, ki kontrolirajo več stopenj izražanja genov, med katerimi je tudi AI (Huang in Steitz, 2005). Povečano izražanje in spremembe v fosforilaciji SR proteinov je bilo ugotovljeno pri različnih vrstah raka (Ghigna in sod., 2005; Karni in sod., 2007). V nasprotju so pri raku jajčnika identificirali znižano izražanje RNA-vezavnega proteina

FOX2, prav tako je bilo njegovo izražanje moteno pri raku dojke. Njegova spremenjena vezava ima za posledico izključitev več eksonov v rakavih tkivih (Venables in sod., 2009). Izražanje faktorjev izrezovanja na mRNA nivoju je spremenjeno tudi pri raku ledvic, kjer so ugotovili, da je pri vsaj 50 % tumorskih vzorcev v primerjavi s pripadajočimi normalnimi tkivi spremenjeno izražanje SR proteinov SF2/ASF, SC35, Sp20, SRp75, SRp40, SRp55 in 9G8 ter hnRNP A1 z antagonistično funkcijo (Piekielko-Witkowska in sod., 2010). Pri možganskih tumorjih z astrocitno diferenciacijo je bilo ugotovljeno spremenjeno izražanje hnRNP proteina PTB, in sicer je bilo v nasprotju z normalnimi astrociti, kjer so prisotne majhne količine PTB, njegovo izražanje bistveno zvišano. Povečano izražanje PTB je sovpadalo z naraščajočo stopnjo malignosti. Ponovna aktivacija PTB je tako zgodnji dogodek pri tvorbi glijalnih tumorjev (Cheung in sod., 2006).

AI ima pomembno vlogo pri regulaciji mehanizma apoptoze - osnovnega procesa pri razvoju in vzdrževanju celične homeostaze v večceličnih organizmih. BCLX je protein iz družine BCL2, ki uravnava proces apoptoze (Boise in sod., 1993). Izraža se v dveh izoformah, in sicer kot BCLXL in BCLXS, ki nastaneta zaradi različne uporabe 5' izrezovalnega mesta v eksonu 2. Anti-apoptotičen BCLXL tvori heterodimere z različnimi proteini, vključno z BAX, BAK in BCL2 in tako preprečuje pojav apoptoze (Sedlak in sod., 1995). Nasprotno pa protein BCLXS promovira apoptozo. Razlike v AI imajo v tem primeru ogromen vpliv na preživetveno sposobnost rakavih celic in njihov odziv na proapoptotične terapije. Izbira 5' izrezovalnega mesta je odvisna od aktivnosti več faktorjev izrezovanja, med drugim SAM68, SF2/ASF, HNRNP F/H in SAP155 (Ghigna in sod., 2008). Povečano izražanje SAM68 promovira nastanek pro-apoptotične oblike BCLXS, med tem ko ima njegova fosforilacija obraten vpliv (Paronetto in sod., 2007). Razmerje alternativnih spojitvenih izooblik BCLX določa občutljivost celic na različne apoptotične dejavnike in ima vpliv na odzivnost in rezistenco na kemoterapevtike. Na primer, zdravilo ceramid povzroča povečano izražanje BCLXS preko regulatornega elementa v eksonu 2, kamor se veže SAP155 (Massiello in sod., 2006).

Ker je vloga regulatorjev alternativnega izrezovanja ter njihovega patološkega delovanja na ravni celotnega transkriptoma še vedno večinoma nepojasnjena, se z uporabo podatkov nove generacije sekveniranja približujemo razumevanju mehanizma, ki pa zahteva dodatne funkcijske analize in eksperimentalne potrditve.

2.3.2 Določanje vpliva polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo AI s sistemom reporterskih minigenov

Pri raziskavah uravnavanja izrezovanja intronov se običajno uporablja sistem reporterskih minigenov. To orodje je primerno za določanje vpliva patoloških nukleotidnih sprememb, ki vplivajo na AI, za analizo delovanja RNA-vezavnih proteinov in odziva alternativnih eksonov ter pripadajočih intronskih zaporedij na različno izražanje regulatorjev izrezovanja, s čimer določimo genomske regije, ki so potrebne za njihovo uspešno delovanje (Singh in Cooper, 2006). Sistem minigenov se delno že uporablja za določitev nepoznatih zaporedij neposredno iz bolnikove DNA, med drugim za primere genov v povezavi s sindromom Lynch *MLH1* in *MLH2* ter dedne oblike raka dojke oz. jajčnikov, *BRCA1* in *BRCA2* (Gaildrat in sod., 2010). Po kloniranju genomske regije v ekspresijski vektor se izvede transfekcija minigenov v celične linije ter primerja profil izražanja spremenjenega alela z izražanjem kontrolnega zaporedja. Analizirane genomske regije običajno vsebujejo zaporedja 2 konstitutivnih eksonov, intronske regije ter uravnavan alternativni ekson.

Primer analize uravnavanja AI s spremenjeno vezavo RNA-vezavnih proteinov z namenom določitve funkcije delovanja proteinov je raziskava Wang in sod. (2010), kjer so z analizo reporterskih minigenov določili, da TIA proteini (*TIA1* in *TIAL1*) regulirajo AI z vezavo na pre-mRNA navzdol od 5' izrezovalnega mesta. Ta vezava povzroči povečano vključitev bližnjega alternativnega eksona in utišanje oddaljenega alternativnega eksona. Avtorji so ugotovitve prikazali z uporabo reporterskega minigena, ki je vseboval ekson 5 ter sosednje introne in eksone *OGT* pre-mRNA. V tej genomski regiji, je bilo s podatki iCLIP določeno mesto vezave TIA proteinov navzdol od 5' izrezovalnega mesta. Povečano izražanje *TIA1* ali *TIAL1* je povečalo delež vključitev eksona 5 v zrelo mRNA, nasprotno kot znižano izražanje TIA proteinov. Nadalje je bilo vezavno mesto s postopki mutageneze tarčno spremenjeno tako, da je bilo vezavno zaporedje zamenjano z zaporedjem, pri katerem ni prisotnega signala vezave TIA proteinov. V tem primeru je bilo AI eksona 5 neodzivno na spremenjeno izražanje TIA proteinov, kar je potrdilo da TIA proteini regulirajo povečano vključitev bližnjih alternativnih eksonov, kadar se vežejo navzdol od 5' izrezovalnih mest (Wang in sod., 2010).

2.4 EKSONIZACIJA ELEMENTOV ALU

Elementi Alu so najbolj zastopana ponovljiva zaporedja v človeškem genomu. Z več kot milijon kopijami predstavljajo približno 10 % celotnega genomskega zaporedja. Kot ostala ponovljiva zaporedja, so tudi elementi Alu dolgo veljali za odvečno DNA brez velikega vpliva na stabilnost genoma in njegovo izražanje. Danes je znano, da je njihova funkcija zelo pomembna, tako v evolucijskem smislu kot pri zagotavljanju ustreznega fiziološkega stanja celic. Dolžina dimerne strukture elementov Alu je približno 300 bp, in sicer so sestavljeni iz dveh med seboj podobnih monomernih enot – leve in desne roke, ki sta združeni z A-linkerjem (Hasler in sod., 2007). Pojavili so se pred več kot 55 milijoni let iz *7SL RNA* gena, ne kodirajo proteinov in so se s procesom retrotranspozicije namnožili v času evolucije primatov (Quentin, 1992). Znano je, da imajo ogromen vpliv na zgradbo genoma z omogočanjem raznolikosti proteinov ter uravnavanjem izražanja genov. V genomu se pojavljajo v obeh orientacijah, proces eksonizacije pa v večini primerov preidejo glede na usmerjenost gena obratnosmerni elementi Alu (Hasler in sod., 2007).

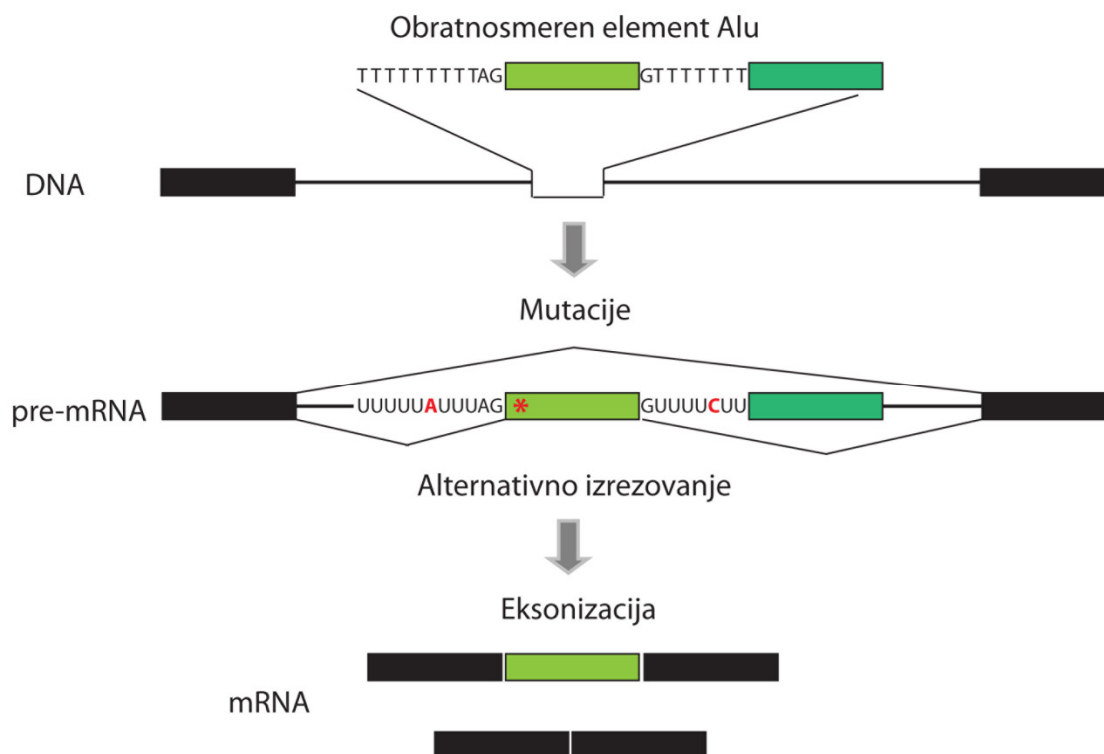
2.4.1 Elementi Alu v intronih in alternativno izrezovanje

S procesom mutageneze se v genomskem zaporedju spreminjajo regulatorna mesta, ki lahko tvorijo nova oz. povzročijo uporabo že obstoječih izrezovalnih mest. To ima za posledico, da del intronskega zaporedja postane ekson in se tako vključi v zrele mRNA transkripte. Ta proces imenujemo eksonizacija. Elementi Alu predstavljajo idealen vir novih eksonov, saj njihovo referenčno zaporedje vsebuje 9 potencialnih 5' izrezovalnih mest in 14 potencialnih 3' izrezovalnih mest (Makalowski in sod., 1994; Sorek in sod., 2002). Ugotovljeno je bilo, da več kot 5 % vseh alternativnih eksonov v transkriptomu človeka izhaja iz elementov Alu (Sorek in sod., 2002).

Proces eksonizacije elementov Alu se začne z mutacijami v izrezovalnih ali regulatornih mestih, ki lahko alternativna izrezovalna mesta spremenijo v konstitutivna (Lev-Maor in sod., 2003; Sorek in sod., 2004a). Večina eksonizacije elementov Alu poteče z obratnosmernimi elementi Alu (slika 10), kjer se poliadeniliran konec elementov po obratni vstavitvi spremeni v močno polipirimidinsko zaporedje, navzdol od katerega je prepoznano 3' izrezovalno mesto ter še nižje 5' izrezovalno mesto (Keren in sod., 2010). Večja pogostost eksonizacije v obratnosmerni orientaciji je posledica večjega števila

potencialnih izrezovalnih mest. Eksonizacijo lahko sprožijo tudi mutacije v ojačevalnih oz. utiševalnih regulatornih zaporedjih (Lei in sod., 2005; Lei in Vorechovsky, 2005).

Večinoma imajo posledice vključitve eksona znotraj kodirajočih regij negativen rezultat, saj vključitev eksona v večini primerov povzroči zamik odprtega bralnega okvira ali pa prezgodnji pojav zaključnega kodona (Sorek in sod., 2004b). Vseeno pa obstoj eksonizacije omogoča alternativno izrezovanje. Običajno se novo nastali eksoni vključijo v zrele transkripte v zelo nizkih količinah, kar pomeni da ostane prvotni transkript skoraj intakten, nov ekson pa preide skozi preverjanje ali je njegova vključitev negativna ali pa prinaša transkriptu oz. kasnejšemu proteinskemu produktu nove pozitivne funkcije (Sorek in sod., 2002). Ker pa je znano, da eksonizacija elementov Alu lahko sproži razvoj bolezni, je nujen selektivni pritisk, ki prepreči pojav konstitutivnih Alu eksonov (Kreahling in Graveley, 2004).

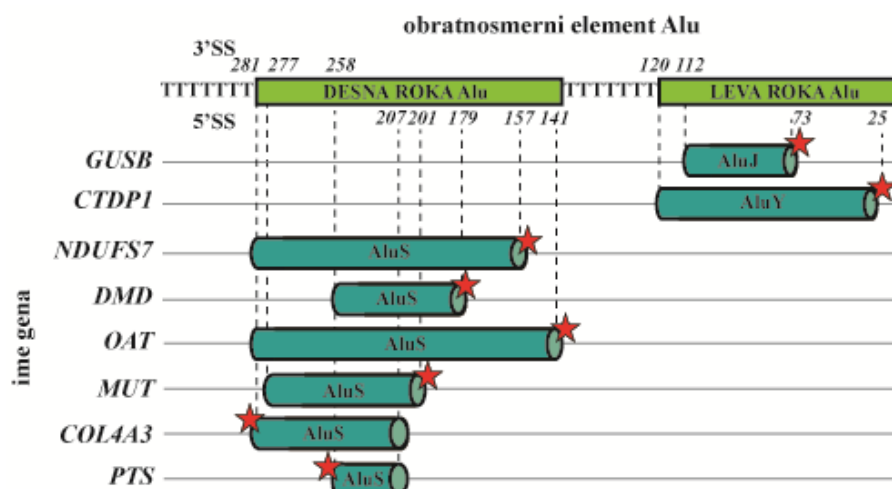


Slika 10: Proces eksonizacije obratnosmernih elementov Alu (Keren in sod., 2010). Mutacije v regulatornih elementih pre-mRNA vplivajo na proces alternativnega izrezovanja in povzročijo vključitev elementa Alu v zrelo mRNA.

Figure 10: Exonization of antisense Alu elements (Keren et al., 2010). Mutations in regulatory elements of pre-mRNA influence on alternative splicing regulation. This results in inclusion of Alu element in mature mRNA.

2.4.2 Negativne posledice eksonizacije elementov Alu: vpliv na nastanek bolezni

Prvi dokaz, da Alu eksonizacija lahko privede do bolezni, je znan že več kot 2 desetletji, ko je bilo ugotovljeno, da točkovna mutacija, ki povzroči nastanek novega 5' izrezovalnega mesta v elementu Alu, privede do konstitutivne vključitve dela elementa Alu v *OAT* transkript, kar skrajša protein zaradi predčasnega pojava končnega kodona. Posledično se razvije bolezen pomanjkanja ornitin aminotransferaze (Mitchell in sod., 1991). V primeru sindroma Sly delecija v elementu Alu introna beta-glukoronidaznega gena (*GUSB*) povzroči pojav novega 5' izrezovalnega mesta, eksonizacijo elementa Alu ter posledično pomanjkanje delujočega encima zaradi napačnega proteinskega produkta (Vervoort in sod., 1998). Posledica točkovne mutacije, ki povzroči eksonizacijo elementa Alu zaradi tvorbe novega 3' izrezovalnega mesta v *COL4A3* genu, je nastanek Alportovega sindroma (Knebelmann in sod., 1995). Delecija v *PTS* genu ima za posledico eksonizacijo dela elementa Alu, kar vodi do nepravilnega proteinskega produkta in do obolenja hiperfenilalaninemije (Meili in sod., 2009). Škodljiva eksonizacija elementov Alu je bila pokazana še pri več ostalih boleznih. V večini primerov so proces eksonizacije prešli obratnosmerni elementi Alu (Vorechovsky, 2010). Primeri patološke Alu eksonizacije in njihove lokacije znotraj referenčnega zaporedja elementov Alu so prikazane na sliki 11.



Slika 11: Primeri patološke eksonizacije obratnosmernih elementov Alu (Vorechovsky, 2010). Prikazana so mesta eksonizacije elementov Alu in mesta uporabljenih izrezovalnih mest (3' SS in 5' SS) znotraj referenčnega zaporedja obratnosmernih elementov Alu. Mutacije so prikazane z rdečo zvezdo.

Figure 11: Disease-associated exonization of antisense Alu elements (Vorechovsky, 2010). There are represented alignments of Alu pseudoexons and splice-site diversity (3' SS and 5' SS) within antisense Alu consensus sequence. Mutations are shown with red stars.

Nestabilnost genoma je ena izmed glavnih lastnosti rakavih obolenj. Retrotranspozoni vplivajo na nestabilnost s svojo vključitvijo na neobičajna mesta, eksonizacijo ter s preurejanjem večjih genomskega regij. Regije, ki vsebujejo več mobilnih elementov, so bolj dovzetne za pojave procesa nestabilnosti genoma (Konkel in Batzer, 2010). Povečano izražanje elementov Alu je bilo opaženo pri več vrstah raka (Liu in sod., 1994; Tang in sod., 2005). Poleg tega povečana stopnja somatskih mutacij v večini rakavih obolenj nakazuje, da je izražanje retroelementov in njihova nadaljnja aktivnost verjetno ena izmed gonilnih sil, ki povzročajo nestabilnost genoma in posledično karcinogenezo (Belancio in sod., 2010). Pri več vrstah rakavih tkiv je bilo pokazano tudi, da prisotnost elementov Alu sovpada s spremenjenim izražanjem genov v tumorskem tkivu oz. da so geni, ki vsebujejo elemente Alu, pogosteje spremenjeno izraženi kot geni brez elementov Alu (Lerat in Semon, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.2 IZRAŽANJE GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH

3.2.1 Bolniki in tumorski vzorci

3.2.1.1 Vzorci PKGV

Pri analizi smo uporabili 100 tumorskih vzorcev PKGV, ki so bili kirurško odstranjeni med letoma 2008 in 2010. Za analizo cDNA mikromrež smo uporabili 20 parov vzorcev PKGV in pripadajočih normalnih tkiv ter za analizo kvantitativnega PCR v realnem času še dodatnih 15 parov vzorcev, katerim smo določili ustrezno količino in kvaliteto RNA za nadaljnje analize. Vsa tumorska tkiva so bila pregledana s strani patologa, ki je določil parametre pTNM klasifikacije. Izbrani vzorci predstavljajo reprezentativen vzorec skupine vseh tumorskih vzorcev glede na pTNM, starost ob diagnozi, spol ter lokacijo tumorja (preglednica 1). Biopsije tumorjev so pripadale 3 ženskam in 32 moškim bolnikom (povprečna starost ob diagnozi: 56 let). Tkiva so bila stabilizirana v *RNAlater* (Applied Biosystems, ZDA) takoj po biopsiji ter inkubirana na 4 °C 7 dni. Po inkubaciji smo tkiva hranili na -20 °C do ekstrakcije RNA in nadaljnjih analiz.

Preglednica 1: Demografski podatki bolnikov PKGV, histopatološke značilnosti ter lokacije tumorjev. pTNM klasifikacija: x – status ni določen, ^a Velikost tumorja: T1 - 2 cm ali manj, T2 – med 2 in 4 cm, T3 – več kot 4 cm, T4 – invazija sosednjih struktur. ^b Področne bezgavke: N0 – brez področnih metastaz, N1 – v eni ipsilateralni bezgavki, 3 cm ali manj, N2a – v eni eniipsilateralni bezgavki, med 3 in 6 cm, N2b – v več ipsilateralnih bezgavkah, manj kot 6 cm, N2c – v bilateralnih ali kontralateralnih bezgavkah, manj kot 6 cm. ^c Oddaljene metastaze: 1 – prisotne, 0 – brez metastaz. Analiza: Q- kvantitativen PCR v realnem času, M- cDNA mikromreže.

Table 1: Location, pathology and stage according to pTNM classification and corresponding patients' demographics. Ž- female, M- male; x – status cannot be assessed; ^a Size of the tumor: T1 - 2 cm or less, T2 - more than 2 cm but not greater than 4 cm, T3 - more than 4 cm, T4 - invaded adjacent structures. ^b Lymph node status: N0 - no regional lymph node metastasis, N1 - in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less, N2a - in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm, N2b - in multiple ipsilateral lymph nodes, not more than 6 cm, N2c - in bilateral or contralateral lymph nodes, not more than 6 cm. ^c Distant metastasis: 1–present, 0–absent. Analysis: Q-quantitative real-time PCR, M-cDNA microarrays.

Zap. št. vzorca	Spol	Starost ob diagnozi (leta)	Lokacija tumorja	Faktorji pTNM klasifikacije			Stadij	Analiza
				Velikost tumorja (T) ^a	Področne bezgavke (N) ^b	Oddaljene metastaze (M) ^c		
1	M	53	grlo	4	1	0	IV	Q, M
2	M	53	ustna votlina, žrelo	3	2b	0	IV	Q, M
3	M	49	ustna votlina	2	2c	0	IV	Q, M
4	M	54	grlo, žrelo	3	1	0	III	Q, M
5	M	64	žrelo	2	2c	0	IV	Q, M
6	Ž	55	žrelo	x	0	0	x	Q
7	M	58	grlo	3	x	0	x	Q, M
8	M	47	grlo	2	2b	0	IV	Q, M
9	M	62	ustna votlina	3	1	0	III	Q, M
10	Ž	51	grlo	3	2c	0	IV	Q
11	M	55	ustna votlina	3	2c	0	IV	Q
12	M	55	grlo, ustna votlina	2	x	0	x	Q, M
13	M	61	grlo	1	2c	0	IV	Q
14	M	61	grlo	3	0	0	III	Q, M
15	M	51	ustna votlina	2	0	0	II	Q
16	M	56	žrelo	1	2b	0	IV	Q, M
17	M	67	ustna votlina, žrelo	4	2b	0	IV	Q
18	M	41	žrelo	4	2a	0	IV	Q, M
19	M	58	grlo, žrelo	4	2c	0	IV	Q, M
20	M	67	žrelo	2	2b	0	IV	Q
21	M	70	grlo	4	0	0	IV	Q, M
22	M	52	žrelo	2	x	0	x	Q, M
23	M	55	ustna votlina	1	2b	0	IV	Q
24	M	45	ustna votlina	2	1	0	III	Q, M
25	M	52	grlo	3	x	0	x	Q
26	M	44	grlo	4	1	0	IV	Q
27	M	52	žrelo	2	2c	0	IV	Q
28	M	60	žrelo	4	0	0	IV	Q
29	M	56	grlo	2	0	0	II	Q, M
30	M	48	ustna votlina	2	2c	0	IV	Q, M
31	M	57	žrelo	2	2b	0	IV	Q
32	Ž	55	grlo	3	2c	0	IV	Q, M
33	M	69	žrelo	1	2b	0	IV	Q, M
34	Ž	79	ustna votlina	1	x	0	x	Q
35	M	65	grlo, žrelo	3	2b	0	IV	Q

3.2.1.2 Vzorci možganskih tumorjev

Pri analizi možganskih tumorjev z uporabo cDNA mikromrež smo uporabili vzorce bolnikov s primarnimi možganskimi tumorji astrocitne in oligodendroglialne diferenciacije, ki so bili kirurško odstranjeni v letih 2008, 2009 in 2010. Od 21 analiziranih vzorcev jih je bilo 14 z astrocitno diferenciacijo: 3 difuzni astrocitomi, 2 anaplastična astrocitoma ter 9 glioblastomov (7 primarnih in 2 sekundarna). 7 analiziranih vzorcev je bilo histopatološko potrjenih kot anaplastični oligodendrogliomi. Povprečna starost analiziranih bolnikov ob postavitvi diagnoze je bila 48 let. Podatki so zbrani v preglednici 2. Tkiva so bila stabilizirana v *RNAlater* (Applied Biosystems, ZDA) takoj po biopsiji ter inkubirana na 4 °C 7 dni. Po inkubaciji smo tkiva hranili na -20 °C do ekstrakcije RNA in nadaljnjih analiz.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih vzorcev bolnikov možganskih tumorjev pri analizi cDNA mikromrež, njihovi demografski podatki in histopatološke značilnosti.

Table 2: List of samples used for microarray analysis, patients' demographics and histopathological assessed types of brain tumors. Ž- female, M- male.

Zap. št. vzorca	Spol (M/Ž)	Starost ob diagnozi (leta)	Vrsta tumorja (diagnoza)	Oznaka
1	Ž	39	Glioblastom (sekundarni)	2nd GBM_1
2	M	57	Glioblastom (sekundarni)	2nd GBM_2
3	Ž	32	Anaplastični astrocitom	Anaplastic astrocytoma_1
4	M	3	Anaplastični astrocitom	Anaplastic astrocytoma_2
5	M	21	Difuzni astrocitom	Diffuse astrocytoma_1
6	Ž	27	Difuzni astrocitom	Diffuse astrocytoma_2
7	M	37	Difuzni astrocitom	Diffuse astrocytoma_3
8	M	55	Glioblastom (primarni)	GBM_2
9	Ž	57	Glioblastom (primarni)	GBM_3
10	Ž	73	Glioblastom (primarni)	GBM_4
11	Ž	58	Glioblastom (primarni)	GBM_5
12	M	58	Glioblastom (primarni)	GBM_6
13	M	80	Glioblastom (primarni)	GBM_7
14	M	74	Glioblastom (primarni)	GBM_8
15	Ž	34	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_1
16	Ž	65	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_2
17	M	40	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_3
18	Ž	83	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_5
19	Ž	36	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_6
20	M	43	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_7
21	M	37	Anaplastični oligodendrogliom	Oligodendroglioma_8

3.2.2 Ekstrakcija RNA

Celokupna RNA iz 30 mg tkiva je bila izolirana z reagentom TRIzol (Invitrogen, ZDA), čemur je sledila dokončna ekstrakcija z miRNeasy Mini kompletom (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalcev. Količina dobljene RNA je bila izmerjena spektrofotometrično z aparatom NanoDrop (Thermo Scientific, ZDA) ter kvaliteta RNA z Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA). Celokupna RNA s koncentracijo višjo od 100 ng/μL in kvaliteto RIN>5,5 je bila uporabljena za nadaljnje analize s qPCR oz. RIN>7,0 za analizo s cDNA mikromrežami.

3.2.3 cDNA mikromreže: priprava vzorcev, hibridizacija, analiza podatkov

V raziskavi smo uporabili cDNA mikromreže, ki so bile izdelane na podlagi 3.060 različnih 70 nukleotidov dolgih oligonukleotidov, ki specifično prepoznavajo prisotnost in količino transkriptov, vpletenih v razvoj raka in apoptozo (Mlakar in sod., 2009a; Mlakar in sod., 2010; Mlakar in sod., 2009b).

Izolirano RNA smo pripravili na proces hibridizacije na mikromreže s kompletom Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification (Ambion, ZDA) po navodilih proizvajalca. V prvi fazi smo na podlagi začetnega oligonukleotida T7 (dT) izvedli obraten prepis mRNA in tako pridobili prvo verigo cDNA s promotorjem T7. Sledili sta istočasna razgradnja RNA in tvorba komplementarne verige cDNA. V nadaljevanju smo izvedli *in vitro* prepisovanje v aminoalil RNA (aRNA). Na podlagi vnesene aminoalilne skupine smo izvedli vezavo barvil Cy3/Cy5. Tako pripravljen in očiščen vzorec je bil pripravljen na hibridizacijo. Hibridizacijo smo izvedli s hibridizacijsko postajo HS400 (Tecan, Avstrija) z raztopinami iz kompleta Nexterion 70mer Oligo Microarraying (Schott, Nemčija) po protokolu, predstavljenem v preglednici 3. Na vsako mikromrežo smo istočasno hibridizirali vzorec mešanice tumorskega tkiva (označen s Cy5) in pripadajočega normalnega tkiva (Cy3) ter odčitali rezultate z optičnim čitalnikom LS200 (Tecan, Avstrija) pri valovnih dolžinah 534 nm (Cy3) in 633 nm (Cy5). Pri analizi možganskih tumorjev smo z barvilom Cy3 označili in hibridizirali FirstChoice Human Brain Reference RNA (Ambion, ZDA), ki je referenčna RNA pridobljena iz vzorcev 23 zdravih darovalcev. Referenčno RNA smo uporabili za normalizacijo rezultatov vzorcev možganskih tumorjev.

Za analizo slik oz. intenzitete signalov smo uporabili računalniški program ArrayPro (MediaCybernetic, ZDA), normalizacijo in filtriranje genov pa smo izvedli z računalniškim programom Acuity 4.0 (Molecular Devices, ZDA). Najprej smo kot nezanesljive izločili signale, katerih intenziteta je bila manj kot dvakratna v primerjavi z intenziteto ozadja oz. je bilo njihovo razmerje med standardno deviacijo signala ozadja in mediano signala točke večje od 0,3. Nadalje smo izvedli LOWESS normalizacijo razmerja log2 med signaloma Cy5 in Cy3 in na podlagi mediane izračunali povprečno vrednost signalov štirih ponovljenih točk na mikromreži. Dobljene normalizirane podatke smo nato uporabili pri nadaljnjih analizah s programom Acuity 4.0.

Preglednica 3: Potek hibridizacije na hibridizacijski postaji HS400 (Tecan). Raztopine v korakih 3, 4 in 7-9 od proizvajalca Schott (Nemčija).

Table 3: Hybridization process on hybridization station HS400 (Tecan). Izpiranje-wash, dodajanje vzorca-sample injection, hibridizacija- hybridization, sušenje- drying, raztopina- solution, čas procesa- time of the process, inkubacija- incubation. Solutions in stages 3, 4, 7-9 are from Schott (Germany).

Korak	Proces	Temp. (°C)	Raztopina	Čas procesa(s)	Inkubacija
1	izpiranje	25	0,1 % SDS	30	30 s
2	izpiranje	25	dH ₂ O	30	0
3	izpiranje	42	50-odstotna raztopina za hibridizacijo + 10 mg/ml BSA	10	30 min
4	izpiranje	40	50-odstotna raztopina za hibridizacijo + 10 mg/ml BSA	20	0
5	dodajanje vzorca	40			
6	hibridizacija	40			1 h
7	izpiranje	25	Tekočina za spiranje 2	60	30 s
8	izpiranje	25	Tekočina za spiranje 3	60	30 s
9	izpiranje	25	Tekočina za spiranje 4	60	30 s
10	sušenje	30			120 s

Za primerjavo rezultatov naših cDNA mikromrež smo uporabili orodje Oncomine (Compendia Bioscience, ZDA), ki za analizo spremenjenega izražanja genov pri različnih rakavih obolenjih uporablja prosto dostopne podatke mikromrež več sto različnih študij (Rhodes in sod., 2007). Za primerjavo cDNA mikromrež gliomov smo uporabili podatke 11 različnih študij molekularnega profiliranja različnih vrst gliomov (Bredel in sod., 2005; Freije in sod., 2004; French in sod., 2005; Lee in sod., 2006; Liang in sod., 2005; Murat in sod., 2008; Nutt in sod., 2003; Rickman in sod., 2001; Shai in sod., 2003; Sun in sod., 2006; van den Boom in sod., 2003). Število vzorcev po posameznih skupinah gliomov glede na njihovo diferenciacijo in stopnjo je predstavljeno v preglednici 4. Relativno

izražanje genov je bilo določeno glede na vrednosti izražanja normaliziranih podatkov, kjer smo najprej določali razlike v povprečjih tumorskih in normalnih skupin, $d = X_2 - X_1$. Log2 vrednosti smo spremenili v linearne vrednosti spremenjenega izražanja: $RVI = 2^{\Delta d}$. Če je d negativna vrednost smo RVI predstavili kot negativno vrednost.

Preglednica 4: Podatki objavljenih študij za analizo z orodjem Oncomine s pripadajočim številom vzorcev v vsaki analizirani skupini tumorjev z astrocitno in oligodendrogliomno diferenciacijo ter število vzorcev normalnega tkiva, uporabljenega pri analizi mikromrež.

Table 4: Number of samples from each public available microarray dataset used for Oncomine analysis. Presented are the numbers of samples in each group of astrocytic and oligodendrocytic tumors, as well as number of normal brain samples used in each study.

Podatki študije	Astrocitomi				Oligodendrogliom	Normalno tkivo
	Pilocitni	Difuzni	Anaplastični	Glioblastom		
Sun in sod. (2006)		7	19	81	50	23
Liang in sod. (2005)	0	0	0	30	2	3
Bredel in sod. (2005)	5			31	8	4
Shai in sod. (2003)	0	5		27	3	7
Murat in sod. (2008)	0	0	0	80	0	4
Lee in sod. (2006)	0	0	0	22	0	3
Rickman in sod. (2001)	19	5	0	21	0	6
French in sod. (2005)	0	0	0	0	23	6
van den Boom in sod. (2003)	0	6	2	4	0	0
Freije in sod. (2004)	0	0	8	59	11	0
Nutt in sod. (2003)	0	0	0	28	22	0

3.2.4 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Prva veriga cDNA je bila sintetizirana s kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, ZDA) z uporabo naključnih heksameroev, po navodilih proizvajalca.

Izražanje genov v tumorjih v primerjavi z normalnimi tkivi je bilo merjeno z metodo qPCR in TaqMan kemije. Uporabili smo mešanico sond in oligonukleotidnih začetnikov (TaqMan Gene Expression Assay) specifičnih za *BBC3* (Hs00248075_m1), *SLPI*

(Hs00268204_m1), *CTSK* (Hs00166156_m1), *CTSG* (Hs01113415_g1) in sonde endogene kontrole *GAPDH* (kataloška št. 4310884E). V primeru *BBC3* smo pred kvantitativno detekcijo izvedli predhodno amplifikacijo cDNA z TaqMan PreAmp Master Mix. Za nadaljnje 20 μ L reakcije pomnoževanja smo uporabili TaqMan Gene Expression Master Mix (vse Applied BioSystems, ZDA). Vse reakcije smo izvedli v treh ponovitvah in vključeno negativno kontrolo.

Kvantifikacija je bila izvedena na ABI Prism 7900 detektorju (Applied Biosystems, ZDA) pri pogojih: 2 min 50 °C, 10 minut na 95 °C, ter 40 ciklov po 15 sekund na 95 °C in 1 minuta na 60 °C.

3.2.5 Imunohistokemijska detekcija TP53, TP63, BCL2 in BAX proteinov

Imunohistokemijsko določevanje izražanja proteinov TP53, TP63, BCL2 in BAX je bilo izvedeno na v parafin vklopljenih vzorcih PKGV. Predhodna priprava protiteles TP53, BCL2 in BAX je bila izvedena v mikrovalovni pečici z uporabo EDTA pH 9,0 ter za TP63 na aparatu Benchmark XT (Ventana). Protitelesa proti TP53 (mišje, monoklonalno, klon DO-7), TP63 (mišje, monoklonalno, klon 4A4), BCL2 (mišje, monoklonalno, klon 124) in zajčje poliklonalno protitelo proti BAX (vsi DAKO, Danska) so bili redčeni na koncentracije 1:50, 1:20, 1:15 in 1:10, v enakem vrstnem redu. Nadaljnji postopki za TP53, BCL2 in BAX so bili avtomatizirani na aparatu Nexes Ventana (Ventana Medical Systems, ZDA), detekcija TP63 je bilo izvedena na Benchmark XT avtomatskem sistemu barvanja (Ventana Medical Systems, ZDA). Količina izraženega proteina v tumorskih celicah je bila merjena na lestvici od 0 do 2, kjer vrednost 0 predstavlja negativno reakcijo ali zelo šibko izraženo reakcijo v manj kot 10 % tumorskih celic, vrednost 1 predstavlja pozitivno reakcijo v 10 do 50 % tumorskih celic ter vrednost 2 pozitivno imunohistokemijsko reakcijo v več kot 50 % tumorskih celic.

3.2.6 Analiza podatkov qPCR, imunohistokemije in javno dostopnih podatkov cDNA mikromrež

Relativna kvantifikacija količine mRNA tarčnega gena je bila izračunana z uporabo $\Delta\Delta C_T$ vrednosti in predstavlja razliko med ΔC_T tumorsko in ΔC_T normalno vrednostjo, normalizirano na izražanje endogene kontrole *GAPDH* (C_T analizirani gen - C_T *GAPDH*).

Če je bila vrednost $\Delta\Delta C_T$ signifikantno večja (2σ) ali manjša kot 0, je bilo izražanje gena določeno kot spremenjeno. Za določitev statistično značilnega spremenjenega izražanja v tumorjih v primerjavi z normalnim tkivom smo uporabili primerjavo ΔC_T tumor z ΔC_T normalno od istega bolnika z uporabo Studentovega t-testa za parne vzorce ter neparametričnega Wilcoxon rank-sum test. Pri analizi qPCR po skupinah glede na histopatološke značilnosti smo uporabili Studentov t-test za neparne vzorce ter neparametrični Mann-Whitneyev test (pri vseh smo primerjali vrednosti $\Delta\Delta C_T$). Relativno vrednost izražanja mRNA (RVI) smo določili kot $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Vrednost $p < 0,05$ je bila določena kot meja statistične značilnosti. Za analizo smo uporabili programsko opremo SPSS ver.17 (SPSS Inc.). Analiza je bila izvedena ločeno za vsak analiziran faktor. Enake statistične metode so bile uporabljene tudi za imunohistokemijsko analizo TP53, TP63, BCL2 in BAX.

Podatkovna baza Oncomine (Compendia Bioscience, ZDA) je bila uporabljena za analizo mikromrež iz javno dostopnih podatkov (Rhodes in sod., 2007). Podatkovni seti so vključevali analizo mikromrež na 32 PK jezika in 26 normalnih tkiv jezika (Estilo in sod., 2009), analizo 41 PKGV in 13 normalnih tkiv, kjer smo upoštevali le primarne tumorje (Ginos in sod., 2004), analizo s 4 vzorci PK grlnega dela dela žrela (hipofarinks) in pripadajočih normalnih tkiv (Schlingemann in sod., 2005), analizo 31 vzorcev PK nosnega dela žrela in 10 normalnih vzorcev (Sengupta in sod., 2006), podatkovni set 16 vzorcev PK ustne votline in 4 normalnih vzorcev (Toruner in sod., 2004) ter študijo mikromrež 26 PK ustne votline in 12 pripadajočih normalnih tkiv (Ye in sod., 2008). Relativno izražanje genov je bilo določeno glede na vrednosti izražanja normaliziranih podatkov, kjer smo najprej določali razlike v povprečjih tumorskih in normalnih skupin, $d = X_2 - X_1$. Log2 vrednosti smo spremenili v linearne vrednosti spremenjenega izražanja: $RVI = 2^{dl}$. Če je d negativna vrednost, smo RVI predstavili kot negativno vrednost.

3.3 VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO AI

3.3.1 Celične kulture

Celično kulturo HeLa smo vzdrževali na 37 °C z 5 % CO₂ v DMEM celičnem gojišču po Dulbecco (angl. Dulbecco's modified Eagle medium) z dodatkom 10 % fetsnega seruma goveda in 1 % penicilin-streptomycin antibiotikov.

3.3.2 Znižanje izražanja *HNRNPC* in sistem reporterskih minigenov

Za znižanje izražanja *HNRNPC* smo HeLa celice namnožili do koncentracije 10⁵ celic/vdolbinico v 2 mL medija na ploščah s 6 vdolbinicami. 24 ur kasneje, pri približno 20 % konfluentnosti, smo izvedli transfekcijo celic neodvisno za vsako hnRNP C Stealth Select RNAi siRNA, in sicer za KD1 HSS179304 ter za KD2 HSS179305 (vse Invitrogen, ZDA) do končne koncentracije 5 nM. V obeh primerih smo transfekcijo izvedli z Lipofectamine RNAiMAX reagentom (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Z enakim postopkom smo izvedli tudi kontrolne eksperimente z uporabo Stealth RNAi siRNA Negative Control (Invitrogen, ZDA).

Za preverjanje uspešnosti znižanja izražanja smo uporabili prenos western z hnRNP C-, U2AF65- in GAPDH-specifičnimi protitelesi. Uporabili smo monoklono mišje hnRNP C protitelo 4F4 sc-32308 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA), monoklono mišje U2AF65 protitelo MC3 U4758 (Sigma-Aldrich, ZDA), poliklono zajčje U2AF65 protitelo H-300 sc-48804 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA) ter monoklono zajčje GAPDH protitelo 14c10 2118 (Cell Signaling, ZDA).

Po postopku znižanja izražanja *HNRNPC* smo pol ure kasneje izvedli dodatno transfekcijo celic s 400 ng plazmida reporterskega minigena z reagentom PolyFect (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Po 48h smo celice zbrali iz plošč ter iz njih izolirali celokupno RNA z uporabo RNeasy Plus Mini kompleta (Qiagen, Nemčija) za uporabo v nadaljnjih analizah. Vsi eksperimenti transfekcije so bili izvedeni v treh ponovitvah.

3.3.3 Bioinformacijska analiza podatkov pridobljenih z metodami nove generacije sekveniranja: iCLIP in RNA-seq

Uporabili smo podatke metode navzkrižnega povezovanja pod vplivom UV žarkov z imunoprecipitacijo združeno z novo generacijo sekveniranja (iCLIP), s katero so bila na nivoju celotnega genoma identificirana vezavna mesta proteinov hnRNP C in U2AF65. Vsi iCLIP eksperimenti so bili izvedeni po protokolu König in sod. (2010). iCLIP eksperimenti so bili izvedeni na HeLa celicah za proteina hnRNP C in U2AF65 ter prav tako na celicah HeLa z znižanim izražanjem *HNRNPC* za protein U2AF65, kar nam je omogočilo spremljanje kompetitive vezave obeh proteinov na polipirimidinska zaporedja.

Prav tako smo kot vhodne podatke za našo analizo uporabili podatke RNA sekveniranja nove generacije (RNA-seq), katere smo pridobili za kontrolne HeLa celice ter za celice HeLa z znižanim izražanjem *HNRNPC*. Priprava knjižnic je bila izvedena s protokolom mRNA Sequencing Sample Preparation (Illumina, ZDA). Knjižnice so bile nadalje sekvenirane na aparaturi Illumina GA-1 (dolžina branj 54 nt za iCLIP ter 75 nt za RNA-seq knjižnjice), pri čemer je bilo pridobljenih 240 milijonov 72-nt zaporedij parnih koncev za RNA-seq in 77 milijonov sekvenc za iCLIP. Sledila je serija bioinformacijskih korakov, vključno z mapiranjem na genom, identifikacijo vezavnih mest RNA-vezavnih proteinov, določitve diferencialnega izražanja genov in identifikacijo novih izooblik transkriptov, pridobljenih z analizo DEXSeq (Anders in sod., 2012).

V okviru doktorske naloge smo predhodno pridobljene podatke iCLIP in RNA-seq eksperimentov uporabili za načrtovanje minigenov, s katerimi smo analizirali različno vključevanje genomskih segmentov v končne prepise genov. Uporabili smo bioinformacijsko orodje Integrated Genome Browser ver. 6.4 (Nicol in sod., 2009) z dodatki prilagojenimi toku raziskave.

3.3.4 Priprava reporterskih minigenov s tehnologijo rekombinantne DNA

Za pripravo minigenov in usmerjeno mutagenozo smo najprej s PCR pomnožili ustrezne regije iz genomske DNA z uporabo Phusion High-Fidelity DNA polimeraze (NEB, ZDA). S sekveniranjem smo potrdili, da so bili vsi konstrukti identični referenčnemu genomskemu zaporedju, razen na mestih, kjer smo izvedli usmerjeno mutagenozo. V vseh

primerih smo tarčne regije s tehnologijo rekombinantne DNA vstavili v pcDNA3 ekspresijski vektor (Invitrogen, ZDA).

Za nemutiran *CD55* reporterski minigen (*CD55_wt*) smo skrajšali velikost intronske regije navzdol od elementa Alu z dvema zaporednima PCR korakoma z uporabo oligonukleotidov *CD55_wt_F1* z *CD55_wt_R1* ter *CD55_wt_F2* z *CD55_wt_R2* (Preglednica 5). Izvedli smo encimsko restrikcijo PCR produktov z NotI in XbaI encimoma ter ligacijo v odprt pcDNA3 ekspresijski vektor. Za mutirane *CD55* minigene smo z usmerjeno mutagenezo uvedli mutacije v uridinske trakte elementa Alu na matrici *CD55_wt* minigena. Uporabili smo PCR metodo z oligonukleotidnimi začetniki *CD55_3mut_R* z *CD55_wt_F1* in *CD55_3mut_F* z *CD55_wt_R2* za mutacije v zgornjem uridinskem traktu ter *CD55_5mut_R* in *CD55_5mut_F* za mutacije povezovalnega uridinskega trakta. Po končnem PCR z zunanjimi oligonukleotidnimi začetniki smo produkt ligirali preko NotI/XbaI cepljenih fragmentov v pcDNA3 tako, da smo pridobili minigena *CD55_3mut* in *CD55_5mut*. *CD55* minigen, ki je hkrati vseboval obe vrsti mutacij (*CD55_3mut5mut*) je bil pridobljen z restrikcijo obeh mutiranih plazmidov z encimoma PstI in NotI, selekcijo ustreznih fragmentov z gelsko elektroforezo in ligacijo.

Nemutiran *NUP133* reporterski minigen (*NUP133_wt*) smo pripravili s pomnožitvijo genomske DNA z oligonukleotidi *NUP133_wt_F* in *NUP133_wt_R*. PCR produkt smo razrezali z BamHI in EcoRI restrikcijskima encimoma ter ligirali v pcDNA3 vektor. Mutacije v zgornjem uridinskem zaporedju elementa Alu smo uvedli z usmerjeno mutagenezo, in sicer s PCR oligonukleotidnimi začetniki *NUP133_wt_F* z *NUP133_3mut_R* ter *NUP133_wt_R* z *NUP133_3mut_F* na SmaI lineariziranem *NUP133_wt* plazmidu. Po tretji PCR reakciji z zunanjimi oligonukleotidnimi začetniki smo produkt razrezali z BamHI in EcoRI in vstavili v pcDNA3. Z enakim pristopom, smo plazmid *NUP133_5mut* z mutacijami v povezovalnem uridinskem zaporedju pripravili z oligonukleotidi *NUP133_5mut_F* in *NUP133_5mut_R*. Pri pripravi minigena, ki je vseboval obe mutirani uridinski zaporedji *NUP133_3mut5mut* smo uvedli mutacije v povezovalno uridinsko zaporedje minigena *NUP133_3mut* z uporabo *NUP133_5mut_F* in *NUP133_5mut_R*, združenimi z zunanjimi oligonukleotidi. Izvedli smo encimsko restrikcijo z BamHI in EcoRI ter ligacijo v pcDNA3.

Nespremenjen *PTS* minigen (*PTS_wt*) smo pripravili s PCR pomnoževanjem genomske DNA z oligonukleotidi *PTS_wt_F* in *PTS_wt_R*. Dobljeni produkt smo razrezali z *NotI* in *XbaI* encimoma ter ligirali v *pcDNA3*. Za mutiran minigen (*PTS_bolezen*) smo klinično pomembno mutacijo uvedli s PCR reakcijo na matrici *PTS_wt* in oligonukleotidi *PTS_bolezen_F* ter *PTS_bolezen_R*. Po končni PCR reakciji z zunanjimi oligonukleotidi smo produkt razrezali z *NotI* in *XbaI* ter vstavili v *pcDNA3* ekspresijski vektor. Seznam uporabljenih PCR oligonukleotidnih začetnikov prikazuje preglednica 5.

Preglednica 5: PCR oligonukleotidni začetniki za molekularno kloniranje reporterskih minigenov ter kvantifikacijo izooblik z RT-PCR.

Table 5: PCR primers used for cloning of reporter minigenes and isoform quantification using RT-PCR.

Reporterski minigen	Oligonukleotid	Zaporedje od 5' proti 3' koncu
CD55_wt	CD55_wt_F1	TTAAGCGGCCGCTCCTTTTTCCTTCGCT
	CD55_wt_R1	CATCTGCTTAAAAGACATCCCATGCTCACG
	CD55_wt_F2	GGATGCTTTTAAAGCAGATGCCTGACTTCG
	CD55_wt_R2	AATTCTAGAGCTAAGAATGTGATTCCAGG
CD55_3mut	CD55_3mut_F	TCTTCTTTTCTTTATTTTATTTTCTTTTGTGAGACAGGTCTCGTCTGTACCCAG
	CD55_3mut_R	AACCTGTCTCAAAAAGAAAATAAAATAAAATAAGAAAAGAAAACAAATCTAG CATATATAGAAT
CD55_5mut	CD55_5mut_F	ACCCGGCTAAGTCTTGAAATTTATTTCTTGTAGAGACAGGATTTCTATGTTGCCAGG CTGGTTTCA
	CD55_5mut_R	TCTCTACAAGAAATAAATTTCAAGAACTTAGCCGGGTGTCGTGGCACACCTGTAGTAC CAGCTACTTG
NUP133_wt	NUP133_wt_F	AATTGGATCCGGGTAGTTGTACCATCAC
	NUP133_wt_R	AATTGAATTCTTCTAAAAATGATGGGTCATTAG
NUP133_3mut	NUP133_3mut_F	TCTTTTCTTTTCTTTCTTTTCTTTTGTGAGACATGGTCTCACTCCATTGCCAGGCTGG GTTTATA
	NUP133_3mut_R	TGTCTCACAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATGAGAGAAAAAGTCAGC ACAGATCTGCAT
NUP133_5mut	NUP133_5mut_F	CACGCCACGATGCCAGGTAATTCTAAAAATTTCTGTACAGATGGGGTCTCACTATGTTG TCAG
	NUP133_5mut_R	ATCTGTACAAGAAATTTTAGAATTACCTGGGCATCGTGGCGTGCACCTACCGTCCCAGCT ACTT
PTS_wt	PTS_wt_F	TACAGCGGCCGCGAATGTGATACTTGTGTCAT
	PTS_wt_R	TACATCTAGACAATCTGCAAAAACACACA
PTS_bolezen	PTS_bolezen_F	TTCATAAAAGTTATTAATGTGTTCCACTCTTTTGGCCAG
	PTS_bolezen_R	CTGGGCAAAAAGAGTGGAACACATTAATAACTTTTATGAA
RT-PCR kvantifikacija	Oligonukleotid	Zaporedje od 5' proti 3' koncu
CD55	Vector_F	ATACGACTCACTATAGGGAGAC
	CD55_R	CAAGCAAACCTGTCAACGTG
NUP133	NUP133_F	GAATGGGCTGAAGTGGTGAT
	Vektor_R	AATAGGGCCCTCTAGATGCATG
PTS	Vektor_F	ATACGACTCACTATAGGGAGAC
	PTS_R	TCTCCATGTACTGTCACCAC

3.3.5 Kvantifikacija alternativnih spojitvenih oblik sistema reporterskih minigenov

Uporabili smo semikvantitativno metodo obratnega prepisa in verižne reakcije s polimeraze (RT-PCR). Merili smo delež vključitve alternativnih eksonov v minigenih v kontrolnih ter v HeLa celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*. Za prikaz PCR produktov in kvantifikacijo posameznih izooblik smo uporabili sistem kapilarne elektroforeze QIAxcel (Qiagen, Nemčija). Po ekstrakciji RNA smo 500 ng celokupne RNA obratno prepisali z RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis kompletom (Fermentas).

V primeru *PTS* reporterskega minigena smo RT-PCR izvedli z IMMOLASE DNA-polimerazo (Bioline) s pogoji: 95 °C za 10 min, 35 ciklov po [95 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s] in končno 72 °C za 2 min. Z namenom pomnožitve le cDNA molekul minigena (in ne endogenih) smo uporabili kombinacijo vektor-specifičnega in PTS-specifičnega oligonukleotida: Vektor_F in PTS_R. Za CD55 minigen smo uporabili enak vektor-specifični ter CD55-specifični oligonukleotidni začetnik CD55_R. Pri reakciji PCR smo izvedli 40 ciklov (enaki pogoji kot zgoraj) z namenom povečanja intenzitete signala.

Zaradi večjih PCR produktov dobljenih iz *NUP133* minigenov smo v tem primeru uporabili Phusion High-Fidelity DNA-polimerazo (NEB, ZDA) z vektor- in *NUP133*-specifičnimi oligonukleotidi: Vektor_R in NUP133_F. Pogoji PCR reakcij so bili: 98 °C 10 s, 32 ciklov [98 °C 1 s, 55 °C 5 s, 72 °C 30 s] ter nato 72 °C za 1 minuto. PCR produkte smo očistili soli z etanolno precipitacijo pred nadaljnjo kvantifikacijo. Uporabljeni PCR oligonukleotidni začetniki za RT-PCR kvantifikacijo so zbrani v preglednici 5.

3.3.6 Kvantifikacija vključitve endogenih Alu eksonov

Za validacijo podatkov različnega AI Alu eksonov pridobljenih z metodologijo RNA-seq smo obratno prepisali celokupno RNA iz HeLa celic z RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis kompletom (Fermentas) ter cDNA pomnožili z IMMOLASE DNA-polimerazo (Bioline) pod naslednjimi pogoji: 95 °C 10 min, 35 ciklov [95 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s] ter 72 °C za 2 min. Za vsak Alu ekson smo uporabili oligonukleotidne začetnike, ki so prilegali na sosednja konstitutivna eksona (prilogi A in B). Za vizualizacijo in kvantifikacijo izooblik smo uporabili sistem kapilarne elektroforeze QIAxcel. Vse meritve so bile izvedene v treh ponovitvah.

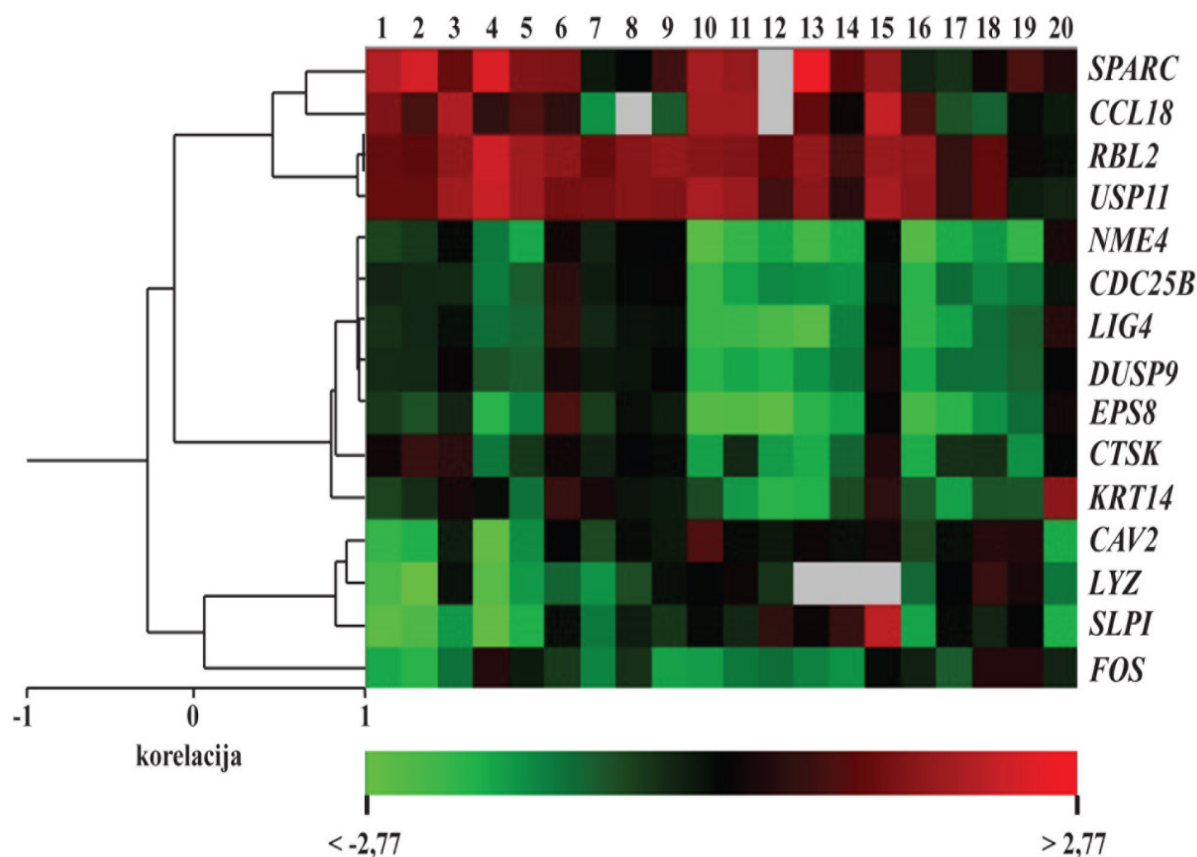
4 REZULTATI

4.2 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH

4.2.1 Rezultati analize mikromrež pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu

Profile izražanja genov smo določali z dvobarvnimi oligonukleotidnimi cDNA mikromrežami, in sicer smo primerjali izražanje genov med tumorskimi in pripadajočimi normalnimi tkivi 20 bolnikov s PKGV. Za nadaljnje analize smo uporabili le podatke genov, ki so se pojavljali v več kot 80 % vseh analiziranih mikromrež. Po prvotni filtraciji smo za nadaljnje analize upoštevali 1.619 od 2.632 genov (62 %). Za gene s spremenjenim izražanjem smo izbrali tiste, ki so bili najmanj 1,5-kratno povprečno spremenjeni v tumorskih tkivih pri najmanj 5 vzorcih. Takšnih genov smo določili 15, in sicer jih je od teh 11 kazalo znižano izražanje glede na pripadajoče normalno tkivo in 4 zvišano izražanje. Korelacije genov smo določili s hierarhičnim grupiranjem po Pearsonu (slika 12). Rezultati in značilnosti spremenjeno izraženih genov so zbrani v preglednici 6.

Pri pregledu molekularnih funkcij genov s spremenjenim izražanjem smo ugotovili, da več določenih spremenjeno izraženih genov sodeluje pri endopeptidazni aktivnosti, in sicer proteinska produkta povišano izraženih genov *USP11* in *CTSK* delujeta kot cisteinski endopeptidazi in produkt znižano izraženega *SLPI* kot inhibitor serinskih endopeptidaz (preglednica 6). Z namenom potrditve rezultatov mikromrež oz. določitve spremenjenega izražanja na naboru več vzorcev smo izbrali *CTSK* in *SLPI* kot primerna kandidata za validacijo s qPCR. Ker njuna direktna korelacija ni mogoča, saj je *SLPI* inhibitor serinskih, *CTSK* pa je cisteinska proteaza, smo za preverjanje korelacij izražanja s qPCR izbrali tudi katepsin G oz. *CTSG*, ki spada v družino serinskih proteaz (slika 13).



Slika 12: Prikaz rezultatov analize cDNA mikromrež vzorcev PKGV. Prikazani so geni, za katere smo detektirali spremenjeno izražanje PKGV v primerjavi s pripadajočim normalnim tkivom. 1-20: vzorci bolnikov PKGV, vrednosti relativnega izražanja genov so prikazane z barvno lestvico, kjer zelena predstavlja znižano izražanje ter rdeča zvišano (logaritmično razmerje). Na levi strani slike je prikaz korelacije med spremenjeno izraženimi geni z metodo hierarhičnega grupiranja po Pearsonu.

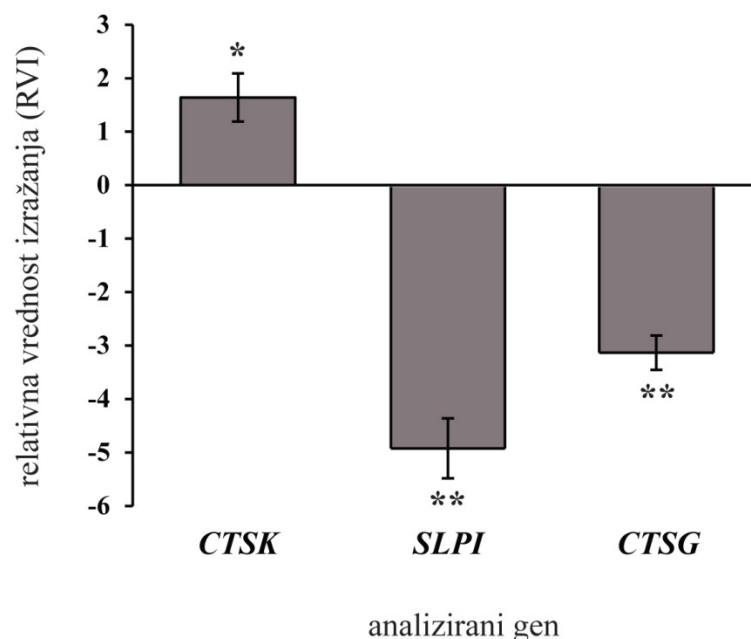
Figure 12: Heat map of cDNA microarray analysis of HNSCC samples. The figure represents differentially expressed genes in HNSCC compared to adjacent normal tissues. 1-20: samples of HNSCC patients. Values of differential gene expression are represented on a color scale, where green means downregulation and red upregulation (log ratio). On the left side of the figure is presented Pearson hierarchical clustering of differentially expressed genes in HNSCC.

Preglednica 6: Seznam spremenjeno izraženih genov PKGV v primerjavi s pripadajočimi normalnimi tkivi, dobljenih z analizo cDNA mikromrež. Prikazane so lokacije genov na kromosomu, opis njihovih produktov ter določene funkcije.

Table 6: List of differentially expressed genes derived from HNSCC cDNA microarrays analysis, tumors tissues were compared to adjacent normal tissues. Each gene has listed its chromosome location, official description and functions.

Ime gena	Lokacija	Opis genskega produkta	Funkcija
<i>Zvišano relativno izražanje</i>			
<i>SPARC</i>	5q31.3-q32	Osteonektin	Vezava Ca ionov; vezava kolagena; vezava proteinov; vezava zunajceličnega matriksa
<i>CCL18</i>	17q11.2	Kemokinski ligand 18	Kemokinska aktivnost; vezava proteinov
<i>RBL2</i>	16q12.2	Retinoblastomu-podoben protein 2	Vezava proteinov; vezava DNA
<i>USP11</i>	Xp11.23	Ubikvitin-specifična peptidaza 11	Cisteinska endopeptidazna aktivnost; vezava proteinov; ubikvitin tiolesterazna aktivnost; ubikvitin specifična proteazna aktivnost
<i>Znižano relativno izražanje</i>			
<i>NME4</i>	16p13.3	NME/NM23 nukleozid difosfat kinaza 4	Vezava ATP; vezava kovinskih ionov; nukleozid difosfat kinazna aktivnost
<i>CDC25B</i>	20p13	Homolog B cikla 25 deljenja celic	Vezava proteinskih kinaz; protein tirozin fosfatazna aktivnost
<i>LIG4</i>	13q33-q34	DNA ligaza IV, ATP-odvisna	Vezava ATP; vezava DNA; aktivnost DNA ligaze; vezava kovinskih ionov; vezava proteinov
<i>DUSP9</i>	Xq28	Dvojno specifična peptidaza 9	Fosfatazna aktivnost
<i>EPS8</i>	12p12.3	Substrat 8 receptorja epidermalnega rastnega faktorja	Aktivnost SH3/SH2 adaptorja; vezava proteinov
<i>CTSK</i>	1q21	Katepsin K	Cisteinska endopeptidazna aktivnost
<i>KRT14</i>	17q12-q21	Keratin 14	Vezava proteinov; strukturna komponenta citoskeletona
<i>CAV2</i>	7q31.1	Kaveolin 2	Vezava D1 dopamin receptorja; vezava proteinov; vezava fosfoproteinov; aktivnost homodimerizacije proteinov; vezava sintaksina
<i>LYZ</i>	12q15	Lizocim	Lizocimska aktivnost
<i>SLPI</i>	20q12	Sekretorni inhibitor levkocitne peptidaze	Inhibitor endopeptidaz; vezava proteinov; inhibitor serinskih endopeptidaz
<i>FOS</i>	14q24.3	FBJ homolog osteosarkoma virusnega onkogenega glodalcev	Vezava proteinov; vezava DNA; transkripcijski faktor

Z rezultati qPCR na večjem naboru vzorcev smo potrdili znižano izražanje *SLPI* pri PKGV, kar je v skladu z ugotovitvami s cDNA mikromrežami. Povprečna vrednost relativnega izražanja (RVI) je znašala -4,89. Znižanega izražanja *CTSK* nismo potrdili, saj je bilo njegovo izražanje zvišano (RVI 1,64). Izražanje *CTSG* je bilo znižano s povprečno vrednostjo relativnega izražanja -3,09 (slika 13).



Slika 13: Relativno izražanje genov *CTSK*, *SLPI* in *CTSG*, določeno s kvantitativnim PCR v realnem času (qPCR) pri PKGV (n=35). Statistična analiza je bila narejena z neparametričnim Wilcoxon Signed Ranks testom in dvosmernim t-testom za odvisne vzorce. Izražanje *CTSK* je povečano pri PKGV, izražanje *SLPI* in *CTSG* je znižano. *: $0,01 < p < 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

Figure 13: Results of qPCR analysis of relative gene expression of *CTSK*, *SLPI* and *CTSG* in HNSCC. For the statistical analysis we used Wilcoxon Signed Ranks Test and two sided t-test for paired samples. Expression of *CTSK* is upregulated, *SLPI* and *CTSG* are downregulated in HNSCC. *: $0.01 < p < 0.05$; **: $p \leq 0.01$.

4.2.2 Rezultati mikromrež vzorcev možganskih tumorjev

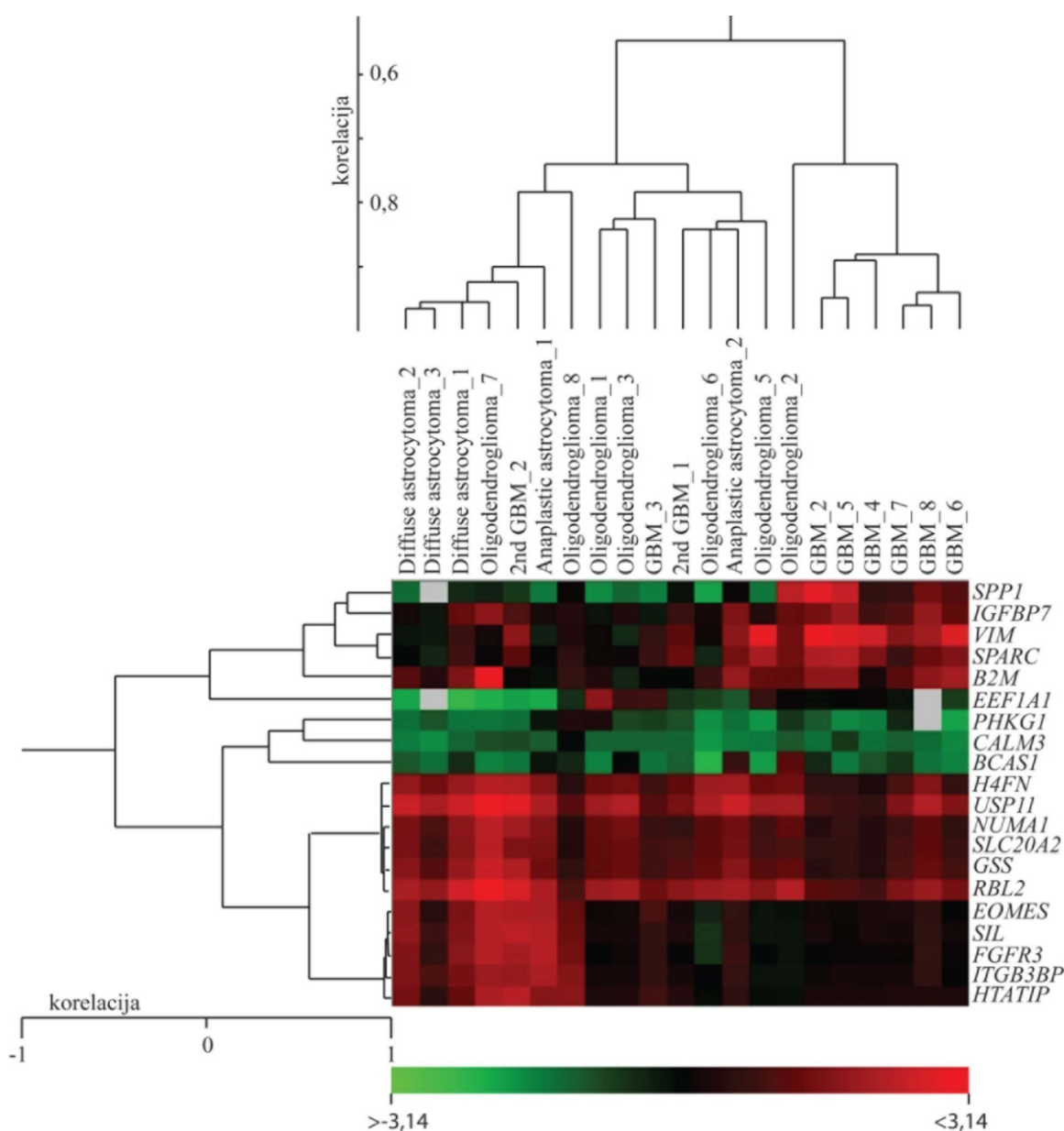
V nadaljevanju nas je zanimalo spremenjeno izražanje genov v skupinah možganskih tumorjev, in sicer pri tumorjih z astrocitno in oligodendrocitno diferenciacijo. V primeru tumorjev astrocitne diferenciacije so uporabili vzorce različnih stopenj malignosti.

Profile spremenjenega izražanja smo določali z dvobarvnimi oligonukleotidnimi mikromrežami pri 21 vzorcih gliomov. Po normalizaciji smo s filtracijo odstranili vse gene, ki se niso pojavili v najmanj 80 % vseh analiziranih mikromrež. Po prvotni filtraciji je za nadaljnje analize ostalo 2.807 od 3.048 genov (92 %). Za gene s spremenjenim izražanjem smo izbrali tiste, ki so bili v povprečju najmanj 1,5-kratno spremenjeni v tumorskih tkivih pri najmanj 5 vzorcih. Takšnih genov smo določili 20. Od teh je 9 kazalo znižano izražanje glede na pripadajoče normalno tkivo in 11 zvišano izražanje. Korelacije

genov in vzorcev smo določili s hierarhičnim grupiranjem po Pearsonu (slika 14). Rezultati in značilnosti spremenjeno izraženih genov so zbrani v preglednici 7.

Po pregledu rezultatov hierarhičnega grupiranja glede na analizirane vzorce lahko opazimo, da so se v grobem vzorci gliomov porazdelili v tri večje skupine, in sicer so v eni skupini pretežno zajeti vzorci glioblastomov, v drugi skupini vzorci astrocitomov nižjih stopenj malignosti (predvsem difuzni in en anaplastični astrocitom) ter v tretji skupini pretežno oligodendrogliomi (slika 14).

V nadaljevanju nas je zanimalo ali obstajajo razlike oz. korelacije med spremenjeno izraženimi geni določenimi s cDNA mikromrežami glede na diferenciacijo oz. stadijem astrocitomov. Uporabili smo neparametrični Mann-Whitneyev test z odstranjenimi napačno pozitivnimi zadetki (FDR korekcija) za preverjanje razlik med stopnjami astrocitomov. Združili smo difuzne in anaplastične astrocitome ter jih primerjali s skupino glioblastomov. Za statistično analizo več skupin smo uporabili metodo enosmerne analize variance (angl. one-way ANOVA), kjer smo primerjali skupine astrocitomov nižje stopnje malignosti (difuzni, anaplastični astrocitomi in glioblastomi) z glioblastomi in oligodendrogliomi. Rezultate prikazuje preglednica 8.



Slika 14: Prikaz rezultatov analize cDNA mikromrež vzorcev možganskih tumorjev. Prikazani so geni, za katere smo detektirali spremenjeno izražanje v primerjavi z referenčno RNA. Vrednosti relativnega izražanja genov (logaritmično razmerje) so prikazane z barvno lestvico, kjer zelena predstavlja znižano izražanje ter rdeča zvišano. Na levi strani slike je prikaz korelacije med spremenjeno izraženimi geni z metodo hierarhičnega grupiranja po Pearsonu, na vrhu pa je korelacija glede na analizirane mikromreže.

Figure 14: Results of cDNA microarray analysis of glioma samples. Listed are differentially expressed genes compared to human brain reference RNA. Relative gene expression is represented as a log ratio on a color scale, where green means downregulation and red upregulation. On the left side of the figure is Pearson hierarchical clustering result of correlation between the genes and on the top between the microarrays.

Preglednica 7: Seznam spremenjeno izraženih genov pri gliomih v primerjavi z referenčno RNA, dobljenih z analizo cDNA mikromrež. Prikazane so lokacije genov na kromosomu, opis njihovih produktov ter določene funkcije.

Table 7: List of cDNA microarrays derived differentially expressed genes in brain tumors with corresponding gene locations on the chromosomes, official names and described functions.

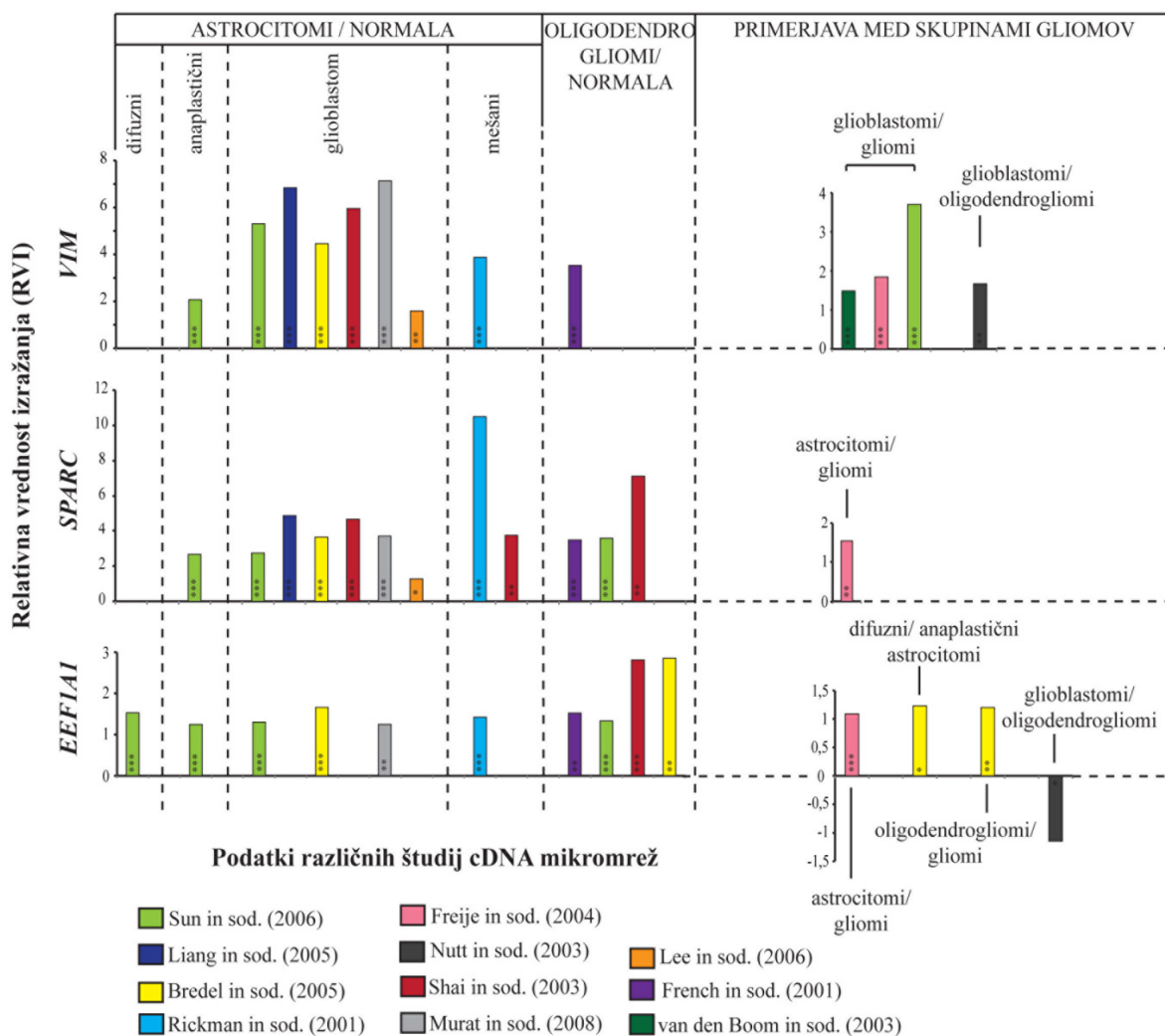
Ime gena	Lokacija	Opis genskega produkta	Funkcija
<i>Znižano relativno izražanje</i>			
<i>SPP1</i>	4q22.1	Sekretorni fosfoprotein 1	Citokinska aktivnost, vezava zunajceličnega matriksa
<i>IGFBP7</i>	4q12	Inzulinu-podoben vezavni protein ravnega faktorja 7	Vezava inzulinu-podobnega ravnega faktorja
<i>VIM</i>	10p13	Vimentin	Vezava proteinskih kinaz; strukturna komponenta citoskeleta
<i>SPARC</i>	5q31.3-q32	Osteonektin	Vezava Ca ionov; vezava kolagena; vezava proteinov; vezava zunajceličnega matriksa
<i>B2M</i>	15q21-q22.2	Beta-2-mikroglobulin	Vezava proteinov
<i>EEF1A1</i>	6q14.1	Eukariotski translacijski faktor elongacije 1 alfa 1	Vezava GTP; aktivnost faktorja elongacije translacije; vezava proteinov
<i>PHKG1</i>	7p11.2	Kinaza fosforilaze, gama 1	Vezava ATP; vezava kalmodulina; vezava encimov; aktivnost fosforilacijske kinaze; aktivnost kinaze proteina tau
<i>CALM3</i>	19q13.2-q13.3	Kalmodulin 3	Vezava Ca ionov; od Ca-odvisna vezava proteinov; vezava ionskih kanalov; vezava fosfolipaz; vezava tioesteraz; vezava titina
<i>BCAS1</i>	20q13.2	Pomnoženo zaporedje karcinoma dojke 1	/
<i>Zvišano relativno izražanje</i>			
<i>H4FN</i>	1q21.2	Histonski skupek 2, H4a	Vezava DNA; vezava proteinov; aktivnost heterodimerizacije proteinov
<i>USP11</i>	Xp11.23	Ubikvitin-specifična peptidaza 11	Cisteinska endopeptidazna aktivnost; ubikvitin specifična proteazna aktivnost
<i>NUMA1</i>	11q13	Jedrni protein mitotskega aparata 1	Vezava proteinov
<i>SLC20A2</i>	8p11.21	Protein družine prenašalcev toplencev 20, član 2	Aktivnost fosfatnega transmembranskega prenašalca; aktivnost receptorja
<i>GSS</i>	20q11.2	Sintetaza glutationa	Vezava ATP; vezava glutationa; sinteza glutationa; vezava glicina; vezava Mg ionov; aktivnost homodimerizacije proteinov
<i>RBL2</i>	16q12.2	Retinoblastomu-podoben protein 2	Vezava proteinov; vezava DNA
<i>EOMES</i>	3p24.1	Eomezodermin	Vezava DNA; vezava aktivatorja transkripcije RNA pol II; negativna regulacija transkripcije; transkripcijski faktor
<i>SIL</i>	1p32	SCL/TAL1 prekinjajoč lokus	/
<i>FGFR3</i>	4p16.3	Fibroblastni receptor ravnega faktorja 3	Vezava ATP; vezava fibroblastnega ravnega faktorja; aktivnost tirozinske kinaze
<i>ITGB3BP</i>	1p31.3	Vezavni protein integrina beta 3	Vezava C-koncev proteinov
<i>HTATIP</i>	11q13	Lizin acetil transferaza 5	Vezava androgenskega receptorja; sodeluje pri aktivnosti histonske acetiltransferaze; vezava kovinskih ionov; vezava faktorja zaviranja transkripcije

Preglednica 8: Rezultati statistične analize rezultatov cDNA mikromrež možganskih tumorjev. Prikazane so skupine tumorjev, ki smo jih med seboj primerjali s statističnimi testi ter dobljene p-vrednosti. Vrednosti v krepkem tisku predstavljajo statistično značilne spremembe, $p < 0,05$. Korekcija FDR- odstranjeni napačno pozitivni zadetki. * vrednosti so statistično značilne po vseh izbranih statističnih analizah.

Table 8: Statistical analysis of brain tumors cDNA microarrays. Listed are groups of samples used for the comparisons, corresponding statistical tests and p-values. Statistical significant results ($p < 0.05$) are marked as a bold text (FDR corrected). *- values are statistical significant within all the performed analysis.

Statistične analize primerjave skupin tumorjev (p vrednosti)				
Primerjava	Skupina 1	difuzni in anaplastični astroцитomi	difuzni astroцитomi	difuzni in anaplastični astroцитomi
	Skupina 2	glioblastomi	anaplastični astroцитomi	glioblastomi
	Skupina 3	/	glioblastomi	oligodendrogliomi
	Statistični test	Mann-Whitney test (korekcija FDR)	Enosmerna analiza variance (ANOVA)	Enosmerna analiza variance (ANOVA)
Oznaka gena	<i>BCAS1</i>	0,043	0,004	0,343
	<i>VIM</i> *	0,036	0,013	0,007
	<i>EEF1A1</i> *	0,036	0,022	0,021
	<i>SPARC</i> *	0,038	0,022	0,022
	<i>ITGB3BP</i>	0,036	0,053	0,067
	<i>SLC20A2</i>	0,043	0,058	0,115
	<i>FGFR3</i>	0,036	0,069	0,082
	<i>USP11</i>	0,038	0,074	0,033
	<i>H4FN</i>	0,036	0,075	0,048
	<i>NUMA1</i>	0,036	0,100	0,092
	<i>RBL2</i>	0,036	0,118	0,098
	<i>SIL</i>	0,036	0,139	0,111
	<i>GSS</i>	0,036	0,161	0,140
	<i>SPP1</i>	0,071	0,198	0,087
	<i>EOMES</i>	0,043	0,205	0,168
	<i>CALM3</i>	0,186	0,314	0,394
	<i>IGFBP7</i>	0,257	0,369	0,298
	<i>HTATIP</i>	0,038	0,416	0,442
	<i>PHKG1</i>	0,449	0,529	0,539
	<i>B2M</i>	0,449	0,974	0,998

Za izražanje genov *VIM*, *EEF1A1* in *SPARC* smo ugotovili, da se le-to statistično značilno razlikuje med skupinami analiziranih tumorjev v primeru vseh analiziranih možnosti. Z namenom preverjanja rezultatov na naboru večjega števila vzorcev ter tudi v neodvisnih študijah smo njihovo izražanje v ostalih objavljenih študijah preverili z orodjem Oncomine. Rezultati so prikazani na sliki 15.



Slika 15: Analiza izražanja *VIM*, *SPARC* in *EEF1A1* pri vzorcih možganskih tumorjev z orodjem Oncomine. Analiza je bila izvedena s primerjavo skupin tumorskih vzorcev različne diferenciacije in stopnje proti normalnemu možganskemu tkivu (levo) ter prav tako med različnimi skupinami (desno). Podane so relativne vrednosti izražanja (RVI). Vsaka barva predstavlja podatke različne študije molekularnega profiliranja gliomov (v legendi). Vrednosti statistične značilnosti: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figure 15: Oncomine analysis of *VIM*, *SPARC* and *EEF1A1* gene expression in brain tumors. Analysis was performed with comparison of groups of different tumor types and stages with normal brain samples (left) and between different tumor groups (right). Presented are values of differential gene expression. Each microarray dataset is represented with different color, as in the legend. Statistical significance: * $0.01 \leq p < 0.05$; ** $0.001 \leq p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Spremenjeno izražen gen *VIM* je bil po podatkih naših cDNA mikromrež zvišano izražen v možganskih tumorjih (slika 14 in preglednica 7). Po hierarhičnem grupiranju vzorcev smo ugotovili, da je *VIM* zvišano izražen predvsem v glioblastomih v primerjavi z ostalimi skupinami tumorjev. To smo potrdili tudi s statističnimi analizami razlik med ostalimi

vrstami tumorjev z metodo enosmerne analize variance (ANOVA) ter med stopnjami astrocitomov z Mann-Whitney testom (preglednica 8). V nadaljevanju smo preverili spremenjeno izražanje *VIM* v možganskih tumorjih proti normalnem tkivu tudi na naboru vzorcev več študij. Izbrali smo vse študije mikromrež, ki so prosto dostopne preko podatkovne zbirke Oncomine ter kažejo statistično značilnost spremenjenega izražanja za analizirani gen. V primeru *VIM* se je pri primerjavi tumorskih in normalnih vzorcev pri vseh analizah 7 različnih študij potrdilo zvišano izražanje *VIM* v možganskih tumorjih v primerjavi z normalnim možganskim tkivom. Kjer so bile možne analize tudi med posameznimi skupinami tumorjev in ne samo v primerjavi z normalnim tkivom, smo pregledali kako se *VIM* izraža med različnimi vrstami gliomov. Rezultati Oncomine so potrdili rezultate naših mikromrež, saj se je *VIM* zvišano izražal v glioblastomih v primerjavi z ostalimi vrstami gliomov v vseh treh analiziranih podatkovnih setih prav tako v primerjavi z oligodendrogliomi (slika 15). Izražanje *VIM* je torej povišano v možganskih tumorjih in še posebej izrazito pri glioblastomih.

Podoben profil izražanja kot *VIM* smo pri analizi naših cDNA mikromrež določili za *SPARC*, in sicer je bil zvišano izražen v možganskih tumorjih. Še posebej je bilo njegovo izražanje zvišano v primeru glioblastomov (slika 14). Po pregledu podatkov iz podatkovne zbirke smo v vseh analiziranih primerih (12) določili statistično značilno zvišano izražanje *SPARC* v primerjavi z normalnim tkivom pri tumorjih astrocitne in oligodendroglialne diferenciacije. Podatki so pripadali 7 različnim študijam molekularnega profiliranja gliomov. Na voljo je bila le ena analiza različnega izražanja *SPARC* med skupinami različnih vrst tumorjev. Tudi v tem primeru so se potrdili rezultati naših cDNA mikromrež, saj je bilo izražanje *SPARC* povečano v skupini astrocitomov v primerjavi s skupino ostalih vrst gliomov (slika 15). Sklepamo torej lahko, da je izražanje *SPARC* povišano v možganskih tumorjih – gliomih, še posebej v skupini glioblastomov.

Nasprotno kot v primerih *VIM* in *SPARC* je bilo izražanje *EEF1A1* znižano pri analizi mikromrež naših vzorcev. Po statistični analizi in hierarhičnem grupiranju smo določili, da je izražanje *EEF1A1* še posebej znižano v primerih nižjih stopenj gliomov astrocitne diferenciacije (difuzni in anaplastični astroцитomi) ter oligodendrogliomih (slika 14 in preglednica 7). Vendar pri preverjanju rezultatov s podatki ostalih študij tega rezultata nismo potrdili, saj je bilo po podatkih ostalih študij izražanje *EEF1A1* zvišano (slika 15).

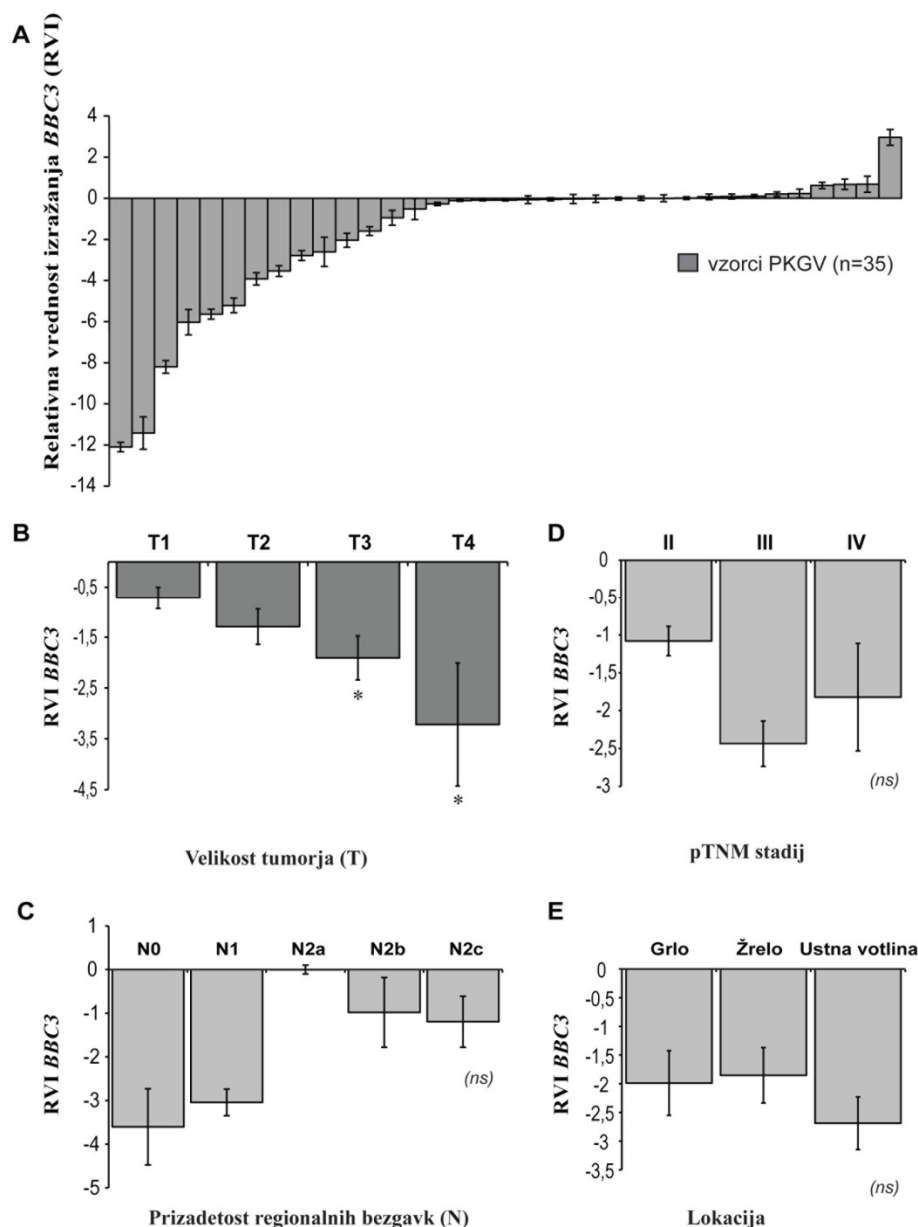
4.2.3 Izražanje apoptotičnih biomarkerjev pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu

V nadaljevanju smo analizirali spremembe v izražanju gena *BBC3* med tumorskimi in pripadajočimi normalnimi tkivi (Tajnik in sod., 2012). Pri 35 parih tumorskih in pripadajočih normalnih tkiv smo določili signifikantno zmanjšano izražanje *BBC3* v tumorskih tkivih ($p=0,002$) s povprečno relativno vrednostjo izražanja (RVI) -1,76. Rezultate prikazuje slika 16 (A).

Spremljali smo spremembe v izražanju *BBC3* v odvisnosti od velikosti tumorjev (T), prizadetosti regionalnih bezgavk (N), pTNM stadija ter lokacije tumorjev. S primerjavo skupin posameznih parametrov smo ugotovili statistično značilno povezavo med velikostjo tumorjev in izražanjem *BBC3* ($p=0,013$). Stopnja znižanega izražanja se je povečevala z velikostjo tumorjev (slika 16 (B)). Največjo spremembo smo zaznali pri primerjavi povprečnega izražanja gena v skupinah T3 ($p=0,041$) in T4 ($p=0,004$).

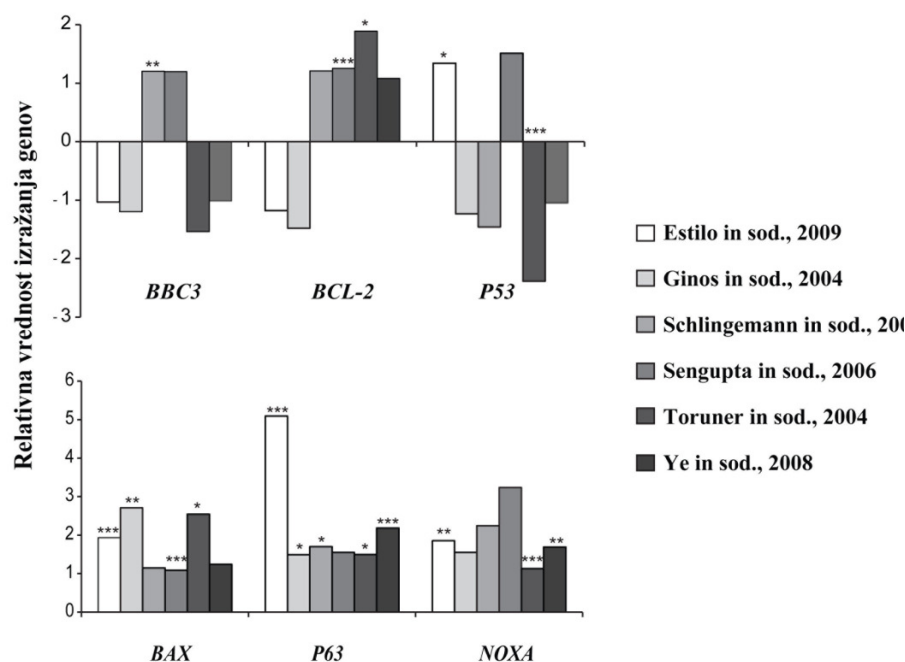
Z ostalimi histopatološkimi parametri nismo ugotovili povezave z izražanjem *BBC3*, in sicer smo analizirali izražanje glede na status N (slika 16 (C)), pTNM stadijem (slika 16 (D)) in lokacijami tumorjev (slika 16 (E)). Uporabili smo Kruskal-Wallis statistični test.

Izražanje *BBC3* je bilo analizirano tudi z uporabo cDNA mikromrež iz prosto dostopnih podatkovnih zbirk (slika 17). Pri podatkih šestih študij je bilo izražanje *BBC3* zmanjšano pri PKGV v štirih primerih, v dveh primerih je bilo zvišano. V nadaljevanju smo analizirali izražanje ostalih apoptotičnih genov. Izražanje *BCL2* in *TP53* genov ni sovpadalo z izražanjem *BBC3*. Izražanje ostalih apoptotičnih genov *BAX*, *TP63* in *NOXA* je bilo močno zvišano (slika 17).



Slika 16: qPCR rezultati izražanja *BBC3* pri PKGV in korelacija s pTNM parametri in lokacijo tumorjev. A) *BBC3* izražanje je signifikantno zmanjšano v PKGV tumorjih (Studentov t-test, $p=0,002$). B) Relativno izražanje *BBC3* je zmanjšano glede na naraščajočo stopnjo velikosti tumorjev (T), $p<0,05$. T1- 2 cm ali manj po najdaljši dimenziji, T2- med 2 in 4 cm, T3- več kot 4 cm, T4- invazija sosednjih tkiv. C) Izražanje *BBC3* ni bilo signifikantno spremenjeno glede na pTNM stadij. D) Različne lokacije tumorjev ne vplivajo na izražanje *BBC3*.

Figure 16: qPCR results of *BBC3* differential gene expression in HNSCC tumors and its correlation with pTNM parameters and tumor locations. A) *BBC3* is significantly down-regulated in HNSCC (Student t-test, $p=0.002$), B) Relative expression of *BBC3* was significantly down-regulated in HNSCC tumors according to tumor size classifier (T). Down-regulation was increased with a more extensive size of the tumor ($p<0.05$). T1 - 2 cm or less in greatest dimension, T2 - more than 2 cm but not greater than 4 cm, T3 - more than 4 cm, T4 - invaded adjacent structures. C) *BBC3* gene expression was not significantly correlated with involvement of regional lymph node status ($p>0.05$). D) Relative *BBC3* expression was not correlated with pTNM staging ($p>0.05$). E) Different HNSCC tumor locations did not show difference in *BBC3* expression profile ($p>0.05$).

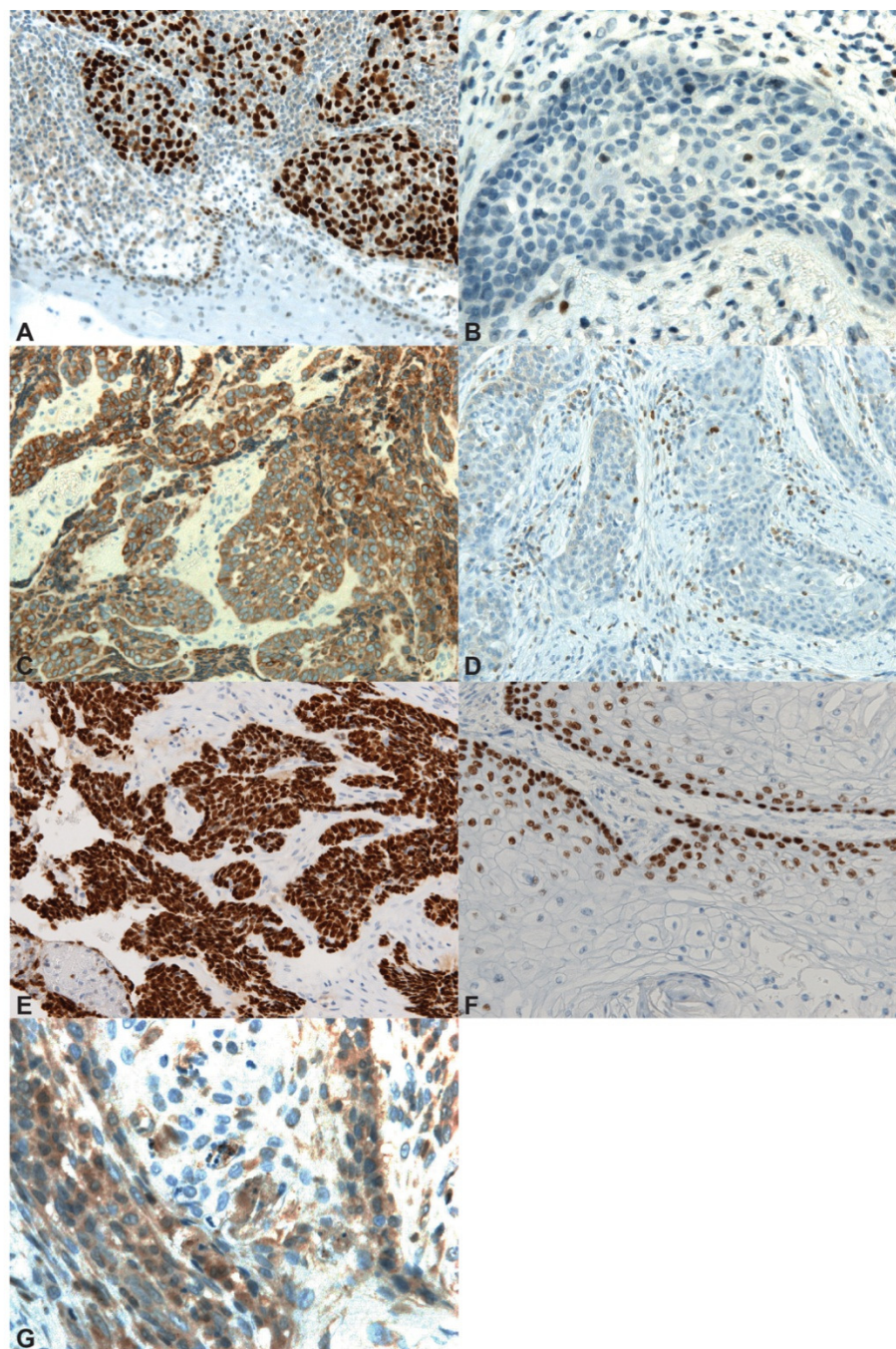


Slika 17: Izražanje apoptotičnih biomarkerjev z analizo mikromrež iz prosto dostopnih podatkovnih zbirk. Vrednosti izražanja *BBC3*, *BCL2*, *TP53*, *TP63* in *NOXA* so prikazane s faktorjem relativnega izražanja genov. Statistične vrednosti so podane kot: * p<0,05; ** p<0,01 in *** p<0,001.

Figure 17: Public available datasets microarray analysis of gene expression for various apoptotic biomarkers. Gene expression values for *BBC3*, *BCL2*, *TP53*, *BAX*, *TP63* and *NOXA* are visualized by their fold-change values. Statistical significance is shown by asterisks, where: * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001.

V nadaljevanju smo analizirali izražanje TP53, TP63, BCL2 in BAX na proteinskem nivoju z uporabo imunohistokemije (slika 18). Protein BAX je bil izdatno izražen v vseh tumorskih vzorcih. Njegovo izražanje je bilo primerljivo med vsemi vzorci (slika 18 (G)). Podobno kot BAX, je bilo tudi izražanje TP63 prisotno v vseh tumorskih vzorcih. V treh primerih, kjer je bila prisotna obilna keratinizacija, smo določili pozitivno izražanje TP63 v jedrih celic v manj kot 50 % tumorskih celic. V vseh ostalih primerih je bilo izražanje TP63 določeno v več kot 50 % celic (sliki 18 (E) in 18 (F)). Izražanje TP63 in BAX smo označili kot pozitivno.

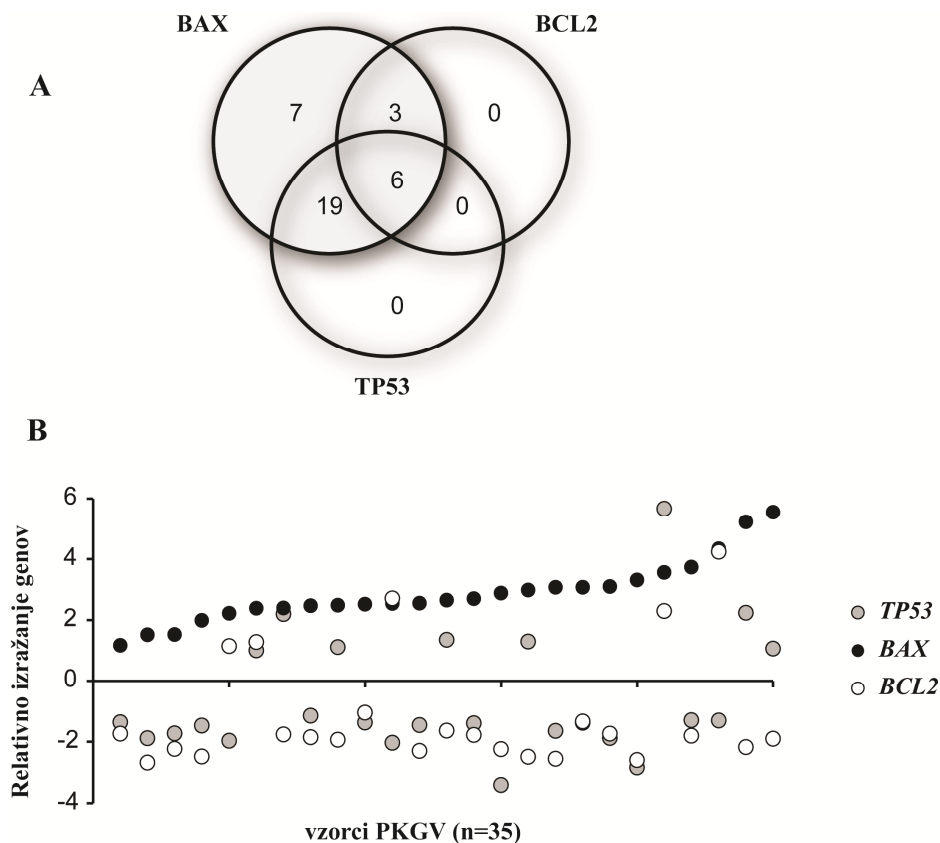
Izražanja BCL2 nismo zaznali v 26 od 35 vzorcev. Pri 9 vzorcih je bilo njegovo izražanje pozitivno. Natančneje, v dveh tumorskih vzorcih smo določili izražanje BCL2 v 10-50 % tumorskih celic in pri 9 vzorcih v več kot 50 % celic (sliki 18 (C) in 18 (D)). TP53 je bil detektiran v 25 od 35 tumorskih vzorcev. V 8 primerih smo izražanje določili v 10-50 % celic ter pri 17 vzorcih v več kot 50 % tumorskih celic (sliki 18 (A) in 18 (B)).



Slika 18: Izražanje TP53, BCL2, TP63 in BAX proteinov, detekcija z imunohistokemijo. A) Izražanje TP53 v več kot 50 % celičnih jeder. B) Ni izražanja TP53. C) Pozitivna reakcija BCL2 v citoplazmi vseh tumorskih celic. D) Negativna reakcija izražanja BCL2, z limfociti kot interno pozitivno kontrolo barvanja. E) Pozitivna reakcija TP63 v več kot 50 % jedrih celic. F) Pozitivna reakcija TP63 v več kot 10 % in manj kot 50 % tumorskih celic. G) Pozitivna reakcija BAX.

Figure 18: Expression of TP53, BCL2, TP63 and BAX proteins in HNSCC, detected by immunohistochemistry. A) Nuclear expression of TP53 in more than 50% of tumor cells. B) No TP53 expression. C) Cytoplasmic BCL2 positivity in all tumor cells. D) BCL2 negative reaction in tumor cells with small lymphocytes as internal positive staining control. E) Nuclear TP63 positivity in more than 50% of tumor cells. F) Nuclear TP63 positivity in less than 50 % but more than 10 % of tumor cells. G) Positive reaction for BAX.

Pripravili smo Vennov diagram analize izražanja TP53, BCL2 in BAX proteinov (slika 19 (A)). Poleg pozitivne reakcije BAX v vseh vzorcih sta bila proteina BCL2 in TP53 sočasno izražena v 6 vzorcih. Izražanje BCL2 brez TP53 je bilo določeno v treh tumorskih vzorcih. Pri 19 vzorcih s pozitivno reakcijo TP53 nismo zaznali izražanja BCL2.



Slika 19: Vennov diagram analize izražanja TP53, BCL2 in BAX za 35 analiziranih vzorcev PKGV ter podatki mikromrež izražanja genov *TP53*, *BCL2* in *BAX*. A) Z imunohistokemijo je bil BAX detektiran v vseh analiziranih vzorcih. V 6 vzorcih smo določili izražanje proteinov BCL2 in TP53. Izražanje BCL2 brez TP53 je bilo določeno v 3 tumorskih vzorcih. 19 TP53 pozitivnih vzorcev ni imelo izraženega proteina BCL2. B) Z uporabo podatkov cDNA mikromrež študije Ginos in sod. (2004) smo določili zvišano izražanje BAX pri vseh 25 analiziranih primarnih tumorjih PKGV. V dveh primerih sta bila BCL2 in TP53 hkrati zvišano izražena. Trend izražanja je bil usmerjen k znižanemu izražanju BCL2 in TP53, čeprav je pri 9 vzorcih vsaj eden izmed faktorjev kazal zvišano izražanje. V 14 vzorcih sta bila BCL2 in TP53 hkratno znižano izražena.

Figure 19: Venn diagram of TP53, BCL2 and BAX protein expression for 35 analysed HNSCC tumor samples and gene expression data from public available cDNA microarray dataset. A) In samples from our own cohort, BAX was detected in all of the analyzed samples using immunohistochemistry. In 6 samples, BCL2 and TP53 proteins were expressed. BCL2 without TP53 expression was detected in 3 tumor samples. 19 TP53 positive samples did not have BCL2 protein expressed. B) In the cDNA microarray dataset from Ginos *et al.* (2004) BAX expression was up-regulated in all 25 primary HNSCC tumors analysed. In 2 samples both BCL2 and TP53 were upregulated. There was increased trend of BCL2 and TP53 downregulation, although in 9 samples at least one of the BCL2 and TP53 factors were upregulated. In 14 samples BCL2 and TP53 were simultaneously down-regulated.

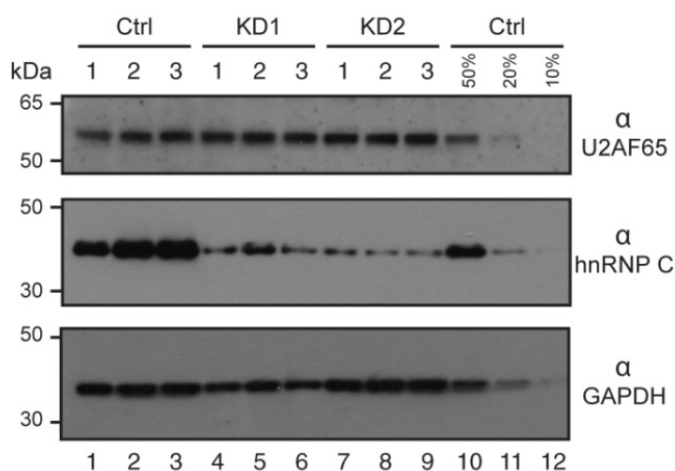
Nasprotno kot pri izražanju *BBC3*, na primerih izražanja proteinov nismo določili statistično značilnih povezav med TP53, BCL2 in BAX izražanjem ter parametri pTNM klasifikacije, lokacije tumorjev ali stadijem. Primerjali smo profile izražanja genov iz najbolj reprezentativnega seta podatkov cDNA mikromrež uporabljenega v naši študiji (Ginos in sod., 2004) za vsak posamezen tumorski vzorec (n=25, slika 19 (B)). Določili smo zvišano izražanje *BAX* v vseh analiziranih vzorcih. *BCL2* in *TP53* sta bila večinoma znižano izražena, s primeri hkratnega znižanega ali zvišanega izražanja oz. so bile spremembe njunega izražanja nasprotni. Pri le dveh vzorcih smo določili hkratno zvišano izražanje vseh treh genov (slika 19 (B)).

4.3 VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA

V okviru drugega dela doktorske naloge smo se ukvarjali z natančnejšo določitvijo molekularne funkcije proteina hnRNP C. Za ta namen smo uporabili predhodno objavljene podatke analize vezavnih mest proteina hnRNP C na pre-mRNA z metodo iCLIP (König in sod., 2010) ter RNA-seq podatke analize transkriptoma kontrolnih HeLa celic ter celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*. Ugotovili smo, da je ena izmed glavnih funkcij hnRNP C pri človeku ščitenje transkriptoma pred škodljivo eksonizacijo elementov Alu (Zarnack in sod., 2013).

4.3.1 Analiza in validacija iCLIP in RNA-seq podatkov

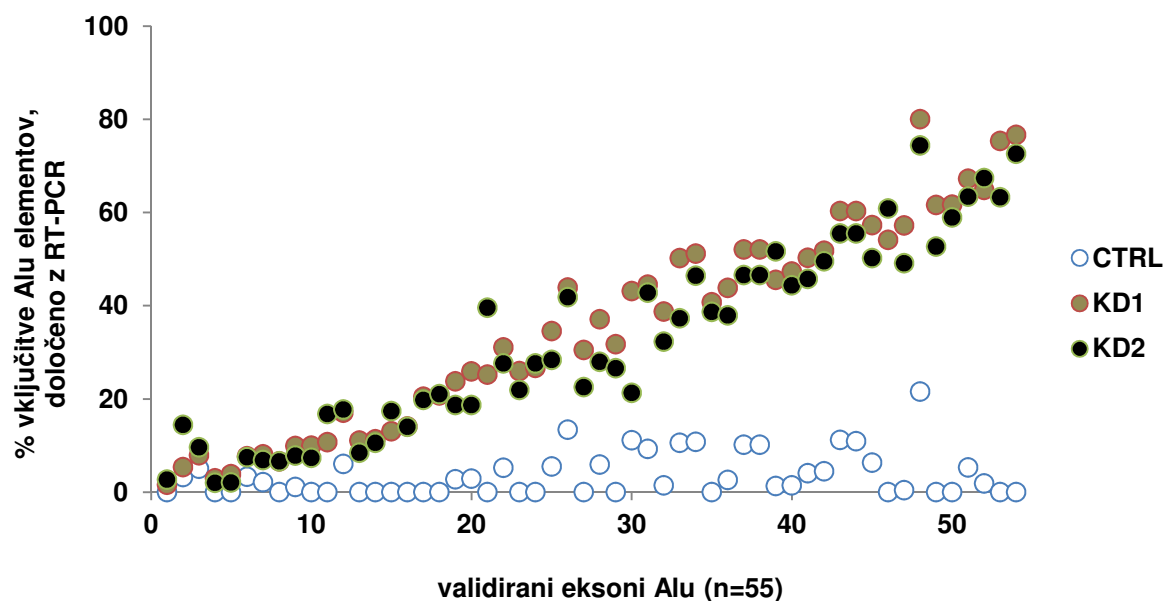
Prisotnost kriptičnih elementov Alu v transkriptih kontrolnih HeLa celic ter celic z znižanim izražanjem *HNRNPC* smo v okviru doktorske naloge preverili z analizo RT-PCR in detekcijo s kapilarno elektroforezo. RT-PCR je bil izveden z matričnimi RNA iz kontrolnih HeLa celic ter iz celic z zmanjšanim izražanjem proteina hnRNP C. Uspešnost znižanega izražanja smo dokazali s prenosom western. Ob tem izražanje U2AF65 ter endogene kontrole GAPDH ni bilo spremenjeno (slika 20). Uspešnost znižanja izražanja hnRNP C je bila določena na vrednost >80 %.



Slika 20: Izražanje proteina U2AF65 ni bilo spremenjeno v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*. Prenos western prikazuje zastopanost proteinov U2AF65, hnRNP C ter GAPDH v kontrolnih celicah (Ctrl, linije 1-3) ter v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC* (KD1 in KD2, linije 4-9), vsi rezultati v treh ponovitvah. Uspešnost znižanja izražanja je bila določena z redčitvami začetnega proteinskega vzorca, in sicer linije 10-12 prikazujejo 50 %, 20 % in 10 % redčitve. Določili smo okoli 80 % uspešnost znižanja izražanja do 20 % normalne vrednosti hnRNP C. Na levi strani je lestvica velikosti proteinov v kDa.

Figure 20: The protein abundance of U2AF65 are not affected by the *HNRNPC* knockdown. Western blot analyses with antibodies against U2AF65, hnRNP C and GAPDH (indicated on the right) comparing the protein abundances in control HeLa cells (Ctrl, lanes 1-3) and *HNRNPC* knockdown cells (KD1 and KD2, lanes 4-9) in triplicates. The *HNRNPC* knockdown efficiency was estimated to about 20% based on comparison with Ctrl lanes containing 50%, 20% and 10% of input material (lanes 10-12). A protein size marker in kDa is indicated on the left.

Za validacijo analize različne vključitve Alu eksonov v transkripte, ki so bili detektirani z bioinformacijsko analizo DEXSeq ter eksone, katerih izražanje je bilo vsaj 2-krat povečano v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC* smo uporabili semikvantitativno metodo RT-PCR. Potrjenih je bilo 39 od 43 (91 %) izbranih eksonov iz analize DEXSeq (slika 22) ter 16 od 20 (80 %) eksonov z več kot 2-kratno povečanim izražanjem (slika 23). V kontrolnih celicah so bili Alu eksoni le minimalno izraženi v primerjavi s celicami z znižanim izražanjem *HNRNPC*, kjer je bila prisotna do 90 % vključitev elementov Alu (slika 21 in priloga A). Ta rezultat nam potrjuje, da hnRNP C protein ščiti transkriptom pred nevarno eksonizacijo kriptičnih eksonov, še posebej elementov Alu.

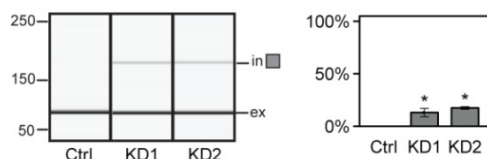
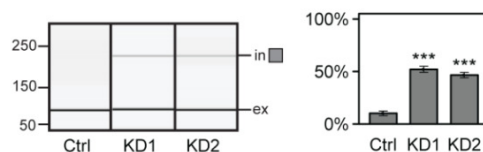
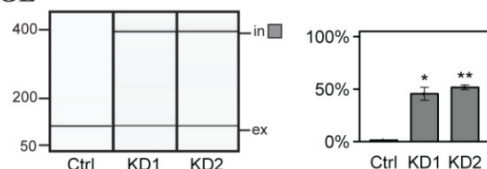
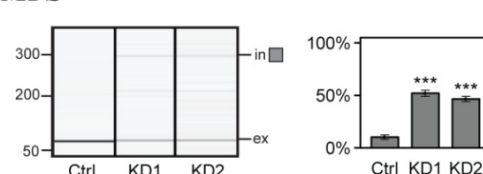
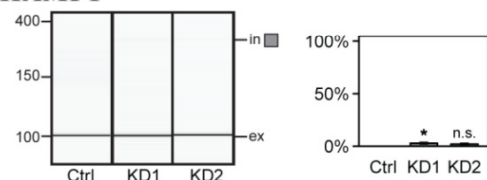
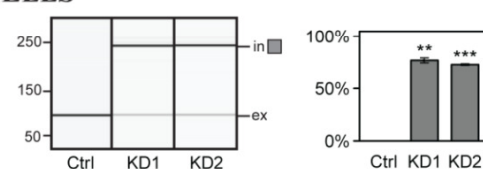
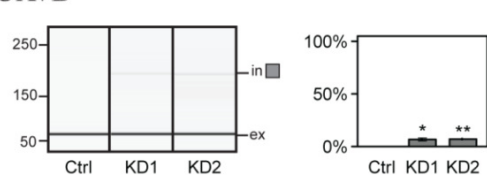
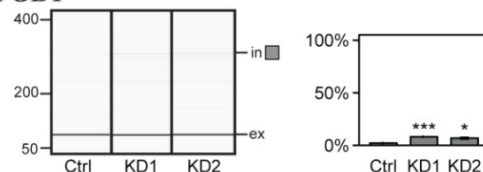
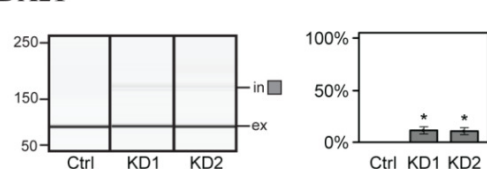
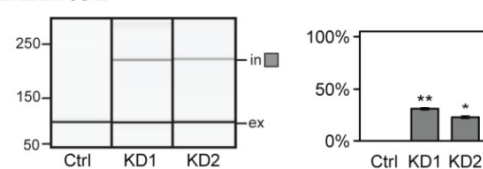
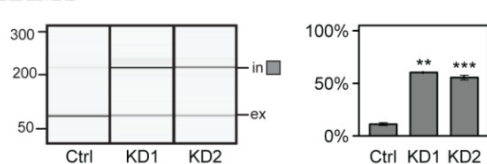
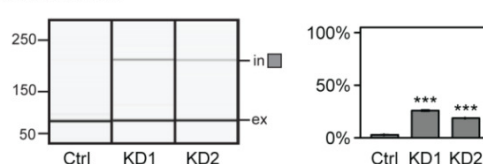
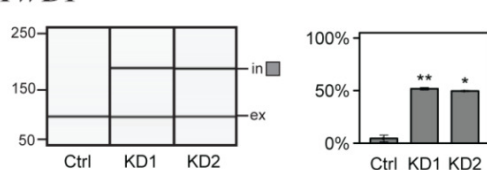
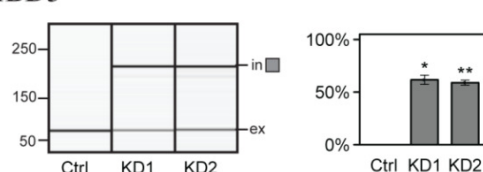


Slika 21: Validacija vključitve elementov Alu v transkripte kontrolnih HeLa celic ter celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*. CTRL: kontrolne celice; KD1 in KD2: pogoji z znižanim izražanjem *HNRNPC*, dva različna eksperimenta. Slika prikazuje delež transkriptov z vključenim alternativnim eksonom oz. kriptičnim elementom Alu.

Figure 21: Validation of Alu elements exonization (n=55) in control HeLa cells (CTRL) and upon *HNRNPC* knockdown (KD1 and KD2). On the figure there are presented percentages of Alu inclusions in mature transcripts in each cell type.

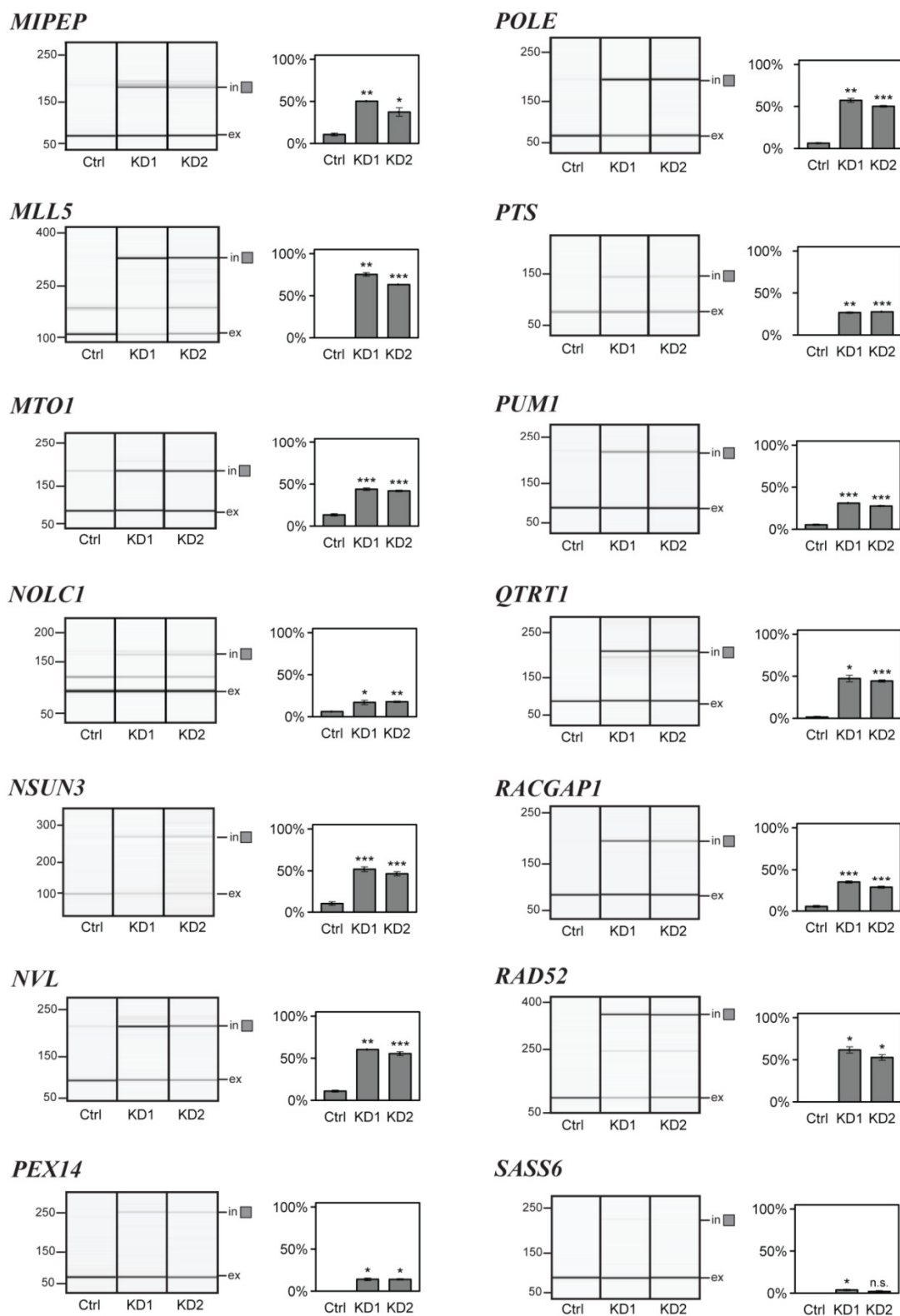
Rezultate kapilarne elektroforeze, vizualizirane v obliki gela s sistemom QIAxcel ter pripadajoče vrednosti posameznih izooblik, smo posebej predstavili za vsak validiran Alu alternativni ekson. Sliki 22 in 23 prikazujeta rezultate validacije vključenih Alu eksonov v kontrolnih celicah in celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*, ki so bili določeni z bioinformacijsko metodo DEXSeq (slika 22) ter tistih, ki so bili vsaj 2-kratno spremenjeno izraženi v HeLa celicah in niso bili določeni z DEXSeq (slika 23). Na grafih so predstavljene povprečne vrednosti vključitve elementov Alu v mRNA.

V prilogah A in B so zbrani natančnejši rezultati RT-PCR analize eksonizacije elementov Alu s pripadajočimi lokacijami v genomu in njihova opisna imena.

ABCC5***EI24******AGL******GMPS******CHAMP1******HELLS******COX7B******ITGB1******DDX21******KIAA1432******DRAM1******LOH12CR1******DTWD1******MBD3***

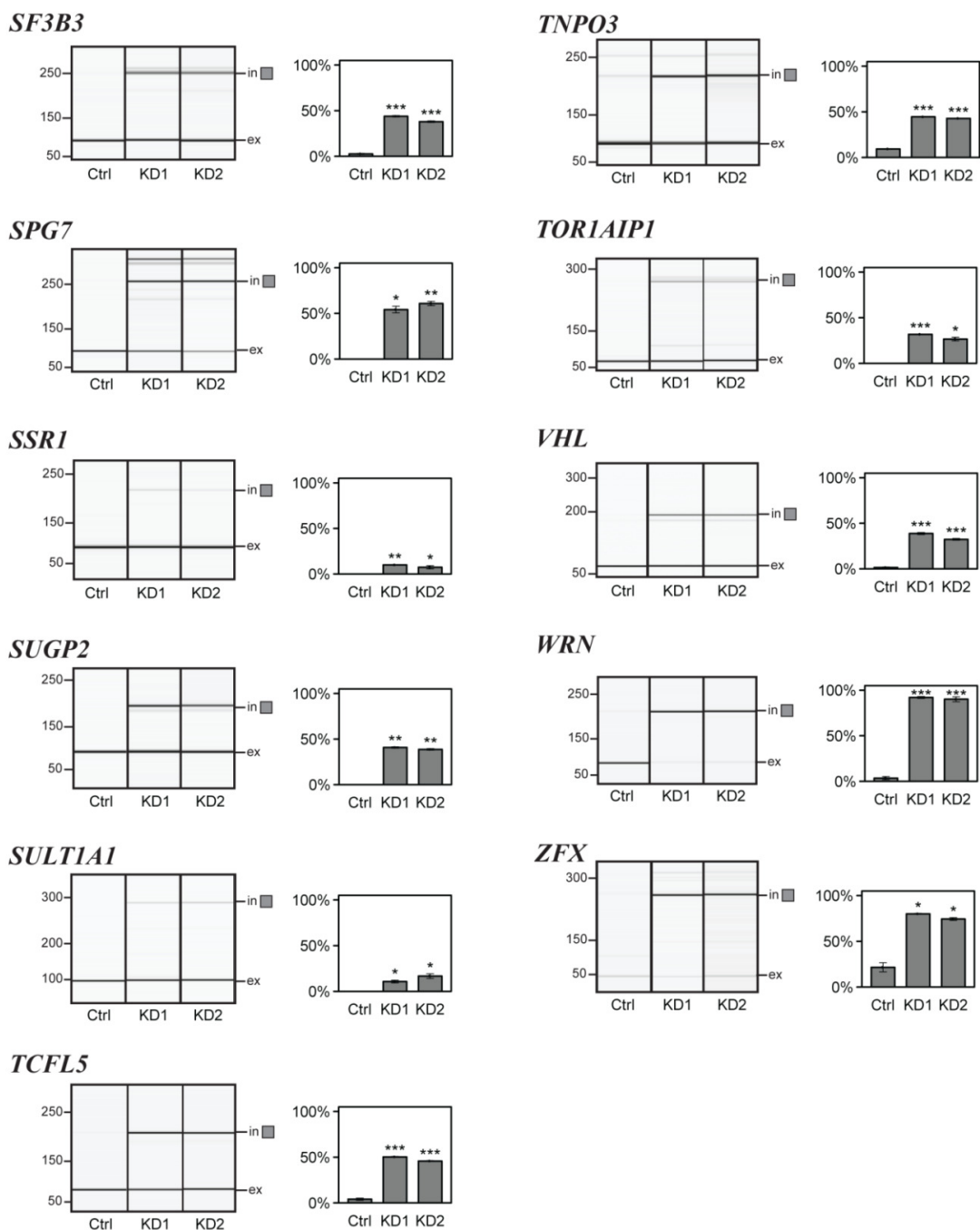
Slika 22: Rezultati kvantifikacije DEXSeq Alu eksonov z analizo RT-PCR in kapilarno elektroforezo (se nadaljuje)

nadaljevanje slike 22



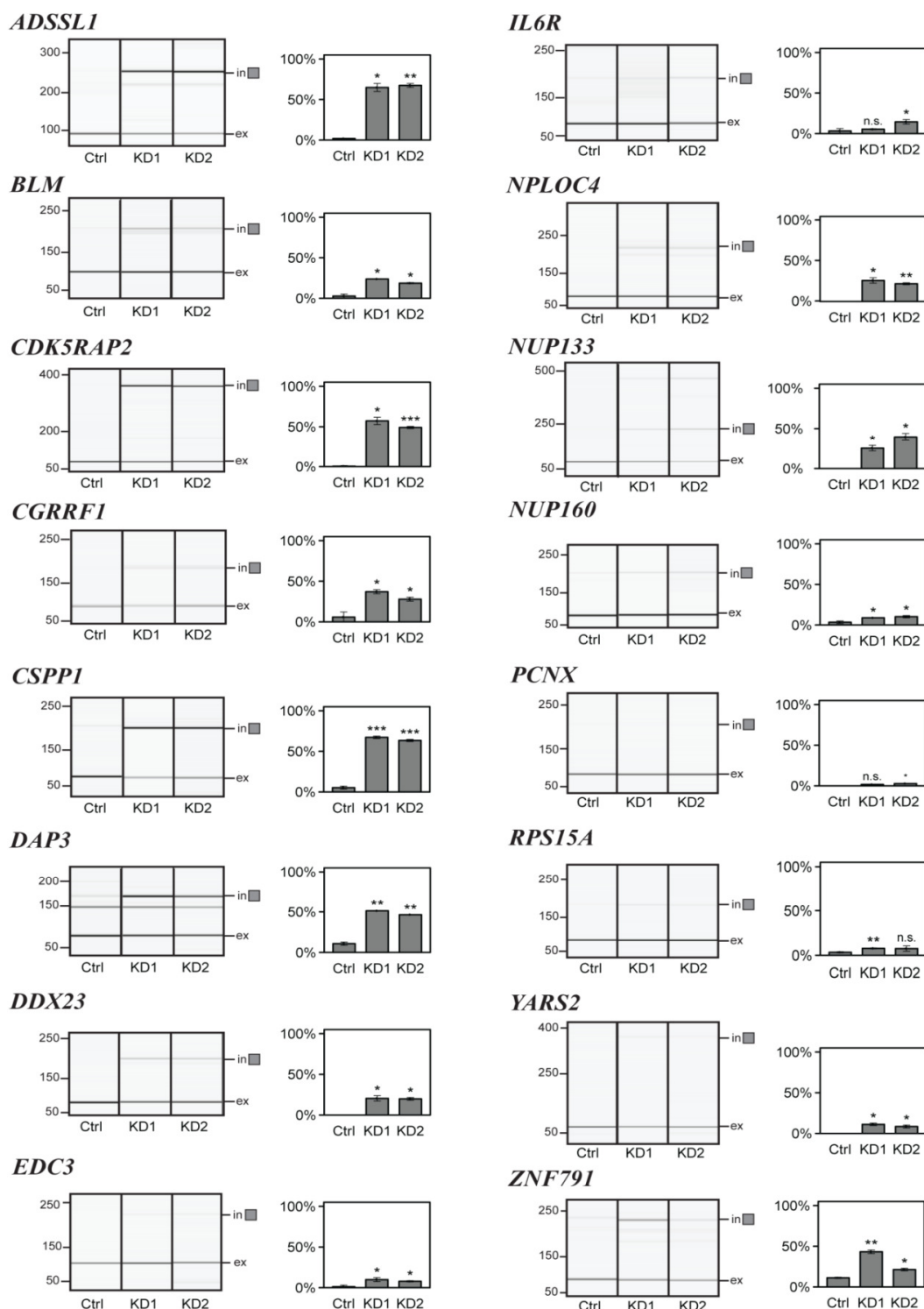
Slika 22: Rezultati kvantifikacije DEXSeq Alu eksonov z analizo RT-PCR in kapilarno elektroforezo (se nadaljuje)

nadaljevanje slike 22



Slika 22: Rezultati kvantifikacije DEXSeq Alu eksonov z analizo RT-PCR in kapilarno elektroforezo. Validirali smo 39 od 43 analiziranih vključitev elementov Alu. Ctrl- kontrolne HeLa celice, KD1 in KD2 – znižano izražanje *HNRNPC*. Studentov t-test: n.s. nesignifikantno, $p > 0,05$; * $0,05 > p > 0,001$; ** $0,001 > p > 0,0001$; *** $p < 0,0001$; ex- izključitev in in-vključitev. Vsi eksperimenti v treh ponovitvah.

Figure 22: RT-PCR validation of Alu exons with significant splicing changes according to DEXSeq and quantified using capillary electrophoresis. We could validate 39 out of 43 tested Alu exon inclusions. In-inclusion, ex- exclusion. The significance level (Student's t-test): n.s., non-significant; * p value < 0.05 ; ** p value < 0.001 ; *** p value < 0.0001 . All the experiments were performed in triplicates.



Slika 23: Kvantifikacija RT-PCR produktov detektiranih elementov Alu, ki so vsaj 2-kratno spremenjeno izraženi v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*, vendar niso bili detektirani z DEXSeq. Validiranih je bilo 16 od 20 testnih vključitev elementov Alu. Oznake kot na sliki 22.

Figure 23: RT-PCR validation of Alu exons with non-significant splicing changes according to DEXSeq. We could validate 16 out of 20 tested Alu exons that show significantly changed inclusion in the *HNRNPC* knockdown (KD1 and KD2). Legend as in Figure 22.

4.2.2 Vpliv polimorfizmov na vključitev alternativnih Alu eksonov

Eksoni, katerih izražanje je uravnavano z hnRNP C, so bili v njegovi odsotnosti uravnavani oz. vezani z U2AF65, kar je povzročilo njihovo vključitev v nastale transkripte (podatki iCLIP; Zarnack in sod., 2013). Ti rezultati so nakazovali, da hnRNP C preprečuje izražanje alternativnih eksonov z direktno kompeticijo prepoznavne vezavnih mest na pre-mRNA z U2AF65. Za preverjanje tega dejstva smo uporabili sistem reporterskih minigenov.

Na primeru regulacije alternativnega Alu eksona v genu *CD55* smo pokazali, da znižano izražanje *HNRNPC* vodi do povečanja vezave U2AF65 (Zarnack in sod., 2013). To ima za posledico močno povečanje vključitev Alu eksonov v mRNA. Da je integriteta oz. zaporedje uridinskega trakta pomembno za vezavo hnRNP C, smo poleg minigena s pravilnim genomskim zaporedjem (*CD55_wt*) pripravili tudi minigene, katerim smo z usmerjeno mutagenezo spremenili zaporedja polipirimidinskih traktov obratnosmernih elementov Alu. Z zamenjavo le dveh nukleotidov v zgornjem uridinskem traktu elementa Alu (*CD55_3mut*) smo zmanjšali vezavo hnRNP C in posledično povečali vključitev elementa Alu v zrelo mRNA (slika 24). S tem smo potrdili, da je močna afiniteta vezave hnRNP C izrednega pomena pri kompeticiji z U2AF65.

Ker pa je bilo predhodno že pokazano, da se hnRNP C veže na obeh koncih reguliranih eksonov (König in sod., 2010), smo v minigene uvedli še mutacije v spodnjem uridinskem traktu Alu eksonov (*CD55_5mut*) ter minigene s kombinacijo obeh mutacij (*CD55_3mut5mut*). Dodatne mutacije v spodnjem uridinskem traktu (*CD55_5mut*) so še dodatno povečale vključitev alternativnega eksona ter v primeru mutacij v obeh uridinskih traktih (*CD55_3mut5mut*) skoraj popolnoma zaustavile regulacijo z hnRNP C (slika 24).

Iz rezultatov minigena *CD55* lahko sklepamo, da točkovne mutacije, ki spremenijo vezavo hnRNP C povzročijo vključitev Alu eksona v novo nastali transkript.

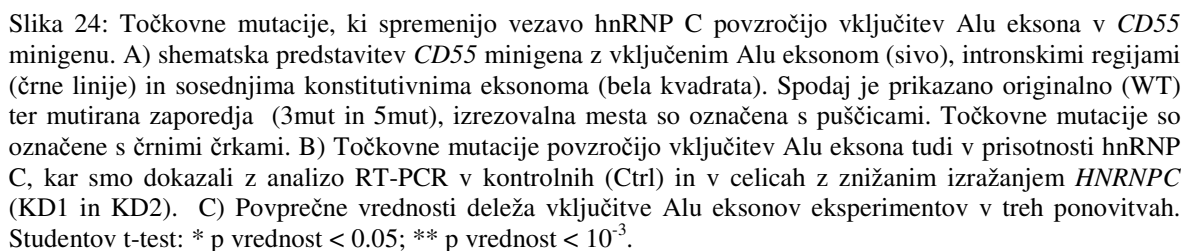
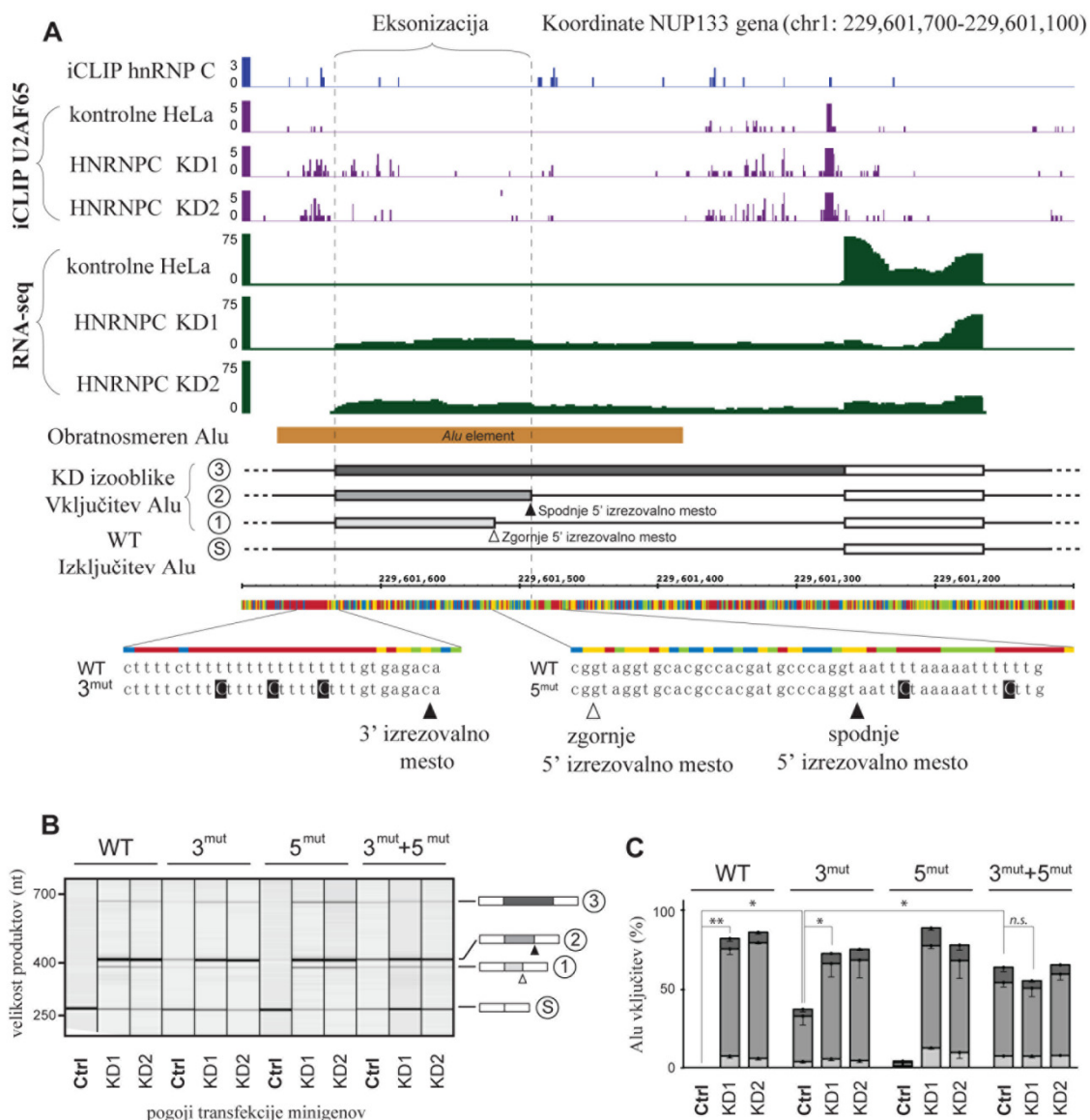


Figure 24: Point mutations that impair hnRNP C-binding promote inclusion of the Alu exon in the *CD55* minigene. A) Schematic overview of the minigene including the Alu exon (grey), introns (black lines) and two flanking exons (grey squares). The original sequence (WT) as well as the mutated sequence surrounding the 3' and 5' splice sites (3mut and 5mut) are shown below. The introduced point mutations are highlighted in black. B) The point mutations allow Alu exon inclusion in the presence of hnRNP C, evaluated by RT-PCR monitoring of inclusion or suppression of the Alu exon in the minigenes with wildtype (WT) or mutated sequences (3mut, 5mut) in HNRNPC knockdown (KD1 and KD2) and control HeLa cells (Ctrl). C) Average Alu exon inclusion in percent from three replicate RT-PCR experiments. Levels of significance (*: p value < 0.05; **: < 10⁻³; Student's t-test).

Z namenom dodatne potrditve vplivov hnRNP C na uravnavanje eksonizacije elementov Alu smo pripravili minigen *NUP133*. Le-ta vsebuje element Alu, ki v normalnem fiziološkem stanju celic ni del transkripta, postane pa ekson v odsotnosti hnRNP C. Podobno kot pri *CD55* minigenu, smo v zgornje uridinsko zaporedje elementa Alu uvedli 3 točkovne mutacije ter v spodnje uridinsko zaporedje 2 mutaciji, kar je povzročilo eksonizacijo elementa Alu in popolnoma izničil utišanje kriptivnega eksona z hnRNP C. Rezultate prikazuje slika 25.



Slika 25: hnRNP C preprečuje eksonizacijo elementa Alu v *NUP133* minigenu preko kompeticije z U2AF65. A) Prikaz genomskega zaporedja elementa Alu (oranžno) in spodnjega eksona v genu *NUP133*. hnRNP C iCLIP podatki (modro) prikazujejo stopnjo vezave hnRNP C na uridinska zaporedja elementa Alu. Nizek delež vezave je bil detektiran za protein U2AF65 (vijolično) v kontrolnih celicah in večji delež v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC* (KD1 in KD2). Podatki RNA-seq so označeni z zeleno barvo in prikazujejo eksonizacijo elementa Alu v treh različnih izooblikah pri eksperimentih KD1 in KD2. Izooblike so shematično označene: S predstavlja izoobliko brez elementa Alu, izooblike 1 in 2 vključitev Alu z uporabo dveh različnih 3' izrezovalnih mest in izooblika 3 eksonizacijo elementa Alu z uporabo različnega 3' izrezovalnega mesta spodnjega eksona. Spodnji del prikazuje mesta mutacij (črno) v minigenih 3^{mut} in 5^{mut}. B) Rezultat eksonizacije elementov Alu v kontrolnih celicah (Ctrl) ter z znižanim izražanjem *HNRNPC* (KD1 in KD2). Minigen z originalnim zaporedjem prikazuje povečanje Alu eksonizacije v KD1 in KD2 ter odsotnost eksonizacije v kontrolnih celicah. Mutirani minigeni prikazujejo eksonizacijo že v kontrolnih celicah in nadalje minigen z mutiranimi obema uridinskima zaporedjema popolno odsotnost regulacije z hnRNP C. C) Povprečne vrednosti izooblik z vključenimi elementi Alu, pridobljene z analizo RT-PCR in detekcijo s kapilarno elektroforezo, tri ponovitve. Različne izooblike so prikazane z barvami (izooblika 1: svetlo siva, izooblika 2: siva, izooblika 3: temno siva). p vrednosti določene s Studentovim t-testom: * p vrednost < 0.05; ** < 10⁻³; ***: < 10⁻⁴; n.s.: ni signifikantno.

Figure 25: hnRNP C suppresses the exonization of an Alu element in the *NUP133* gene through competition with U2AF65. A) Alu element (orange) plus the downstream exon within the *NUP133* gene. hnRNP C iCLIP data (blue) show crosslinking at the upstream and the linker U-tract. Little U2AF65 crosslinking (purple) is detected at the U-tracts in control cells, while strong crosslinking is observed in the *HNRNPC* knockdowns (KD1 and KD2). RNA-seq data (green) show exonization of the Alu element in both knockdowns. The corresponding isoforms: Alu suppression in isoform S, Alu inclusion in isoform 1 and 2 (differing in the usage of an upstream or downstream 5' splice site) and Alu inclusion using an alternative 3' splice site for the downstream exon (isoform 3). The wildtype (WT) sequence including the introduced point mutations (3mut and 5mut) are shown below. The positions of the point mutations are highlighted by black squares. B) U-to-C transitions promote Alu exonization in the presence of hnRNP C. The WT minigene shows no Alu exonization in control cells (Ctrl) and a significant increase in isoforms 1-3 in the KD1 and KD2. Mutations in the upstream U-tract (3mut) show significant inclusion of isoforms 1-3 in control cells. Additional T-to-C transitions in the linker U-tract (5mut) further elevate the inclusion of isoforms 1-3 in control cells and prevent any further regulation by hnRNP C (KD1 and KD2). C) Average Alu exon inclusion in percent for three replicate RT-PCR experiments. Different levels of significance: *: p value < 0.05; **: < 10⁻³; ***: < 10⁻⁴; n.s.: not significant; Student's t-test).

4.2.3 Vpliv polimorfizmov v elementih Alu na razvoj bolezni

Vlogo hnRNP C pri eksonizaciji elementov Alu, ki lahko vodi do pojava bolezenskih stanj, smo raziskovali na primeru eksonizacije elementa Alu v *PTS* genu, kjer delecija zgornjega uridinskega zaporedja vodi do vključitve eksona Alu preko spodnjega polipirimidinskega zaporedja in privede do razvoja hiperfenilalaninemije (Meili in sod., 2009). Z uporabo podatkov iCLIP smo na uridinskem zaporedju elementa Alu v *PTS* genu detektirali močno vezavo hnRNP C in s podatki RNA-seq eksonizacijo elementa Alu v pogojih z znižanim izražanjem *HNRNPC* (slika 26 (A)).

Pripravili smo minigene z vključenim genomskim zaporedjem bolezensko pomembne regije *PTS* gena z namenom, da preverimo ali omenjena delecija prepreči utišanje elementa Alu s proteinom hnRNP C. V primeru *PTS* minigena brez bolezensko pomembne delecije (WT) smo ugotovili, da je bila v kontrolnih HeLa celicah eksonizacija elementa Alu skoraj ničelna. V celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC* se je vključitev Alu eksona močno povečala (slika 26 (B) in (C)). S tem smo pokazali, da hnRNP C uravnava izražanje kriptičnega elementa Alu in preprečuje njegovo eksonizacijo. Analiza *PTS* minigena z bolezensko delecijo je pokazala, da odstranitev uridinskega zaporedja onemogoči preprečitev eksonizacije elementa Alu z hnRNP C. Vezava hnRNP C je izjemnega pomena pri zagotavljanju preprečitve nevarne eksonizacije elementov Alu, kar lahko privede do razvoja različnih obolenj.

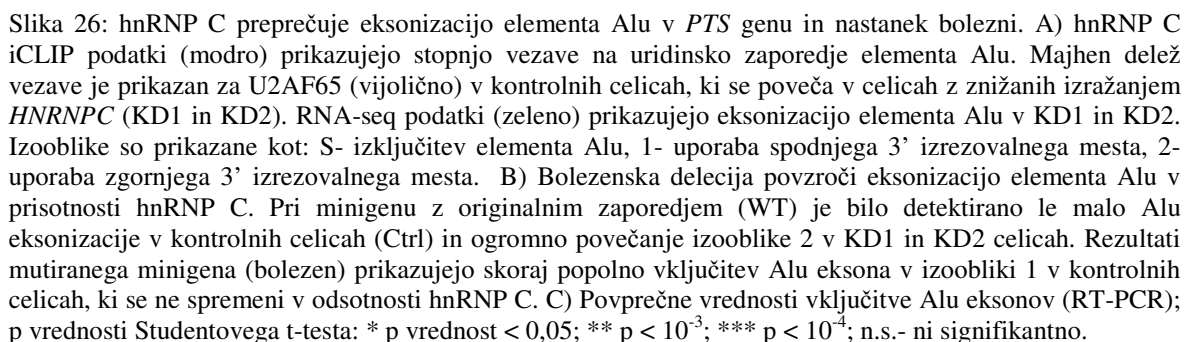


Figure 26: hnRNP C repression of Alu exonization in the *PTS* gene is relevant for disease. A) View of disease relevant Alu element (orange) within the *PTS* gene. hnRNP C iCLIP data (blue) show crosslinking at the U-tract of the Alu element. Little U2AF65 crosslinking (purple) is detected at the U-tract in control cells and strong crosslinking in the *HNRNPC* knockdowns (KD1 and KD2). RNA-seq data (green) show exonization of the Alu element. The corresponding isoforms: Alu suppression in isoform S, usage of the downstream 3' SS in isoform 1 (light grey) and usage of the upstream 3' SS in 2. B) The disease-associated deletion promotes Alu exonization in the presence of hnRNP C. The WT minigene shows little Alu exonization in Ctrl and a significant increase in isoform 2 inclusion in the KD1 and KD2. A disease minigene (bolezon) shows almost complete inclusion of isoform 1 in Ctrl. The inclusion of isoform 1 is not further elevated in the *HNRNPC* knockdowns. C) Average Alu exon inclusion in percents. Student's t test: *: p value < 0.05; **: < 10⁻³; ***: < 10⁻⁴; n.s.: not significant.

5 RAZPRAVA

5.1 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV PRI MALIGNIH TUMORJIH

Profile izražanja genov pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu (PKGTV) in možganskih tumorjih gliomih smo določali z dvobarvnimi oligonukleotidnimi cDNA mikromrežami.

Pri PKGV smo pri pregledu molekularnih funkcij genov s spremenjenim izražanjem ugotovili, da več določenih spremenjeno izraženih genov sodeluje pri endopeptidazni aktivnosti (*USP11*, *SLPI*, *CTSK*). Znižano izražanje *SLPI* smo nadalje potrdili z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR). Znano je, da je invazivnost tumorskih celic v veliki meri povezana z aktivacijo proteaz (Pantel in Brakenhoff, 2004). Spremenjeno razmerje proteaz in njihovih inhibitorjev, kamor spada tudi *SLPI*, je pomemben dejavnik sposobnosti invazije tumorskih celic (Devoogdt in sod., 2004). Gre za protein, katerega funkcija je nevtralizacija elastaze, triptaze in katepsina G. Izražanje *SLPI* je bilo določeno v več vrstah tumorskih vzorcev, vendar različne študije poročajo tako o znižanem kot o zvišanem izražanju (Bouchard in sod., 2006; Devoogdt in sod., 2004). V primeru znižanega izražanja nekateri avtorji poročajo o povezavi s povečano invazivnostjo tumorjev, kar nakazuje na dejstvo, da ima *SLPI* protitumorsko funkcijo (Tian in sod., 2004). Pri vzorcih PKGV je bilo predhodno že določeno znižano izražanje *SLPI* v primerjavi z normalnim tkivom (Wen in sod., 2011). Prav tako je bilo v neodvisni raziskavi potrjeno, da imajo tumorji PKGV višjih stadijev 5,9-kratno znižano izražanje *SLPI* v primerjavi s PKGV višjih stadijev (Cordes in sod., 2011).

Nekateri avtorji so mnenja, da odsotnost ali zmanjšano izražanje *SLPI* lahko povzroči širjenje tumorja zaradi omogočanja razgradnje sosednjega tkiva s povečano aktivnostjo proteaz tumorskega tkiva. Še posebno vlogo bi naj v tem pogledu predstavljala inhibicija elastaze, kar poruši ravnovesje strukturnih proteinov zunajceličnega matriksa (Yamaguchi in sod., 2000). Prav tako je lahko posledica znižanega izražanja *SLPI* zmanjšanje produkcije metaloproteinaz matriksa, še posebej MMP1 in MMP9, katerih pomembnost se kaže v njihovi vlogi pri invaziji tumorjev in metastaziranju (Zhang in sod., 1997).

Ob znižanem izražanju *SLPI* kot inhibitorju serinskih proteaz smo pričakovali, da bo izražanje serinske proteaze *CTSG* sočasno zvišano. Vendar qPCR podatki prikazujejo, da je na naboru enakih vzorcev izražanje *CTSG* prav tako znižano. To nakazuje, da ima znižano izražanje *SLPI* verjetno za posledico nezmožnost inhibicije drugih serinskih proteinaz, kot so npr. plasmin, subtilizin A, elastaza, tripsin in kimotripsin. Kot pomembni molekularni markerji raka iz družine serinskih proteaz se pogosto pojavljajo tudi kalikreini (Lopez-Otin in Matrisian, 2007). V skupini kalikreinov je 15 proteinov, veliko od njih je zvišano izraženih pri več vrstah tumorjev v primerjavi z normalnim tkivom (Yousef in Diamandis, 2003). Za proteazo KLK4 je bilo med drugim ugotovljeno, da sodeluje pri razgradnji proteinov zunajceličnega matriksa, kar povzroči invazijo rakavih celic (Debela in sod., 2008; Paliouras in sod., 2007). V primeru raka glave in vratu so ugotovili prekomerno izražanje več predstavnikov kalikreinov, ki je bilo povezano s slabšo napovedjo poteka bolezni (Pettus in sod., 2009; Zhao in sod., 2011). Predvidevamo torej, da znižano izražanje *SLPI* vpliva na zmanjšanje inhibicije in posledično zvišano izražanje drugih serinskih proteaz in ne *CTSG*, vendar te predpostavke zahtevajo nadaljnje potrditve, tako na genetskem kot na proteinskem nivoju.

Pri potrditvi zmanjšane izražanja *CTSK* pri PKGV z uporabo cDNA mikromrež smo pridobili nasprotno rezulate, in sicer je bilo po analizi qPCR na naboru večjega števila vzorcev PKGV izražanje *CTSK* zvišano. Glede na to, da je bila analiza qPCR izvedena na naboru večjega števila vzorcev in ker gre za bolj občutljivo metodo analize izražanja genov kot so cDNA mikromreže, s podatki naše študije ne moremo potrditi spremenjenega izražanja *CTSK*. Pri več vrstah rakavih obolenj se je namreč pokazalo, da je izražanje *CTSK* zvišano v primerjavi z normalnim tkivom ter še posebej sovпада s statusom invazivnosti tumorskega tkiva in slabšo napovedjo preživetja bolnikov (Cordes in sod., 2009; Kleer in sod., 2008; Nagler in sod., 2004; Quintanilla-Dieck in sod., 2008; Yan in sod., 2011). Rezultati naše analize zahtevajo uporabo dodatnih metod potrditve oz. večje število analiziranih vzorcev PKGV.

Pri analizi mikromrež gliomov so se po hierarhičnem grupiranju analizirani vzorci porazdelili v tri večje skupine, in sicer so v eni skupini pretežno zajeti vzorci glioblastomov, v drugi skupini vzorci nižjih stopenj astrocitomov (predvsem difuzni in en anaplastični astrocitom) ter v tretji skupini pretežno oligodendrogliomi. Prav tako lahko

opazimo, da sekundarna glioblastoma (tj. glioblastoma, ki sta se razvila preko predstopenj astrocitomov) po molekularnem profilu cDNA mikromrež ne sovpadata s skupino primarnih glioblastomov, kar je verjetno posledica različnih molekularno-genetskih poti, ki privedejo do nastanka obeh vrst glioblastomov (Ohgaki in Kleihues, 2007; Tso in sod., 2006). Prav tako je bilo glede na različne stopnje malignosti spremenjeno znižano izražanje *VIM* in *SPARC* ter zvišano izražanje *EEF1A1*. Izražanje *VIM* in *SPARC* je bilo zvišano tudi pri pregledu rezultatov mikromrež ostalih študij gliomov, vendar zahteva dodatno potrditev z uporabo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR). Zvišanega izražanja *EEF1A1* nismo potrdili s preverjanjem rezultatov ostalih študij. Za *EEF1A1* tako ne moremo z gotovostjo trditi, da se znižano izraža v gliomih.

Pri analizi izražanja apoptičnih proteinov pri PKGV smo s qPCR ugotovili znižano izražanje *BBC3* v tumorskih vzorcih. Trend izražanja *BBC3* se je zmanjševal glede na naraščajočo velikost tumorjev oz. statusom T pTNM klasifikacije. Izražanje *BBC3* in izbranih apoptotičnih proteinov smo primerjali s podatki mikromrež ostalih študij. Izražanje *BCL2* in *TP53* ni sovpadalo z izražanjem *BBC3*, kar nakazuje, da je delovanje *BBC3* neodvisno od *TP53* pri PKGV. Izražanje ostalih apoptotičnih genov *BAX*, *TP63* in *NOXA* je bilo močno zvišano.

Znižano izražanje *BBC3* pri PKGV sovпада z zmanjšano sposobnostjo apoptoze - enega ključnih dejavnikov nastanka tumorjev. V naši raziskavi smo analizirali izražanje *BBC3* glede na primerjavo različnih histopatoloških parametrov. V primeru PKGV so na ta način že analizirali proteine družine *BCL2*, in sicer so pri bolnikih z zvišanim izražanjem proteina *BBC3* opazili povezavo s ponovno pojavnostjo tumorja oz. slabšo napovedjo preživetja (Coutinho-Camillo in sod., 2010). Naši rezultati so torej v nasprotju z rezultati te študije, kar je verjetno posledica različnega vzorčenja, lokacij tumorjev, različnih skupin histopatoloških parametrov, uporabljenih metod oz. post-transkripcijske regulacije izražanja genov, ki povzroči, da profili izražanja na mRNA in proteinskem nivoju med seboj niso primerljivi.

Ker je znano, da izražanje *BBC3* povzroči zaviranje rasti tumorjev (Yu in sod., 2001) ni presenetljivo, da smo določili korelacijo znižanega izražanja *BBC3* in statusom velikosti tumorjev (T). Na nivoju celičnih linij je bilo predhodno pokazano, da je sposobnost tvorbe

kolonij celic po transfekciji vektorja z zapisom za *BBC3* bistveno zmanjšana kot po transfekciji kontrolnega vektorja (Hoque in sod., 2003). Zmanjšano izražanje gena *BBC3*, določeno pri višjih vrednostih statusa T oz. pri večjih tumorjih, je torej lahko vzrok rasti tumorjev. To dejstvo potrjuje tudi študija z uporabo živalskih modelov, kjer se je velikost tumorjev pri miših z izničnim *Bbc3* bistveno povečalo v primerjavi z normalno linijo (Qiu in sod., 2009).

Vloga *BBC3* v procesu apoptoze do danes še ni povsem pojasnjena. Predvideva se, da lahko deluje odvisno ali neodvisno od TP53 (Yu in Zhang, 2008). Tako lahko aktivira kompleks BAX/BAK z neposredno vezavo proteinov družine BCL2 ali pa preko vezave TP53. Z našimi rezultati imunohistokemije smo ta model potrdili. V vseh primerih smo namreč zaznali izražanje BAX, kar je potrdilo prisotnost apoptoze. V več kot 70 % primerov smo ugotovili, da je protein TP53 nedelujoč in od teh je bilo 6 primerov pozitivnih za izražanje proteina BCL2, ki je lahko direktno aktiviran z BAX. V le treh primerih sta bila odsotna tako TP53 kot BCL2. Prav tako smo določili izražanje TP63 kot pozitivno v več kot 80 % PKGV vzorcev. Čeprav njegova vloga v apoptozi še ni povsem določena, je bilo pokazano, da izbitje gena *Tp53* povzroči aktivacijo *BBC3* in *NOXA* (Rocco in sod., 2006). Ker je bilo izražanje TP63 močno pozitivno v večini vzorcev z znižanim izražanjem *BBC3*, lahko to dejstvo z rezultati naše analize potrdimo.

Z analizo izražanja apoptotičnih markerjev na proteinskem nivoju z uporabo imunohistokemije pri PKGV smo tako potrdili model *BBC3*-odvisne apoptoze, kjer lahko *BBC3* deluje odvisno ali neodvisno od TP53 (Tajnik in sod., 2012). Ne nazadnje pa naši rezultati še bolj poudarjajo dejstvo, da *BBC3* in ostali proteini BCL2 družine sodelujejo pri kompleksnem mehanizmu apoptotične reakcije, ki je odvisna od natančnega ravnovesja pro- in anti-apoptotičnih proteinov.

5.2 VPLIV POLIMORFIZMOV V INTRONSKIH REGIJAH NA REGULACIJO ALTERNATIVNEGA IZREZOVANJA

V okviru drugega dela doktorske naloge smo določali natančnejšo molekularno funkcijo proteina hnRNP C. Pri določitvi vezavnih mest proteina hnRNP C na pre-mRNA smo uporabili predhodno pridobljene podatke z metodo iCLIP (König in sod., 2010). Najmočnejša vezavna mesta hnRNP C so bila določena na dolgih uridinskih zaporedjih, in sicer gre za 9 ali več zaporednih uridinov, od katerih je 10 % vseh primerov v transkriptomu človeka vezanih z hnRNP C. Vezava hnRNP C je bila v veliki meri opažena v intronskih regijah (König in sod., 2010). Prav tako je bila ugotovljena specifična vezava hnRNP C na polipirimidinska zaporedja alternativnih eksonov, utišanih s strani hnRNP C (podatki pridobljeni z analizo RNA-seq podatkov). Ker pa je znano, da se na polipirimidinska zaporedja v procesu vključitve eksonov veže faktor izrezovalno-povezovalnega kompleksa U2AF65, smo v nadaljnjih analizah uporabili tudi iCLIP podatke za protein U2AF65, ki so pokazali, da se U2AF65 veže na kar 58 % vseh aktivnih 3' izrezovalnih mest v HeLa celicah, kar nakazuje na njegovo veliko vlogo pri prepoznavi signalov izrezovanja (Zarnack in sod., 2013).

Predvsem se je izkazalo za pomembno dejstvo, da mesta vezave U2AF65 glede na pozicijo eksonov sovpadajo z vezavo hnRNP C na utišanih alternativnih eksonih. To je usmerilo nadaljnje raziskovalne korake s predpostavko, da oba proteina tekmuje za vezavo na ista mesta pre-mRNA. Za te namene je bila izvedena metoda iCLIP s protitelesom proteina U2AF65 na celicah HeLa, ki so imele znižano izražanje *HNRNPC*. Ugotovljeno je bilo, da ima pomanjkanje hnRNP C močan vpliv na vezavo U2AF65. Za večino mest, ki so običajno vezana z hnRNP C, je bila v njegovi odsotnosti dokazana vezava U2AF65. hnRNP C tako prepreči vezavo U2AF65 in posledično izražanje uravnavanih eksonov na nivoju celotnega transkriptoma. Odločitev, kateri protein bo vezan na pre-mRNA, je posledica njune specifičnosti prepoznavanja zaporedja. Oba sicer prepoznavata uridinska zaporedja, vendar pa lahko U2AF65 prepozna tudi citidine (Singh in sod., 2000).

Za natančnejšo določitev kompeticije med hnRNP C in U2AF65 je bila nadalje izvedena analiza RNA-seq podatkov kontrolnih HeLa celic ter celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*. Z naprednimi bioinformacijskimi pristopi so bile ugotovljene spremembe v vključitvi eksonov v kontrolnih celicah ter celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*. V

primeru hnRNP C-utišanih eksonov je na mestih navzgor od 3' izrezovalnih mest 16 % vsebovalo hnRNP C vezavno mesto. Pri večini od njih je bila v stanju znižanega izražanja hnRNP C opažena vezava z U2AF65. Pri kontrolnih eksonih, ki niso bili utišani ali vezani z hnRNP C, teh sprememb ni bilo opaziti, kar potrjuje, da kompeticija med tema proteina vodi do utišanja eksonov.

Poleg uravnavanja izražanja že znanih alternativnih eksonov smo pokazali, da vezava hnRNP C uravnava utišanje kriptičnih eksonov, ki predhodno še niso bila anotirani. Ta regulacija poteka preko kompeticije z U2AF65 proteinom, kjer hnRNP C preprečuje prepoznavo lažnih signalov izrezovanja. Ker 41 % vseh določenih utišanih eksonov pred tem še ni bilo anotiranih, smo pokazali, da je funkcija hnRNP C onemogočanje vključitve kriptičnih eksonov, ki v normalnih stanjih niso vključeni v prepise genov. RNA-seq podatki so razkrili, da večina kriptičnih eksonov predstavlja elemente Alu. Znižano izražanje *HNRNPC* je vodilo do povečanja globalnega izražanja elementov Alu. Prisotnost teh sprememb smo v okviru doktorske naloge preverili z analizo RT-PCR in detekcijo s kapilarno elektroforezo.

Rezultati *CD55* in *NUP133* minigenov dokazujejo, da kompeticija med hnRNP C in U2AF65 uravnava eksonizacijo elementov Alu ter da s spreminjanje zaporedij vezavnih mest hnRNP C povzročimo vključitev elementov Alu v prepise genov. Učinkovitost te kompeticije je odvisna od moči vezave hnRNP C, ki se v veliki meri odvija globoko v intronskih zaporedjih. Tam hnRNP C preprečuje vezavo U2AF65 na kriptične signale izrezovanja.

Kontrola vezave U2AF65 je ključnega pomena za preživetje celic, saj izguba vezave hnRNP C povzroči eksonizacijo tisočih kriptičnih eksonov, v večini obratnosmernih elementov Alu v intronskih regijah. Z našimi podatki smo pokazali, da hnRNP C učinkovito ščiti pred vezavo U2AF65 na dolga uridinska zaporedja elementov Alu in tako prepreči njihovo škodljivo eksonizacijo. Točkovne mutacije, ki zmanjšajo sposobnost vezave hnRNP C, povečajo vključitev kriptičnih Alu eksonov, kar nakazuje na pomembnost ravnotežne prisotnosti obeh proteinov pri zagotavljanju pravilnega nabora faktorjev izrezovalno-povezovalnega kompleksa.

Kot je bilo predhodno pokazano v študiji Meili in sod. (2009), delecija regulatornega elementa v Alu zaporedju *PTS* gena povzroči njegovo eksonizacijo. Ta pojav se ne spremeni, kadar v celicah znižamo izražanje hnRNP C, kar dokazuje da je preprečitev eksonizacije z hnRNP C popolnoma odstranjena s klinično pomembno mutacijo. S temi eksperimenti smo dokazali, da je vezava hnRNP C izjemnega pomena pri zagotavljanju preprečitve nevarne eksonizacije elementov Alu v normalnih pogojih in lahko preprečuje nastanek različnih obolenj.

Bistvena značilnost kompeticije med hnRNP C in U2AF65 je njuna specifičnost prepoznavne zaporedij na pre-mRNA, ki omogoča, da hnRNP C selektivno uravnava vezavo U2AF65 na kriptične izrezovalne signale brez oviranja vezave pravih izrezovalnih mest v genomu. Ena glavnih ugotovitev naše študije je, da večina kriptičnih eksonov utišanih z hnRNP C predstavlja elemente Alu. Znano je, da ima njihova eksonizacija večinoma škodljive posledice. Naraščajoče število tovrstnih objav nakazuje, da imajo ti dogodki ogromen vpliv na normalne funkcije človeških celic. Ugotovitev, da je ena glavnih funkcij proteina hnRNP C ščitenje transkriptoma pred napačnim izražanjem elementov Alu je pomembna pri študiju mehanizma uravnavanja procesiranja mRNA, saj izguba njegove funkcije vodi do škodljive vključitve tisočih elementov Alu v prepise genov. Posledice teh dogodkov so največkrat pojav prezgodnjih končnih kodonov ali pa zamik odprtega bralnega okvira, kar ima za posledico nepravilno delovanje ali nastanek proteina.

Utišanje elementov Alu je zagotovljeno z močno vezavo hnRNP C na uridinska zaporedja, ki zavirajo dostop izrezovalno-povezovalnega kompleksa. S sistemom reporterskih minigenov smo na primeru gena *PTS* dokazali, da se obolenja povezana s kriptično Alu eksonizacijo lahko pojavijo zaradi spremenjene vezave hnRNP C, kar nakazuje na klinično pomembnost naših rezultatov. Ščitenje pred škodljivo Alu eksonizacijo s proteinom hnRNP C tako predstavlja pomembno vlogo pri zagotavljanju integritete transkriptoma (Zarnack in sod., 2013).

Uravnavanje izražanja elementov Alu oz. njihove eksonizacije ima tudi velik evolucijski pomen, predvsem v smislu genomske variabilnosti in pridobivanja novih lastnosti proteinov (Hasler in sod., 2007; Lev-Maor in sod., 2003). Genomske regije, ki preidejo

proces transkripcije vsebujejo kar 650.000 elementov Alu. Med vsemi alternativnimi eksoni jih 5 % izhaja iz elementov Alu in njihova eksonizacija je še posebej izrazita pri novonastalih eksonih (Sela in sod., 2007; Sorek, 2007; Vorechovsky, 2010). Vendar pa je eksonizacija elementov Alu v večini primerov škodljiva. Pri preprečevanju le-te imajo ogromno vlogo proteini hnRNP C (Zarnack in sod., 2013). Evolucijsko pridobljene mutacije v uridinskih traktih elementov Alu lahko povzročijo, da ti niso več prepoznani z hnRNP C in tako preidejo proces eksonizacije zaradi vezave U2AF65, ki je bila predhodno preprečena. Rezultat so novonastali funkcijsko pomembni eksoni, ki lahko predstavljajo evolucijsko prednost oz. izboljšajo funkcijo proteina. Ogromna količina elementov Alu v genomu človeka tako predstavlja veliko zalogo omogočanja proteinske raznolikosti.

Med študijo uravnavanja eksonizacije elementov Alu z hnRNP C smo med drugim opazili zanimivo dogajanje, in sicer da lahko ima utišanje elementov Alu tudi vpliv na izražanje eksonov navzgor od mest kriptičnih elementov Alu. Poleg tega smo opazili primere, kjer je eksonizacija elementov Alu navzdol od običajnih poliadenilacijskih mest vplivala na normalen potek procesiranja 3' konca mRNA.

Čeprav je znana ogromna količina RNA-vezavnih proteinov, ki uravnavajo procese spajanja eksonov, je zelo malo znanega o interakcijah RNA-vezavnih proteinov oz. uravnavanju spajanja preko oddaljenih mest reguliranih eksonov. Antagonistične vloge RNA-vezavnih proteinov na oddaljenih mestih so že bile raziskane na primerih posameznih eksonov (Crawford in Patton, 2006; Charlet-B in sod., 2002). Na nivoju celotnega transkriptoma pa tovrstne interakcije ostajajo slabo raziskane. Nadaljnji eksperimenti nas bodo vodili do tvorbe serije minigenov, kjer bomo potrjevali predpostavko, da lahko hnRNP C tudi poveča vključitev alternativnih eksonov v mRNA preko uravnavanja z vezavo na oddaljena regulatorna mesta v intronskih regijah, kot so elementi Alu.

6 SKLEPI

- Pri analizi cDNA mikromrež smo pri PKGV ugotovili, da izmed 15 določenih spremenjeno izraženih genov več izmed njih sodeluje pri endopeptidazni aktivnosti. S qPCR smo potrdili znižano izražanje *SLPI*, izražanje *CTSK* in *CTSG* pa ni bilo potrjeno. Predpostavljamo, da ima znižano izražanje proteaznega inhibitorja *SLPI* za posledico uravnavanje delovanja drugih serinskih proteaz.
- Po analizi s cDNA mikromrež gliomov smo določili 20 spremenjeno izraženih genov v primerjavi z referenčno RNA zdravega možganskega tkiva. Vzorci različne vrste diferenciacije in stopnje tumorjev so se po profilih izražanja genov razdelili v tri skupine. Spremenjeno izražena gena *VIM* in *SPARC* sta bila zvišano izražena v gliomih, predvsem pri vzorcih glioblastomov, kam smo potrdili z analizo podatkov ostalih študij mikromrež.
- Nasprotno je bilo izražanje *EEF1A1* znižano pri cDNA analizi mikromrež naših vzorcev, še posebej v primerih nižjih stopenj gliomov astrocitne diferenciacije ter oligodendrogliomih. Vendar pri preverjanju rezultatov s podatki ostalih študij, tega rezultata nismo potrdili.

S temi rezultati lahko potrdimo postavljeno hipotezo: *»Z metodologijo cDNA mikromrež bomo preko profilov spremenjenega izražanja našli nove kandidatne gene, pomembne pri nastanku in razvoju PKGV ter gliomov«.*

- Pri analizi apoptotičnih biomarkerjev v PKGV smo s qPCR določili znižano izražanje *BBC3* v tumorskih tkivih ter s primerjavo skupin histopatoloških parametrov ugotovili povezavo med velikostjo tumorjev in znižanim izražanjem *BBC3*, ki se je povečevalo z naraščajočo velikostjo tumorjev. S podatki mikromrež ostalih študij ter imunohistokemijsko analizo apoptotičnih markerjev smo potrdili model mehanizma *BBC3*-odvisne apoptoze, kjer lahko *BBC3* deluje odvisno ali neodvisno od TP53.

Tako potrjujemo naslednjo hipotezo: *»Skupine različnih histopatoloških značilnosti tumorjev imajo različne profile izražanja genov, vključenih v apoptotske poti.«*

- Z analizo RT-PCR in detekcijo s kapilarno elektroforezo smo potrdili bioinformacijske rezultate, da hnRNP C preprečuje globalno izražanje oz. eksonizacijo kriptičnih eksonov, katerih večino predstavljajo elementi Alu. Z uporabo RNA kontrolnih HeLa celic in celic z znižanim izražanjem HNRNPC smo potrdili 39 od 43 (91 %) izbranih eksonov iz bioinformacijske analize DEXSeq ter 16 od 20 (80 %) z DEXSeq nedetektiranih eksonov z več kot 2-kratno povečanim izražanjem.
- S sistemom reporterskih minigenov smo preučevali vpliv polimorfizmov v polipirimidinskih zaporedjih obratnosmernih elementov Alu. V minigenih *CD55* in *NUP133* smo z usmerjeno mutagenezo spremenili zaporedja polipirimidinskih traktov, kar je povzročilo nezmožnost vezave hnRNP C in hkrati omogočilo prepoznavo zaporedij z U2AF65 ter posledično vključitev elementa Alu v zrelo mRNA.
- Z rezultati *CD55* in *NUP133* minigenov smo dokazali, da kompeticija med hnRNP C in U2AF65 uravnava eksonizacijo elementov Alu ter da s spreminjanje vezavnih mest hnRNP C povzročimo vključitev elementov Alu v prepise genov.

Potrjujemo hipotezo: »*Spremembe zaporedja pre-mRNA v regulatornih regijah izrezovanja spremenijo način uporabe alternativnih eksonov v končni obliki prepisa zaporedja*«.

- Z minigenom regije gena *PTS*, kjer delecija dela elementa Alu povzroči njegovo eksonizacijo, napačen proteinski produkt in posledično vodi do hiperfenilalaninemije smo pokazali, da je vezava hnRNP C in posledična preprečitev vezave U2AF65 izjemnega pomena pri zagotavljanju preprečitve eksonizacije elementov Alu.

Z rezultati omenjenih minigenov lahko potrdimo še zadnjo postavljeno hipotezo: »*Sistem analize z reporterskimi minigeni je primerno orodje za študij vpliva bioinformacijsko izbranih polimorfizmov v intronskih regijah na regulacijo alternativnega izrezovanja*«.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

V prvem delu doktorske naloge smo analizirali izražanje genov pri malignih tumorjih, in sicer pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu (PKGTV) in možganskih tumorjih – gliomih. Z uporabo cDNA mikromrež smo preverjali spremenjeno izražanje genov v tumorjih glede na normalno tkivo. V primeru PKGTV smo pridobljene rezultate cDNA mikromrež potrjevali z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR), pri gliomih pa smo za preverjanje uporabili podatke iz prosto dostopnih podatkovnih zbirk ostalih študij in analizo z orodjem Oncomine.

V primeru PKGTV smo pri analizi molekularnih funkcij spremenjeno izraženih genov, pridobljenih z rezultati cDNA mikromrež ugotovili, da več izmed njih sodeluje pri endopeptidazni aktivnosti. Na podlagi tega smo izbrali kandidatna gena za validacijo s qPCR, in sicer *CTSK* (cisteinska proteaza) in *SLPI* (inhibitor serinskih proteaz). S qPCR nismo potrdili znižanega izražanja *CTSK*, potrdili pa smo znižano izražanje *SLPI*. Za primer analize delovanja *SLPI*, katerega zmanjšano izražanje bi naj povzročilo širjenje tumorja zaradi omogočanja razgradnje sosednjega tkiva, smo analizirali tudi eno izmed njegovih tarč, in sicer serinsko proteazo *CTSG*, za katero smo ugotovili znižano izražanje v PKGTV in tako zavrnilo predpostavko, da je posledica znižanega izražanja *SLPI* zvišana stopnja *CTSG*. Znižano izražanje proteaznega inhibitorja *SLPI* verjetno uravnava izražanje drugih serinskih proteaz.

V primeru gliomov smo raziskovali spremenjeno izražanje genov pri vzorcih tumorjev astrocitne in oligodendroglialne diferenciacije. V primeru astrocitomov so vzorci predstavljali tudi različne (pred)stopnje. Po analizi s cDNA mikromrežami smo določili 20 spremenjeno izraženih genov v primerjavi z referenčno RNA. Vzorci različne vrste diferenciacije in stopnje tumorjev so se po profilih izražanja genov razdelili v tri skupine (hierarhično grupiranje po Pearsonu). Za izražanje genov *VIM*, *EEF1A1* in *SPARC* smo ugotovili, da se razlikujejo med skupinami tumorjev, kar smo preverili z analizo izražanja v ostalih objavljenih študijah z orodjem Oncomine. Spremenjeno izražena gena *VIM* in *SPARC* sta bila po podatkih naših cDNA mikromrež zvišano izražena v gliomih, predvsem pri vzorcih glioblastomov, kar smo potrdili z analizo Oncomine. Nasprotno je bilo

izražanje *EEF1A1* znižano pri cDNA analizi mikromrež naših vzorcev, še posebej v primerih nižjih stopenj gliomov astrocitne diferenciacije ter oligodendrogliomih. Vendar pri preverjanju rezultatov s podatki ostalih študij tega rezultata nismo potrdili.

Raziskovali smo izražanje apoptotičnih biomarkerjev v PKGV, kjer smo raziskovali spremembe v izražanju gena *BBC3* med tumorskimi in pripadajočimi normalnimi tkivi. Izražanje *BBC3* je bilo zmanjšano v tumorskih tkivih. S primerjavo skupin histopatoloških parametrov smo ugotovili povezavo med velikostjo tumorjev in znižanim izražanjem *BBC3*, ki se je povečevalo z naraščajočo velikostjo tumorjev. Z ostalimi histopatološkimi parametri nismo ugotovili povezave z izražanjem *BBC3*. Izražanje *BBC3* je bilo analizirano tudi z orodjem analize mikromrež Oncomine, kjer je bilo izražanje *BBC3* zmanjšano pri PKGV v štirih primerih, v dveh primerih pa je bilo zvišano. Izražanje nekaterih ostalih apoptotičnih genov, in sicer *BCL2* in *TP53* ni sovpadalo z izražanjem *BBC3*. Izražanje *BAX*, *TP63* in *NOXA* je bilo močno zvišano. Z imunohistokemijsko analizo proteinov *TP53*, *TP63*, *BCL2* in *BAX* smo potrdili model mehanizma *BBC3*-odvisne apoptoze, kjer lahko *BBC3* deluje odvisno ali neodvisno od *TP53* (Tajnik in sod., 2012).

V okviru drugega dela doktorske naloge smo se ukvarjali z določitvijo molekularne funkcije RNA-vezavnega proteina hnRNP C za katerega je znano, da sodeluje pri procesiranju pre-mRNA. Pri določitvi protein-RNA interakcij hnRNP C in pre-mRNA smo uporabili predhodno pridobljene podatke z metodo iCLIP, kjer so bila kot vezavna mesta hnRNP C določena uridinska zaporedja (König in sod., 2010). Vezava hnRNP C je bila v veliki meri opažena v intronskih regijah, hnRNP C pa določen kot utiševalec alternativnih eksonov preko vezave na polipirimidinska zaporedja navzgor od 3' izrezovalnih mest. Ker je znano, da se na polipirimidinska zaporedja v procesu vključitve eksonov veže faktor izrezovalno-povezovalnega kompleksa U2AF65 smo preverjali ali med njima poteka vezavna kompeticija, predpostavljena tudi z analizo podatkov iCLIP.

Predhodno so bile z naprednimi bioinformacijskimi pristopi ugotovljene spremembe v vključitvi eksonov v celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC*, od katerih velik delež predhodno še ni bil anotiran (podatki RNA-seq). Te analize so razkrile, da kriptične eksone predstavljajo elementi Alu, katerih povečano globalno izražanje je posledica

znižanega izražanja hnRNP C, kar smo v okviru doktorske naloge preverjali z analizo RT-PCR in kvantitativno detekcijo s kapilarno elektroforezo. Uporabili smo RNA iz kontrolnih HeLa celic ter iz celic z zmanjšanim izražanjem *HNRNPC*, katere so kazale nespremenjeno izražanje U2AF65. Potrjenih je bilo 39 od 43 (91 %) izbranih eksonov iz analize DEXSeq ter 16 od 20 (80 %) eksonov z več kot 2-kratno povečanim izražanjem.

Vpliv nukleotidnih sprememb v polipirimidinskih zaporedjih smo preučevali s sistemom reporterskih minigenov. Na primeru regulacije alternativnega Alu eksona v genu *CD55*, smo pokazali da znižano izražanje *HNRNPC* vodi do povečanja vezave U2AF65, kar ima za posledico drastično povečanje vključitve Alu eksona v mRNA. V minigenih smo z usmerjeno mutagenozo spremenili zaporedja polipirimidinskih traktov obratnosmernih elementov Alu, kar je povzročilo nezmožnost vezave hnRNP C in hkrati omogočilo prepoznavo zaporedij z U2AF65 ter vključitev elementa Alu v zrelo mRNA. Na podoben način smo določili funkcijo hnRNP C tudi pri eksonizaciji kriptičnih Alu eksonov v primeru gena *NUP133*. Mutacije v polipirimidinskih zaporedjih so povzročile eksonizacijo elementa Alu in popolnoma izničile utišanje kriptičnega eksona z hnRNP C. Z rezultati *CD55* in *NUP133* minigenov smo dokazali, da kompeticija med hnRNP C in U2AF65 uravnava eksonizacijo elementov Alu ter da s spreminjanje vezavnih mest hnRNP C povzročimo vključitev elementov Alu v mRNA. Učinkovitost te kompeticije je odvisna od moči vezave hnRNP C, ki preprečuje vezavo U2AF65 na kriptične signale izrezovanja.

Kontrola vezave U2AF65 s hnRNP C je torej ključnega pomena za preživetje celic, saj zmanjšana možnost vezave hnRNP C povzroči eksonizacijo tisočih kriptičnih eksonov, katerih večina predstavlja obratnosmerne elemente Alu v intronskih regijah. Vloga napačnega izražanja elementov Alu je bila pokazana pri razvoju različnih bolezni. Za preverjanje vpliva eksonizacije elementov Alu v bolezenskih stanjih smo pripravili minigene z regijo gena *PTS*, kjer eksonizacija elementa Alu privede do razvoja hiperfenilalaninemije zaradi delecije regulatornega elementa. V celicah z znižanim izražanjem *HNRNPC* se je vključitev Alu eksona drastično povečala, s čimer smo potrdili, da je njegovo izražanje v genu *PTS* uravnavano s proteinom hnRNP C. Vezava hnRNP C je izjemnega pomena pri zagotavljanju preprečitve nevarne eksonizacije elementov Alu v normalnih pogojih, saj preprečuje nastanek različnih obolenj s ščitenjem integritete transkriptoma pred škodljivo eksonizacijo elementov Alu (Zarnack in sod., 2013).

7.2 SUMMARY

In the first part of the thesis we analysed gene expression patterns in malignant tumors. We chose 2 types of tumor samples: head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and brain tumors (glioma). Using cDNA microarrays, we evaluated differential gene expression in tumors compared to adjacent normal tissues in HNSCC analysis or human brain reference RNA for glioma experiments. We validated cDNA microarray results using quantitative real-time PCR (qPCR) in the case of HNSCC. For glioma differential gene expression validation we used data from public available microarray datasets using Oncomine tool.

Using cDNA microarrays, we obtained a list of 15 differentially expressed genes in HNSCC, which molecular functions were enriched in endopeptidase activity. We chose 2 candidate genes for the qPCR validation: cysteine protease *CTSK* and inhibitor of serine proteases *SLPI*, both downregulated in our samples. With this approach, we were not able to validate downregulation of *CTSK*. Downregulation was confirmed for the *SLPI*, what is believed to cause tumor growth due to degradation of adjacent normal tissue. Furthermore, as a possible target of *SLPI* function, we analysed expression of serine protease *CTSG*, which is among tens of possible *SLPI* substrates. Our results did not show negative correlation between *SLPI* and *CTSG* gene expression, since *CTSG* was shown to be downregulated in HNSCC. *SLPI* has to inhibit other serine proteases, such as kallikreins, and their expression profiles are in need to be analysed in head and neck cancer.

Next, we performed gene expression analysis in gliomas. Our experiments were focused on differential gene expression between different types of gliomas - astrocytoma and oligodendroglioma. In case of astrocytic differentiated tumors our sample cohort included astrocytoma of different grades (diffuse, anaplastic astrocytoma and glioblastoma). Using cDNA microarray approach we identified 20 differential expressed genes compared to human brain reference RNA. Samples of different types, and in case of astrocytoma different grades, had distinguished gene expression profiles. Pearson hierarchical clustering divided samples into 3 groups. We identified *VIM*, *SPARC* and *EEF1A1* genes to be differentially expressed in astrocytic compared to oligodendroglial tumors, what we further investigate using Oncomine tool on public available microarray datasets from other

studies. *VIM* and *SPARC* were both upregulated in our samples, especially in the group of glioblastoma. Our results were confirmed also using Oncomine analyses. In contrast, in our sample cohort we observed downregulation of *EEF1A1*, in particular in lower grades of astrocytoma and oligodendroglioma. This observation might be specific to our samples or need additional confirmation, since we could not validate our results with analysis on other microarray datasets.

In addition, gene expression in HNSCC was further investigated with a focus on apoptotic biomarkers. One of the recently evaluated as a promising potential apoptotic genetic biomarkers in cancer is *BBC3*. We analyzed its gene expression in HNSCC tumors compared to adjacent normal tissues using qPCR approach. Our results have shown downregulation of *BBC3* in tumors, which was increased with the tumor size (T) status of pTNM classification. Within other histopathological parameters we did not observe correlation with *BBC3* expression. In comparison to the results of 6 public available HNSCC microarray studies, we found *BBC3* downregulation in 4 datasets and upregulation in 2. Using the same approach, its expression was not correlated with *BCL2* and *TP53* expression profiles. Expression of *BAX*, *TP63* and *NOXA* was highly upregulated. In addition, we performed immunohistochemical evaluation of TP53, TP63, BCL2 and BAX protein expression. The obtained results confirmed a model, where BBC3 can act dependent or independent of TP53 in the apoptotic process.

In the second part of our study, we investigated molecular function of the RNA-binding protein hnRNP C, regulator of pre-mRNA processing. We used results of previously performed iCLIP experiments to study its interactions and crosslinking events on pre-mRNA. Previously, hnRNP C was identified to preferentially bind long uridine tracts (König et al., 2010). In the same study, hnRNP C was observed to crosslink within the intronic regions in the high percentage and its function as a alternative exon silencer through binding on polypyrimidine tracts upstream of the 3' splice sites. Since it is well known, that in the splicing process, polypyrimidine tracts are bound by U2AF65 in the earliest stage of spliceosome formation we investigated whether there is a competition between these proteins for binding on the polypyrimidine tracts, initially observed through the iCLIP data.

Previously, using advanced bioinformatical procedures, there were identified differences in the inclusion of the exons in *HNRNPC* knockdown cells, from which a high percentage represented previously unknown transcribed regions (RNA-seq data). These cryptic exons were identified as Alu elements. Their global expression is highly upregulated due to decreased hnRNP C expression. In our study, we validated bioinformatically derived list of Alu exonization in the absence of hnRNP C using RT-PCR approach followed by capillary electrophoresis quantification. We used control HeLa and *HNRNPC* knockdown cells with unaltered U2AF65 expression. We could validate 39 out of 43 (91 %) tested Alu exons from the DEXSeq analysis and 16 out of 20 (80 %) exons with more than 2-fold higher inclusion rate in *HNRNPC* knockdown cells, but not called significant in other analysis.

Next we investigated the role of polypyrimidine tract polymorphisms using reporter minigene assays. In case of alternative Alu exon regulation in *CD55* gene we showed that reduced *HNRNPC* expression leads to increased U2AF65 binding on polypyrimidine tracts, what results in drastic increase of Alu exon inclusion in mRNA. We designed additional minigenes where we mutated polypyrimidine tracts of antisense Alu elements using target-mutagenesis approach. Disrupted sequences disabled binding of hnRNP C and maintain U2AF65 binding, what consequentially lead to inclusion of Alu element. Similar results were obtained on *NUP133* minigenes. Taken together, we can confirm that competition between hnRNP C and U2AF65 indeed regulates the exonization of Alu elements. Efficiency of the competition is dependent on the hnRNP C binding strenght, that prevents U2AF65 from the binding on polypyrimidine tracts and Alu exonization.

Regulation of U2AF65 binding with hnRNP C is the main importance for the survival of cells, since lower ability of hnRNP C binding cause exonization of thousands cryptic Alu exons, which role was previously associated with many diseases. To further study impact of Alu exonization in the pathogenesis, we constructed minigene of the *PTS* region, for which it is known that Alu exonization leads to occurrence and development of hyperphenilalaninemia due to deletion of regulatory element within Alu sequence. In the *HNRNPC* knockdown cells we observed strong increase of Alu exonization and confirmed that Alu exon in the *PTS* gene is indeed regulated by hnRNP C. In conclusion, our results show extreme importance of hnRNP C binding in preventing deleterious exonization of Alu elements, what maintain transcriptome integrity and prevent the disease.

8 VIRI

- Alevizos I., Mahadevappa M., Zhang X., Ohyama H., Kohno Y., Posner M., Gallagher G.T., Varvares G.T., Cohen D., ... Wong D.T. 2001. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene*, 20, 43: 6196-6204
- Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., ... Staudt L. M. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403, 6769: 503-11
- Anders S., Reyes A., Huber W. 2012. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Research*, 22, 10: 2008-2017
- Auweter S. D., Oberstrass F. C., Allain F. H. 2006. Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Research*, 34, 17: 4943-4959
- Baatenburg de Jong R. J., Hermans J., Molenaar J., Briaire J. J., le Cessie S. 2001. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head and Neck*, 23, 9: 718-724
- Bartel F., Taubert H., Harris L. C. 2002. Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell*, 2, 1: 9-15
- Belancio V. P., Roy-Engel A. M., Deininger P. L. 2010. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 20, 4: 200-210
- Berglund J. A., Chua K., Abovich N., Reed R., Rosbash M. 1997. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell*, 89, 5: 781-787
- Black D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 291-336
- Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nuñez G., Thompson C. B. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74, 4: 597-608
- Bouchard D., Morisset D., Bourbonnais Y., Tremblay G. M. 2006. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncology*, 7, 2: 167-174
- Bredel M., Bredel C., Juric D., Harsh G. R., Vogel H., Recht L. D., Sikic B. I. 2005. Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Research*, 65, 19: 8679-8689
- Briese M., Esmaeili B., Sattelle D. B. 2005. Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *Bioessays*, 27, 9: 946-957
- Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11, 2: 85-95
- Cartegni L., Chew S. L., Krainer A. R. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3, 4: 285-298
- Chakarova C. F., Hims M. M., Bolz H., Abu-Safieh L., Patel R. J., Papaioannou M. G., Inglehearn C. F., Keen T. J., Willis C., ... Bhattacharya S. S. 2002. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 11, 1: 87-92

- Charlet-B N., Logan P., Singh G., Cooper T. A. 2002. Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Molecular Cell*, 9, 3: 649-658
- Chen M., Manley J. L. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 11: 741-754
- Cheung H. C., Corley L. J., Fuller G. N., McCutcheon I. E., Cote G. J. 2006. Polypyrimidine tract binding protein and Notch1 are independently re-expressed in glioma. *Modern Pathology*, 19, 8: 1034-1041
- Choi P., Chen C. 2005. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 104, 6: 1113-1128
- Chung C. H., Parker J. S., Karaca G., Wu J., Funkhouser W. K., Moore D., Butterfoss D., Xiang D., Zanation A., ... Perou CM. 2004. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5, 5: 489-500
- Cordes C., Bartling B., Simm A., Afar D., Lautenschlager C., Hansen G., Silber R. E., Burdach S., Hofmann H. S. 2009. Simultaneous expression of Cathepsins B and K in pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas predicts poor recurrence-free and overall survival. *Lung Cancer*, 64, 1: 79-85
- Cordes C., Hasler R., Werner C., Gorogh T., Rocken C., Hebebrand L., Kast W. M., Hoffmann M., Schreiber S., Ambrosch P. 2011. The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 39, 1: 185-191
- Cotter T. G. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9, 7: 501-507
- Coutinho-Camillo C. M., Lourenco S. V., Nishimoto I. N., Kowalski L. P., Soares F. A. 2010. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 57, 2: 304-316
- Crawford J. B., Patton J. G. 2006. Activation of alpha-tropomyosin exon 2 is regulated by the SR protein 9G8 and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 23: 8791-8802
- Cromer A., Carles A., Millon R., Ganguli G., Chalmel F., Lemaire F., Young J., Dembélé D., Thibault C., ... Wasylyk B. 2004. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene*, 23, 14: 2484-2498
- Debela M., Beaufort N., Magdolen V., Schechter N. M., Craik C. S., Schmitt M., Bode W., Goettig P. 2008. Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biological Chemistry*, 389, 6: 623-632
- DeRisi J. L., Iyer V. R., Brown P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278, 5338: 680-686
- Devoogdt N., Revets H., Ghassabeh G. H., De Baetselier P. 2004. Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028: 380-389
- Dobrossy L. 2005. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24, 1: 9-17
- Estilo C. L., O-charoenrat P., Talbot S., Socci N. D., Carlson D. L., Ghossein R., Williams T., Yonekawa Y., Ramanathan Y., ... Singh B. 2009. Oral tongue cancer gene

- expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*, 9: 11
doi: 10.1186/1471-2407-9-11
- Fackenthal J. D., Cartegni L., Krainer A. R., Olopade O. I. 2002. BRCA2 T2722R is a deleterious allele that causes exon skipping. *American Journal of Human Genetics*, 71, 3: 625-631
- Freije W. A., Castro-Vargas F. E., Fang Z., Horvath S., Cloughesy T., Liao L. M., Mischel P. S., Nelson S. F. 2004. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Research*, 64, 18: 6503-6510
- French P. J., Swagemakers S. M., Nagel J. H., Kouwenhoven M. C., Brouwer E., van der Spek P., Luidert T. M., Kros J. M., van den Bent M. J., Sillevius Smitt P. A. 2005. Gene expression profiles associated with treatment response in oligodendrogliomas. *Cancer Research*, 65, 24: 11335-11344
- Gaildrat P., Killian A., Martins A., Tournier I., Frebourg T., Tosi M. 2010. Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods in Molecular Biology*, 653: 249-257
- Ghigna C., Giordano S., Shen H., Benvenuto F., Castiglioni F., Comoglio P. M., Green M. R., Riva S., Biamonti G. 2005. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular Cell*, 20, 6: 881-890
- Ghigna C., Valacca C., Biamonti G. 2008. Alternative splicing and tumor progression. *Current Genomics*, 9, 8: 556-570
- Ginos M. A., Page G. P., Michalowicz B. S., Patel K. J., Volker S. E., Pambuccian S. E., Ondrey F. G., Adams G. L., Gaffney P. M. 2004. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, 64, 1: 55-63
- Godard S., Getz G., Delorenzi M., Farmer P., Kobayashi H., Desbaillets I., Nozaki M., Diserens A. C., Hamou M. F., ... Hegi M. E. 2003. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Research*, 63, 20: 6613-6625
- Gold K. A., Kim E. S. 2009. Role of molecular markers and gene profiling in head and neck cancers. *Current Opinion in Oncology*, 21, 3: 206-211
- Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., Coller H., Loh M. L., Downing J. R., ... Lander E. S. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286, 5439: 531-537
- Hasler J., Samuelsson T., Strub K. 2007. Useful 'junk': Alu RNAs in the human transcriptome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 14: 1793-1800
- Hastings M. L., Resta N., Traum D., Stella A., Guanti G., Krainer A. R. 2005. An LKB1 AT-AC intron mutation causes Peutz-Jeghers syndrome via splicing at noncanonical cryptic splice sites. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12, 1: 54-59
- Hoque M. O., Begum S., Sommer M., Lee T., Trink B., Ratovitski E., Sidransky D. 2003. PUMA in head and neck cancer. *Cancer Letters*, 199, 1: 75-81
- Hu G. K., Madore S. J., Moldover B., Jatke T., Balaban D., Thomas J., Wang Y. 2001. Predicting splice variant from DNA chip expression data. *Genome Research*, 11, 7: 1237-1245

- Huang Y., Steitz J. A. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Molecular Cell*, 17, 5: 613-615
- Karni R., de Stanchina E., Lowe S. W., Sinha R., Mu D., Krainer A. R. 2007. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14, 3: 185-193
- Keren H., Lev-Maor G., Ast G. 2010. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics*, 11, 5: 345-355
- Kleer C. G., Bloushtain-Qimron N., Chen Y. H., Carrasco D., Hu M., Yao J., Kraeft S. K., Collins L. C., Sabel M. S., ... Polyak K. 2008. Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression. *Clinical Cancer Research*, 14, 17: 5357-5367
- Knebelmann B., Forestier L., Drouot L., Quinones S., Chuet C., Benessy F., Saus J., Antignac C. 1995. Splice-mediated insertion of an Alu sequence in the COL4A3 mRNA causing autosomal recessive Alport syndrome. *Human Molecular Genetics*, 4, 4: 675-679
- König J., Zarnack K., Rot G., Curk T., Kayikci M., Zupan B., Turner D. J., Luscombe N. M., Ule J. 2010. iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17, 7: 909-915
- Konkel M. K., Batzer M. A. 2010. A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome. *Seminars in Cancer Biology*, 20, 4: 211-221
- Krawczak M., Reiss J., Cooper D. N. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics*, 90, 1-2: 41-54
- Kreahling J., Graveley B. R. 2004. The origins and implications of Aluternative splicing. *Trends in Genetics*, 20, 1: 1-4
- Lamolle G., Marin M., Alvarez-Valin F. 2006. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutation Research*, 600, 1-2: 102-112
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., ... Chen Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 6822: 860-921
- Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N. M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., ... Fine H. A. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9, 5: 391-403
- Lee S. H., Kim H. Y., Kim T. J., Park H. K., Kim W. H., Woo K. M., Cho M. H. 2002. Aberrant splicing of FHIT transcripts in human gastric cancer cell lines. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 112, 1-4: 39-49
- Lee Y., Scheck A. C., Cloughesy T. F., Lai A., Dong J., Farooqi H. K., Liao L. M., Horvath S., Mischel P. S., Nelson S. F. 2008. Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Medical Genomics*, 1: 52
doi: 10.1186/1755-8794-1-52

- Lei H., Day I. N., Vorechovsky I. 2005. Exonization of AluYa5 in the human ACE gene requires mutations in both 3' and 5' splice sites and is facilitated by a conserved splicing enhancer. *Nucleic Acids Research*, 33, 12: 3897-3906
- Lei H., Vorechovsky I. 2005. Identification of splicing silencers and enhancers in sense Alus: a role for pseudoacceptors in splice site repression. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 16: 6912-6920
- Lerat E., Semon M. 2007. Influence of the transposable element neighborhood on human gene expression in normal and tumor tissues. *Gene*, 396, 2: 303-311
- Lev-Maor G., Sorek R., Shomron N., Ast G. 2003. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science*, 300, 5623: 1288-1291
- Liang Y., Diehn M., Watson N., Bollen A. W., Aldape K. D., Nicholas M. K., Lamborn K. R., Berger M. S., Botstein D., Brown P. O., Israel M. A. 2005. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16: 5814-5819
- Liotta L., Petricoin E. 2000. Molecular profiling of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 1, 1: 48-56
- Liu W. M., Maraia R. J., Rubin C. M., Schmid C. W. 1994. Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 22, 6: 1087-1095
- Lopez-Otin C., Matrisian L. M. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews. Cancer*, 7, 10: 800-808
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., Cavenee W. K., Burger P. C., Jouvet A., Scheithauer B. W., Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathology*, 114, 2: 97-109
- Lu J., Liu Z., Xiong M., Wang Q., Wang X., Yang G., Zhao L., Qiu Z., Zhou C., Wu M. 2001. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *International Journal of Cancer*, 91, 3: 288-294
- Lunde B. M., Moore C., Varani G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 6: 479-490
- Macgregor P. F., Squire J. A. 2002. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clinical Chemistry*, 48, 8: 1170-1177
- Makalowski W., Mitchell G. A., Labuda D. 1994. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends in Genetics*, 10, 6: 188-193
- Maris C., Dominguez C., Allain F. H. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*, 272, 9: 2118-2131
- Massiello A., Roesser J. R., Chalfant C. E. 2006. SAP155 Binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA. *FASEB Journal*, 20, 10: 1680-1682
- Mazoyer S., Puget N., Perrin-Vidoz L., Lynch H. T., Serova-Sinilnikova O. M., Lenoir G. M. 1998. A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *American Journal of Human Genetics*, 62, 3: 713-715
- McKie A. B., McHale J. C., Keen T. J., Tarttlin E. E., Goliath R., van Lith-Verhoeven J. J., Greenberg J., Ramesar R. S., Hoyng C. B., ... Inglehearn C. F. 2001. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Human Molecular Genetics*, 10, 15: 1555-1562

- Meili D., Kralovicova J., Zagalak J., Bonafe L., Fiori L., Blau N., Thöny B., Vorechovsky I. 2009. Disease-causing mutations improving the branch site and polypyrimidine tract: pseudoexon activation of LINE-2 and antisense Alu lacking the poly(T)-tail. *Human Mutation*, 30, 5: 823-831
- Mills A. A. 2005. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes and Development*, 19, 18: 2091-2099
- Mitchell G. A., Labuda D., Fontaine G., Saudubray J. M., Bonnefont J. P., Lyonnet S., Brody L. C., Steel G., Obie C., Valle D. 1991. Splice-mediated insertion of an Alu sequence inactivates ornithine delta-aminotransferase: a role for Alu elements in human mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 3: 815-819
- Mlakar V., Berginc G., Volavsek M., Stor Z., Rems M., Glavac D. 2009a. Presence of activating KRAS mutations correlates significantly with expression of tumour suppressor genes DCN and TPM1 in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 9: 282
doi: 10.1186/1471-2407-9-282
- Mlakar V., Strazisar M., Sok M., Glavac D. 2010. Oligonucleotide DNA microarray profiling of lung adenocarcinoma revealed significant downregulation and deletions of vasoactive intestinal peptide receptor 1. *Cancer Investigation*, 28, 5: 487-494
- Mlakar V., Todorovic V., Cemazar M., Glavac D., Sersa G. 2009b. Electric pulses used in electrochemotherapy and electrogene therapy do not significantly change the expression profile of genes involved in the development of cancer in malignant melanoma cells. *BMC Cancer*, 9: 299
doi: 10.1186/1471-2407-9-299
- Mordes D., Luo X., Kar A., Kuo D., Xu L., Fushimi K., Yu G., Sternberg P. Jr, Wu J. Y. 2006. Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 12: 1259-1271
- Murat A., Migliavacca E., Gorlia T., Lambiv W. L., Shay T., Hamou M. F., de Tribolet N., Regli L., Wick W., ... Hegi M. E. 2008. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 18: 3015-3024
- Nagler D. K., Kruger S., Kellner A., Ziomek E., Menard R., Buhtz P., Krams M., Roessner A., Kellner U. 2004. Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate*, 60, 2: 109-119
- Neklason D. W., Solomon C. H., Dalton A. L., Kuwada S. K., Burt R. W. 2004. Intron 4 mutation in APC gene results in splice defect and attenuated FAP phenotype. *Familial Cancer*, 3, 1: 35-40
- Nelson K. K., Green M. R. 1989. Mammalian U2 snRNP has a sequence-specific RNA-binding activity. *Genes and Development*, 3, 10: 1562-1571
- Nevins J. R., Potti A. 2007. Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes. *Nature Reviews. Genetics*, 8, 8: 601-609
- Nicol J. W., Helt G. A., Blanchard S. G., Jr., Raja A., Loraine A. E. 2009. The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics*, 25, 20: 2730-2731
- Nowsheen S., Aziz K., Panayiotidis M. I., Georgakilas A. G. 2012. Molecular markers for cancer prognosis and treatment: have we struck gold? *Cancer Letters*, 327, 1-2: 142-152

- Nutt C. L., Mani D. R., Betensky R. A., Tamayo P., Cairncross J. G., Ladd C., Pohl U., Hartmann C., McLaughlin M. E., ... Louis DN. 2003. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Research*, 63, 7: 1602-1607
- O'Donnell R. K., Kupferman M., Wei S. J., Singhal S., Weber R., O'Malley B., Cheng Y., Putt M., Feldman M., Ziober B., Muschel R. J. 2005. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene*, 24, 7: 1244-1251
- Ohgaki H., Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170, 5: 1445-1453
- Ohgaki H., Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100, 12: 2235-2241
- Oubridge C., Ito N., Evans P. R., Teo C. H., Nagai K. 1994. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, 372, 6505: 432-438
- Pagani F., Baralle F. E. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics*, 5, 5: 389-396
- Paliouras M., Borgono C., Diamandis E. P. 2007. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Letters*, 249, 1: 61-79
- Pantel K., Brakenhoff R. H. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, 4, 6: 448-456
- Paronetto M. P., Achsel T., Massiello A., Chalfant C. E., Sette C. 2007. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *Journal of Cell Biology*, 176, 7: 929-939
- Pettigrew C., Wayte N., Lovelock P. K., Tavtigian S. V., Chenevix-Trench G., Spurdle A. B., Brown M. A. 2005. Evolutionary conservation analysis increases the colocalization of predicted exonic splicing enhancers in the BRCA1 gene with missense sequence changes and in-frame deletions, but not polymorphisms. *Breast Cancer Research*, 7, 6: R929-R939
- Pettus J. R., Johnson J. J., Shi Z., Davis J. W., Koblinski J., Ghosh S., Liu Y., Ravosa M. J., Frazier S., Stack M. S. 2009. Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histology and Histopathology*, 24, 2: 197-207
- Piekielko-Witkowska A., Wiszomirska H., Wojcicka A., Poplawski P., Boguslawska J., Tanski Z., Nauman A. 2010. Disturbed expression of splicing factors in renal cancer affects alternative splicing of apoptosis regulators, oncogenes, and tumor suppressors. *PLoS ONE*, 5, 10: e13690
doi: 10.1371/journal.pone.0013690
- Qiu W., Carson-Walter E. B., Kuan S. F., Zhang L., Yu J. 2009. PUMA suppresses intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, 69, 12: 4999-5006
- Quentin Y. 1992. Origin of the Alu family: a family of Alu-like monomers gave birth to the left and the right arms of the Alu elements. *Nucleic Acids Research*, 20, 13: 3397-3401
- Quintanilla-Dieck M. J., Codriansky K., Keady M., Bhawan J., Runger T. M. 2008. Cathepsin K in melanoma invasion. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 9: 2281-2288

- Reed J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157, 5: 1415-1430
- Rhodes D. R., Kalyana-Sundaram S., Mahavisno V., Varambally R., Yu J., Briggs B. B., Barrette T. R., Anstet M. J., Kincead-Beal C., Kulkarni P., Varambally S., Ghosh D., Chinnaiyan A. M. 2007. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, 9, 2: 166-180
- Rickman D. S., Bobek M. P., Misek D. E., Kuick R., Blaivas M., Kurnit D. M., Taylor J., Hanash S. M. 2001. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Research*, 61, 18: 6885-6891
- Rocco J. W., Leong C. O., Kuperwasser N., DeYoung M. P., Ellisen L. W. 2006. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 9, 1: 45-56
- Roepman P., Wessels L. F., Kettelarij N., Kemmeren P., Miles A. J., Lijnzaad P., Tilanus M. G., Koole R., Hordijk G. J., van der Vliet P. C., Reinders M. J., Slootweg P. J., Holstege F. C. 2005. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, 37, 2: 182-186
- Saltzman A. L., Pan Q., Blencowe B. J. 2011. Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery. *Genes and Development*, 25, 4: 373-384
- Sauliere J., Sureau A., Expert-Bezancon A., Marie J. 2006. The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Molecular and Cell Biology*, 26, 23: 8755-8769
- Schlingemann J., Habtemichael N., Itrich C., Toedt G., Kramer H., Hambek M., Knecht R., Lichter P., Stauber R., Hahn M. 2005. Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. *Laboratory Investigation*, 85, 8: 1024-1039
- Schmalbach C. E., Chepeha D. B., Giordano T. J., Rubin M. A., Teknos T. N., Bradford C. R., Wolf G. T., Kuick R., Misek D. E., Trask D. K., Hanash S. 2004. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 130, 3: 295-302
- Sedlak T. W., Oltvai Z. N., Yang E., Wang K., Boise L. H., Thompson C. B., Korsmeyer S. J. 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 17: 7834-7838
- Sela N., Mersch B., Gal-Mark N., Lev-Maor G., Hotz-Wagenblatt A., Ast G. 2007. Comparative analysis of transposed element insertion within human and mouse genomes reveals Alu's unique role in shaping the human transcriptome. *Genome Biology*, 8, 6: R127
doi:10.1186/gb-2007-8-6-r127
- Sengupta S., den Boon J. A., Chen I. H., Newton M. A., Dahl D. B., Chen M., Cheng Y. J., Westra W. H., Chen C. J., Hildesheim A., Sugden B., Ahlquist P. 2006. Genome-wide expression profiling reveals EBV-associated inhibition of MHC class I expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research*, 66, 16: 7999-8006

- Shendure J., Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 10: 1135-1145
- Shai R., Shi T., Kremen T. J., Horvath S., Liao L. M., Cloughesy T. F., Mischel P. S., Nelson S. F. 2003. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene*, 22, 31: 4918-4923
- Shirahata M., Iwao-Koizumi K., Saito S., Ueno N., Oda M., Hashimoto N., Takahashi J. A., Kato K. 2007. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clinical Cancer Research*, 13, 24: 7341-7356
- Singh G., Cooper T. A. 2006. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *Biotechniques*, 41, 2: 177-181
- Singh R., Banerjee H., Green M. R. 2000. Differential recognition of the polypyrimidine-tract by the general splicing factor U2AF65 and the splicing repressor sex-lethal. *RNA*, 6, 6: 901-911
- Singh R., Valcarcel J. 2005. Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12, 8: 645-653
- Singh R., Valcarcel J., Green M. R. 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science*, 268, 5214: 1173-1176
- Sjoblom T., Jones S., Wood L. D., Parsons D. W., Lin J., Barber T. D., Sjöblom T., Jones S., Wood L. D., ..., Velculescu V. E. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314, 5797: 268-274
- Sorek R., Ast G., Graur D. 2002. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Research*, 12, 7: 1060-1067
- Sorek R., Lev-Maor G., Reznik M., Dagan T., Belinky F., Graur D., Ast G. 2004a. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in alu exons. *Molecular Cell*, 14, 2: 221-231
- Sorek R., Shamir R., Ast G. 2004b. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends in Genetics*, 20, 2: 68-71
- Sorek R. 2007. The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA*, 13, 10: 1603-1608.
- Spellman R., Smith C. W. 2006. Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends in Biochemical Sciences*, 31, 2: 73-76
- Sun L., Hui A. M., Su Q., Vortmeyer A., Kotliarov Y., Pastorino S., Passaniti A., Menon J., Walling J., Bailey R., Rosenblum M., Mikkelsen T., Fine H. A. 2006. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*, 9, 4: 287-300
- Tajnik M., Stražišar M., Volavšek M., Boštjančič E., Glavač D. 2012. BBC3 is down-regulated with increased tumor size independently of p53 expression in head and neck cancer. *Cancer Biomarkers*, 11, 5: 197-208
- Tang R. B., Wang H. Y., Lu H. Y., Xiong J., Li H. H., Qiu X. H., Liu H. Q. 2005. Increased level of polymerase III transcribed Alu RNA in hepatocellular carcinoma tissue. *Molecular Carcinogenesis*, 42, 2: 93-96
- Tian X., Shigemasa K., Hirata E., Gu L., Uebaba Y., Nagai N., O'Brien T. J., Ohama K. 2004. Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its inhibitor

- antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. *Oncology Reports*, 12, 5: 1001-1006
- Toruner G. A., Ulger C., Alkan M., Galante A. T., Rinaggio J., Wilk R., Tian B., Soteropoulos P., Hameed M. R., Schwalb M. N., Dermody J. J. 2004. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 154, 1: 27-35
- Tso C. L., Freije W. A., Day A., Chen Z., Merriman B., Perlina A., Lee Y., Dia E. Q., Yoshimoto K., Mischel P. S., Liao L. M., Cloughesy T. F., Nelson S. F. 2006. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Research*, 66, 1: 159-167
- Ule J., Jensen K. B., Ruggiu M., Mele A., Ule A., Darnell R. B. 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, 302, 5648: 1212-1215
- van den Boom J., Wolter M., Kuick R., Misek D. E., Youkilis A. S., Wechsler D. S., Sommer C., Reifemberger G., Hanash S. M. 2003. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology*, 163, 3: 1033-1043
- Venables J. P., Burn J. 2006. EASI-enrichment of alternatively spliced isoforms. *Nucleic Acids Research*, 34, 15: e103
doi: 10.1093/nar/gkl592
- Venables J. P., Klinck R., Koh C., Gervais-Bird J., Bramard A., Inkel L., Durand M., Couture S., Froehlich U., ... Elela S. A. 2009. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 6: 670-676
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., ... Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291, 5507: 1304-1351
- Vervoort R., Gitzelmann R., Lissens W., Liebaers I. 1998. A mutation (IVS8+0.6kbpdelTC) creating a new donor splice site activates a cryptic exon in an Alu-element in intron 8 of the human beta-glucuronidase gene. *Human Genetics*, 103, 6: 686-693
- Villaret D. B., Wang T., Dillon D., Xu J., Sivam D., Cheever M. A., Reed S. G. 2000. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope*, 110, 3, Pt 1: 374-381
- Vithana E. N., Abu-Safieh L., Allen M. J., Carey A., Papaioannou M., Chakarova C., Al-Maghtheh M., Ebenezer N. D., Willis C., Moore A. T., Bird A. C., Hunt D. M., Bhattacharya S. S. 2001. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Molecular Cell*, 8, 2: 375-381
- Vogelstein B., Kinzler K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10, 8: 789-799
- Vorechovsky I. 2010. Transposable elements in disease-associated cryptic exons. *Human Genetics*, 127, 2: 135-154
- Wahl M. C., Will C. L., Luhrmann R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136, 4: 701-718
- Wang E. T., Sandberg R., Luo S., Khrebtkova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S. F., Schroth G. P., Burge C. B. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456, 7221: 470-476

- Wang G. S., Cooper T. A. 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics*, 8, 10: 749-761
- Wang Z., Kayikci M., Briesse M., Zarnack K., Luscombe N. M., Rot G., Zupan B., Curk T., Ule J. 2010. iCLIP predicts the dual splicing effects of TIA-RNA interactions. *PLoS Biology*, 8, 10: e1000530
doi: 10.1371/journal.pbio.1000530
- Ward A. J., Cooper T. A. 2010. The pathobiology of splicing. *Journal of Pathology*, 220, 2: 152-163
- Wen J., Nikitakis N. G., Chaisuparat R., Greenwell-Wild T., Gliozzi M., Jin W., Adli A., Moutsopoulos N., Wu T., Warburton G., Wahl S. M. 2011. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) expression and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *American Journal of Pathology*, 178, 6: 2866-2878
- Witten J. T., Ule J. 2011. Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends in Genetics*, 27, 3: 89-97
- Yamaguchi K., Shimada S., Tashima S., Ogawa M. 2000. A potentially novel peptidase, resembling but distinct from neutrophil elastase, produced by carcinoma cells. *Oncology Reports*, 7, 5: 1017-1021
- Yan X., Takahara M., Xie L., Oda Y., Nakahara T., Uchi H., Takeuchi S., Tu Y., Moroi Y., Furue M. 2011. Stromal expression of cathepsin K in squamous cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 3: 362-365
- Ye H., Yu T. W., Temam S., Ziober B. L., Wang J. G., Schwartz J. L., Mao L., Wong D. T., Zhou X. 2008. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*, 6, 9: 69
doi: 10.1186/1471-2164-9-69
- Yousef G. M., Diamandis E. P. 2003. Tissue kallikreins: new players in normal and abnormal cell growth? *Thrombosis and Haemostasis*, 90, 1: 7-16
- Yu J., Zhang L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27, Suppl 1: S71-S83
- Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, 7, 3: 673-682
- Zamore P. D., Green M. R. 1989. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 23: 9243-9247
- Zarnack K., König J., Tajnik M., Martincorena I., Eustermann S., Stévant I., Reyes A., Anders S., Luscombe N., Ule J. 2013. Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the uncontrolled exonization of Alu elements. *Cell*, 152, 3: 453-466
- Zhang Y., DeWitt D. L., McNeely T. B., Wahl S. M., Wahl L. M. 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 5: 894-900
- Zhang Z., Stamm S. 2011. Analysis of mutations that influence pre-mRNA splicing. *Methods in Molecular Biology*, 703: 137-160
- Zhao H., Dong Y., Quan J., Smith R., Lam A., Weinstein S., Clements J., Johnson N. W., Gao J. 2011. Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head and Neck*, 33, 4: 566-572

Zhu H., Hinman M. N., Hasman R. A., Mehta P., Lou H. 2008. Regulation of neuron-specific alternative splicing of neurofibromatosis type 1 pre-mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 4: 1240-1251

V okviru doktorske naloge smo pripravili naslednje publikacije:

- Tajnik M., Stražišar M., Volavšek M., Boštjančič E., Glavač D. 2012. BBC3 is down-regulated with increased tumor size independently of p53 expression in head and neck cancer. *Cancer Biomarkers*, 11, 5: 197-208
- Zarnack K., König J., Tajnik M., Martincorena I., Eustermann S., Stévant I., Reyes A., Anders S., Luscombe N., Ule J. 2013. Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the uncontrolled exonization of Alu elements. *Cell*, 152, 3: 453–466
- Tajnik M., Matos B., Boštjančič E., Matjašič A., Popović M., Glavač D. Differential gene expression analysis of matricellular proteins in low and high-grade gliomas. [*v pripravi*]

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorju prof. dr. Damjanu Glavaču za vse napotke in usmeritve tekom doktorskega dela in ostalega uposabljanja na Odd. za molekularno genetiko, Inštituta za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani. Prav tako najboljšim sodelavcem: dr. Emanueli Boštjančič, Katarini Vrabec, dr. Sonji Hrašovec, Alenki Matjašič, dr. Nejcu Jeleni, Andreju Zupanu, dr. Nini Hauptman in dr. Mojci Stražišar. Brez vas bi večkrat zamudila v službo. Hvala za vse!

Somentor prof. dr. Jernej Ule mi je omogočil večmesečno raziskovalno usposabljanje v Veliki Britaniji. Iskrena hvala za neprecenljivo izkušnjo in ker si verjel, da zmorem. Še posebej hvala dr. Julianu Königu – za vse znanje, ki mi ga je posredoval in potrpežljivost tekom dela ter vsem ostalim sodelavcem iz MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Velika Britanija.

Hvala tudi ostalim, ki so pripomogli k tej doktorski nalogi, še posebej doc. dr. Metki Volavšek, dr. med. in asist. mag. Boštjanu Matosu, dr. med.

Starši – vaši so najboljši geni! Hvala tudi za vso podporo v času študija in koristne življenjske nasvete. Upam, da se vam kdaj oddolžim. Tudi sestri – Tanja in Nataša – brez vaju ne bi bila to, kar sem. Hvala za vzgled! Tudi Tiborju, Boru in Tinetu.

Vsem prijateljem hvala, da ste me bodrili takrat ko mi ni šlo ter se z mano veselili uspehov! Še posebej Špeli, Kristini in Nini – najboljše ste!

PRILOGE

Priloga A: Validacija spremembe vključitve novih Alu eksonov, detektiranih z DEXSeq, v transkripte celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*.

Simbol gena	Angleški opis gena	Koordinate eksona	Stran	RNAseq p vrednost (KD1)	RNAseq p vrednost (KD2)	% PCR spremembe (KD1)	% PCR spremembe (KD2)	Začetni PCR oligonukleotid	Končni PCR oligonukleotid	Velikost produktov (vključitev/izključitev) [bp]
a) VALIDIRANI ALU EKSONI										
ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	chr3:183727613-183727765	-	3,63E-02	1,88E-03	13,07	17,42	CTTCTGGGACGCACAGAGAC	CTGCTGTTTCCAAGGCATCT	84/237
AGL	amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	chr1:100362392-100362678	+	1,20E-07	4,69E-10	44,13	50,33	CTGCTGGGGAAGGGATACTT	GGTACCCGCAAATGCTAAAA	100/381
CHAMP1	chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1	chr13:115087538-115087807	+	1,11E-16	1,67E-15	2,95	2,04	GAATGCCTGCCTTTTGAAGA	TCTGTTACCAACACACGGTTA	98/368
COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	chrX:77157241-77157364	+	1,89E-14	1,11E-16	6,62	6,59	TTCACGATGTTTCCCTTGGT	TTGCCATTGTTTGCTGAATG	73/197
DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	chr10:70730748-70730822	+	2,91E-07	3,56E-07	11,32	10,57	GAAAGAAGCCCAGGAGCTGT	AGGGTGATTTCCTTTGCTT	96/171
DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	chr12:102283878-102284003	+	2,77E-03	3,37E-03	49,13	44,33	AGCCGCCTTCATTATCTCCT	TGGAGGTGTTGTTCCCGTAT	94/220
DTWD1	DTW domain containing 1	chr15:49925717-49925809	+	4,52E-03	2,83E-03	47,33	45,10	TGCAAAACTCTTAGCACCTGAA	TCCAGGAAAAATGAGTGCAA	100/193
EI24	etoposide induced 2.4 mRNA	chr11:125445699-125445827	+	2,46E-11	4,10E-10	41,83	36,38	GCACAGAGAAGAGCCCAGAG	CACCATTTCCAAGCACAAACAC	91/220
GMPS	guanine monphosphate synthetase	chr3:155622100-155622259	+	0,00E+00	0,00E+00	11,14	14,14	CAGAGAAGATGGAGTTTCAACA	GCAAAACAACTTCTTCCTTCTGA	83/243
HELLS	helicase, lymphoid-specific integrin, beta 1 (fibronectin	chr10:96335892-96336032	+	3,58E-08	2,46E-05	76,65	72,59	TTGTCTGTGGCCCTTTGTCT	TCCTCTGGGTTCCATGATA	100/241
ITGB1	receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	chr10:33225278-33225351	-	7,99E-15	5,44E-08	5,98	4,69	GAGTCGCGGAACAGCAGG	TCCAATCCAGAAAATTGGTTG	90/164
KIAA1432	KIAA1432	chr9:5721909-5722123	+	7,81E-10	4,93E-08	30,53	22,53	TGGGTTTGCTGTGTATTTAATG	ATCTTGTGGCCAAACTCCAT	100/315
LOH12CR1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1	chr12:12614291-12614418	+	7,29E-03	4,37E-03	23,03	15,86	CCGTGTCTTTTGACCAGAAT	CCTGCATGAAGCTGAACAGA	84/212
MBD3	methy1-CpG binding domain protein 3	chr19:1583252-1583359	-	2,42E-10	1,66E-10	61,66	58,91	CCCAGCAACAAGGTCAAGAG	GCTCAGCTTCTTCTCCACAGA	78/186
MIPEP	mitochondrial intermediate peptidase	chr13:24459914-24460046	-	1,20E-03	4,99E-03	39,68	26,72	AGACCGTGCTGATCTTCGAT	AGGGTGAGCGATTTTCACAA	83/216
MLL5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	chr7:104678831-104678972	+	9,56E-06	2,23E-06	75,38	63,26	GAGGTGCGGAGAGACTCCTT	CCACAGTGCTCATTGCAAAC	70/212
MTO1	mitochondrial translation optimization 1 homolog (S. cerevisiae)	chr6:74181183-74181279	+	1,28E-03	1,30E-03	30,51	28,47	CGTGTCAGTGGGGTTGTTTT	TCATGCCTCTCAGAAATGTCC	88/185
NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	chr10:103921014-103921088	+	2,42E-06	7,54E-06	10,95	11,68	GAAAAGAAAAAGGCGGCAGT	CTTGGCCTGAGGAGTCTCTG	99/174
NSUN3	NOP2/Sun domain family, member 3	chr3:93782656-93782884	+	3,13E-02	3,71E-03	41,83	36,38	TCCCTGGAGGCTTTTGTATA	CCCCTCTGATTTTGCTTTCA	96/325
NVL	nuclear VCP-like	chr1:224506353-224506519	-	1,55E-03	1,10E-03	49,41	44,61	GGCAAATATGTGGACATTGG	GCATTTCTTTTTCTTCGACCA	83/250

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	chr1:10579860-10580033	+	9,34E-10	8,88E-16	14,10	14,03	TCCAGGAAGTGAAAATGTGCT	CCCGGGAATTCTGTAGAAAC	74/248
POLE	polymerase (DNA directed), epsilon	chr12:133245925-133246041	-	2,11E-09	4,71E-07	50,98	43,90	AAAGTGCCTGTGGAGCAAGT	GTCC TTCAGGGAGGCAAGC	78/195
PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	chr11:112100140-112100209	+	5,35E-08	2,61E-10	26,67	27,63	CTGTTTGGGAAATGCAACAA	TCTCCATGTACTGTCAACCAC	88/158
PUM1	pumilio homolog 1 (Drosophila)	chr1:31427791-31427907	-	6,12E-14	8,10E-15	25,80	22,36	AGGGACCAGGACATTCACAG	ATCTTCCACTGCCATTCGTG	99/216
QTRT1	queuine tRNA-ribosyltransferase 1	chr19:10817384-10817501	+	1,49E-09	2,87E-07	45,88	42,93	AGAAATCCGTGCAGATCCAG	ACGTGGCCCAGTCACAGTA	89/207
RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	chr12:50395724-50395843	-	1,22E-04	4,62E-05	29,03	22,85	TTGGGACTCTTCTTTGGTGAA	GGGGACCATCAACAACTGT	86/206
RAD52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	chr12:1040003-1040133	-	2,60E-08	5,07E-08	61,66	52,70	CATCCAGAAGGCCCTGAG	ACCCGATGACCCTCAATGTA	99/230
SASS6	spindle assembly 6 homolog (C. elegans)	chr1:100592208-100592320	-	1,02E-03	1,19E-02	3,84	2,07	TGCAGGTGAAATGCAAAGAC	GAAACTGATTGTAGTTCAATGCTCA	73/186
SF3B3	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	chr16:70558767-70558920	+	0,00E+00	5,66E-15	41,19	35,32	TTGGTGGTGGCTTAAGTTTGT	CACCAACAGTACGGAGTCCA	96/250
SPG7	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)	chr16:89612280-89612438	+	0,00E+00	5,55E-16	54,17	60,83	ATTTTGGACGGTGCTCTGAT	GGTGTGCTCAAAAAATCTCC	100/259
SSR1	signal sequence receptor, alpha	chr6:7297329-7297446	-	2,22E-16	8,00E-12	9,97	7,39	GGGCTTCTGGTTATTGTTGG	TCATTCTGACTTGATGTACCCATT	98/216
SUGP2	SURP and G patch domain containing 2	chr19:19130696-19130791	-	2,12E-06	5,28E-07	40,77	38,66	AGGCCAAGGCTCCAAGTAGT	CGATGACACGTTTCACAAGC	96/192
SULT1A1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	chr16:28632584-28632796	-	2,08E-04	8,16E-06	10,70	16,76	CAAGTTGCTGTGCGACCA	ATCCTTTCCCTGGAGAATGC	85/298
TCFL5	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	chr20:61487477-61487601	-	2,50E-04	1,04E-04	46,23	41,68	GAGAGGCATAACCGAATGGA	TGCAGAACGGCACTAAGAGA	85/210
TNPO3	transportin 3	chr7:128659925-128660049	-	3,19E-04	1,41E-04	35,19	33,47	CTTTACCACGACCCAGATCC	TGGTCTGAGATCTCCCATGC	95/220
TOR1AIP1	torsin A interacting protein 1	chr1:179858973-179859016	+	3,63E-03	2,92E-03	31,78	26,60	ACGTCGACCCCTCTAAGAT	TTCAGAGAAATTGACCTTCTGTTG	70/141
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	chr3:10190388-10190498	+	3,11E-03	1,36E-03	37,31	30,86	GACGGACAGCCTATTTTTGC	TTGACTAGGCTCCGGACAAC	86/197
WRN	Werner syndrome, RecQ helicase-like	chr8:30921259-30921318	+	1,79E-05	1,89E-05	88,51	86,62	TGCTAGTGATTGCTCTTTCCTG	GTGGCCACTCCATGTCAAAT	86/146
ZFX	zinc finger protein, X-linked	chrX:24194577-24194784	+	0,00E+00	5,78E-10	58,45	52,81	TGCTCAGCTTCCCGAGTAAC	TCCATGTGTGTACCATCAGC	74/282
b) NEVALIDIRANI ALU EKSONI										
BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1	chr21:40676402-40676536	-	1,44E-04	3,56E-04	4,11	1,78	GTTGCCGAAGAGATTGGACT	AGGAGCCACATGCTTATTGG	85/220
DCUN1D5	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)	chr11:102951410-102951733	-	9,53E-06	1,64E-04	0,00	0,00	GGAAGAATGGTTAAAGGGAATG	CTGTGAGCGCAAAAAGTCAA	85/409
SFXN1	sideroflexin 1	chr5:174918497-174918635	+	2,75E-03	5,65E-04	0,00	0,00	CTGCACTGAGCGGGACCT	TTTGGTGGTAGTTCTCCAGACA	83/222
SSH2	slingshot homolog 2 (Drosophila)	chr17:28252264-28252573	-	3,92E-06	1,92E-06	-17,66	-7,70	GCTTTGGTCAACGGTCCAG	TTCTTCTCTCCCACTGTCTG	84/394

Priloga B: Validacija spremembe vključitve novih Alu eksonov, ki niso bili detektirani z DEXSeq, ampak so imeli najmanj 2-krat spremenjeno izražanje v transkriptih celic z znižanim izražanjem *HNRNPC*.

Simbol gena	Angleški opis gena	Koordinate eksona	Stran	RNAseq p vrednost (KD1)	RNAseq p vrednost (KD2)	% PCR spremembe (KD1)	% PCR spremembe (KD2)	Začetni PCR oligonukleotid	Končni PCR oligonukleotid	Velikost produktov (vključitev/izključitev) [bp]
a) VALIDIRANI ALU EKSONI										
ADSSL1	adenylosuccinate synthase like 1	chr14:105203269-105203425	+	7,59E-02	2,66E-06	63,00	65,53	GAGTACGACTTCCACCTGCTG	CAAACAAGCCTGGCAAGTG	97/254
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	chr15:91267265-91267374	+	6,85E-02	3,28E-03	21,00	15,93	GGGAAGTTTGATCCTGGTT	GACGTTCCTAGTTGCTCCTGTAGA	96/206
CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	chr9:123333181-123333269	-	3,10E-03	9,93E-02	56,79	48,71	AATGCTGGGTTGGGAAATG	AGTCCTTCATGTTCCGTGCT	82/171
CGRRF1	cell growth regulator with ring finger domain 1	chr14:54994502-54994601	+	1,31E-01	2,90E-03	31,20	22,03	TACTAATCCATCTTCAGCTTCA	CCCCCAGTAGCATGTAAGGA	89/189
CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1	chr8:67987041-67987161	+	5,19E-02	2,25E-04	61,95	58,11	GCCGAAGACAAAGCAGAGTT	TCAGAAAGCTTCGCTGACAA	77/198
DAP3	death associated protein 3	chr1:155678824-155678918	+	9,42E-02	1,01E-02	40,37	35,64	GTGTGTCGGTCGCCTAGTCT	GCCTTGTTATTCCTTCAGCA	75/170
DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23	chr12:49233258-49233334	-	6,65E-02	4,31E-03	20,47	19,80	GAGCTTCTGGCCAAGAAAAA	CTTCAGCCTCTCGTTCTGCT	82/159
EDC3	enhancer of mRNA decapping 3 homolog (S. cerevisiae)	chr15:74972143-74972252	-	1,17E-02	1,01E-02	8,76	6,67	CAGCCTGGTCTGAATTCCT	GGAGCAACAAAAACCGTCAT	98/208
IL6R	interleukin 6 receptor	chr1:154409911-154410069	+	1,13E-01	8,17E-03	2,11	11,20	CGAGTGGAGCGAGTGGAG	GGTGGACACCTCGTTCCTAG	85/244
NPLOC4	nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)	chr17:79530947-795310054	-	2,83E-02	1,11E-01	26,01	21,95	TTTCGCAAAATCCATTTCCT	TAGGTGGCCAAGCTATGGAA	76/135
NUP133	nucleoporin 133kDa	chr1:229601516-229601634	-	*	*	25,20	39,58	GAATGGGCTGAAGTGGTGAT	TTTGGCGATAATGACTAGCAG	77/196
NUP160	nucleoporin 160kDa	chr11:47848627-47848746	-	1,62E-02	7,48E-02	2,90	4,61	CCACCATGGGACTCTACCTG	CTCAGTGCTCACCAACTGGA	83/203
PCNX	pecanex homolog (Drosophila)	chr14:71520031-71520129	+	5,18E-02	2,04E-02	1,58	2,73	TCCGACCTGTGAAATTCCTGG	TATCAAGCTGGGAAGCCAAT	84/183
RPS15A	ribosomal protein S15a	chr16:18797615-18797658	-	6,82E-03	9,17E-02	4,40	4,19	AACCTCACAGGCAGGCTAAA	TTCTGCCATTTTCCAGGTC	83/197
YARS2	tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	chr12:32905908-32906083	-	1,05E-02	7,75E-01	11,08	8,44	TCAATTCCTTTGTCAGGCAACC	GAAGGGGCAGGAAAGTGAAC	71/247
ZNF791	zinc finger protein 791	chr19:12723040-12723130	+	9,11E-04	1,71E-01	32,00	10,13	TCCGTGAACCTTAGGGACAA	GGCTGAAGCTCACAGACACA	89/180
b) NEVALIDIRANI ALU EKSONI										
HAUS2	HAUS augmin-like complex, subunit 2	chr15:42852980-42853068	+	2,02E-01	6,26E-03	0,00	0,00	CCAGAAAAACCTGGAAATTGA	TGAGCCAAAAAGAAAGGATGA	78/167
KIAA0101	KIAA0101	chr15:64671411-64671508	-	4,17E-03	6,75E-01	0,00	0,00	TGCTTGTTCTTCCACCTCT	GGGTTCCTCCTGCATATTT	82/180
STAG1	stromal antigen 1	chr3:136111495-136111604	-	2,08E-02	6,31E-02	1,08	-0,75	ACTGATGGCTCTCCTTCCAA	GCAAACAGCCAAAAAGGATT	72/182
NUP98	nucleoporin 98kDa	chr11:3718950-3719043	-	3,39E-02	1,14E-01	0,00	0,00	TGGCTACCCACAACTGAGA	GCTACCTCACAGGCAAAAGG	100/194

* NUP133 Alu ekson je bil identificiran z vizualno detekcijo RNA-seq podatkov in ni bil določen z bioinformacijsko analizo.