

Η πρωτεΐνη A1cr – Σχέση με κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ
Βιολόγος
Μέλος Ε.ΔΙ.Π.
Εργαστήριο Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Σχολή Επιστημών Υγείας ΔΠΘ

ALR: Augmenter of Liver Regeneration

- Γνωστός και ως Ηπατοποιητίνη (Hepatopoietin, HPO), growth factor, *erv1* (*S. cerevisiae*) – like (augmenter of liver regeneration) (GFER).
- Αρχικά είχε περιγραφεί ως αυξητικός παράγοντας του ήπατος που προωθεί την αναγέννηση του, εντούτοις βρέθηκε να εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, με διαφορετικές υποκυτταρικές εντοπίσεις και με λειτουργίες που δεν σχετίζονται με την ηπατική αναγέννηση.
- Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του ανιχνεύτηκαν στο ήπαρ και τους όρχεις και τα χαμηλότερα στους μύς.

Γονίδιο ALR

- Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16p13.3-p13.12.
- Το γονίδιο περιλαμβάνει 3 εξόνια και 2 ιντρόνια και κωδικοποιεί 2 ισομορφές.

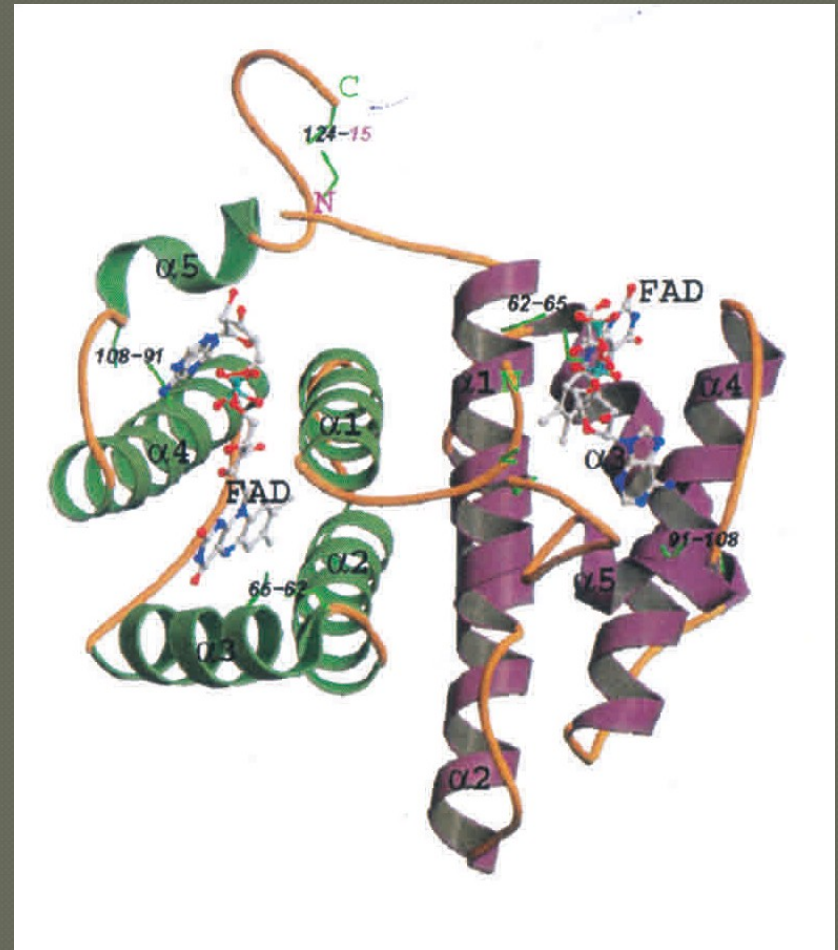
Πρωτεΐνη A1rp

- Η μικρότερη ισομορφή (*sf*) έχει μοριακό βάρος 15 kDa και αποτελείται από 125 aa.
 - Μπορεί να δράσει ως εξωκυττάρια κυτταροκίνη.
 - Μπορεί να συμμετέχει στα ενδοκυτταρικά, οξειδοαναγωγικά εξαρτώμενα, σηματοδοτικά μονοπάτια.
 - Απαντάται στον πυρήνα.
 - Η μεγαλύτερη ισομορφή (*lf*) έχει μοριακό βάρος 23 kDa και αποτελείται από 205 aa.
 - Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα καθώς και στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου.
- Διαφέρει από τη sf στο ότι διαθέτει επιπλέον 80 aa στο αμινο-τελικό της άκρο, όπου στεγάζεται ακόμα ένα C – X – X – C μοτίβο.*

Η δομή της πρωτεΐνης Alrp

Το καρβοξυ – τελικό άκρο περιέχει:

- ένα διατηρημένο Cys – X – X – Cys (C – X – X – C)
- ένα μη ομοιοπολιό FAD μόριο
- Οι δύο γειτονικές κυστεΐνες, αλληλεπιδρούν άμεσα με το δεσμευμένο FAD για την οξειδοαναγωγική αντίδραση.
- Το συντηρημένο μοτίβο πιθανό να αντιπροσωπεύει το οξειδοαναγωγικό ενεργό κέντρο του ενζύμου.



Πρωτεΐνη Alrp

- Είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Alrp/Ernlp.
- Ανήκει στις φλαβινο – σουλφυδρυλικές οξειδάσες που συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών.
- Λειτουργίες:
 1. Συμμετέχει στην αναγέννησης του ήπατος
 2. Συμμετέχει στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών
 3. Παρουσιάζει αντιαποπτωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Summary of studies investigating protein expression of ALR isoforms in different organs.

Organ	Species	Cell type	Remarks	Subcellular localization	Isoform (kDa)	Ref.
Brain	rat	neurons, glial cells	diencephalon, cerebellum, brainstem, cerebellum	nucleus, external envelope of mitochondria	23, 21	[56,57] ⁽³⁾
Muscle	human	glioma cell line T98G	–	cytosol	23, 21	[58]
		neuroblastoma cell line SH-5YSY	–	cytosol	15	[59] ⁽²⁾
	rat	skeletal muscle tissue	–	–	23, 21, 15	[56]
	human	muscle fibers	mitochondrial myopathy patients	mitochondrial inner membrane, cristae, cytosol	n.d. ⁽³⁾	[55,60]
Kidney	rat	tissue	–	–	23, 21, 15	[56]
		renal tubular epithelial cells	induced ALR expression in renal cortex, outer strip of outer medulla upon acute kidney injury	cytosol and apical plasma membrane	15	[61,62]
		tissue	induced ALR expression after obstructive nephropathy	–	15	[82]
Testis	mouse	tissue	–	soluble, insoluble fractions	40, 38, 23 23 n.r. ⁽⁴⁾	[23] ⁽⁵⁾
		spermatogonia, elongated sperm cells	seminiferous tubules	mitochondrial inner membrane	23, 21	[56]
Blood	rat	tissue	–	–	23, 21	[56]
	mouse	blood plasma	after hemorrhagic shock	–	ELISA ⁽⁶⁾	[91]
	rat	blood from liver	negative in venous, arterial blood	–	23, 21	[56]
	human	serum	after portacaval shunt, endotoxemia, sepsis	–	ELISA ⁽⁶⁾	[91]
		serum	after partial hepatectomy	–	21, ELISA ⁽⁶⁾	[66,69]
		serum of patients	normal or with various liver diseases	–	ELISA ⁽⁶⁾	[70,87,138]
Liver	mouse	myeloma cell line (U226)	–	–	23, 21	[124]
		leukemic T cells	–	–	23	[148]
		tissue	–	–	40, 23 n.r. ⁽⁴⁾	[23]
		tissue	–	–	23/22, 21/20 ⁽⁷⁾	[46,64]
	rat	tissue	normal and after EtOH feeding	–	40, 38, 36 n.r. ⁽⁴⁾ , 22, 20	[63]
		hepatocytes	normal, ALD, NASH liver tissue	–	40, 38, 36 n.r. ⁽⁴⁾	[67]
		tissue	–	–	40, 28, 23 n.r. ⁽⁴⁾	[23]
		tissue	–	–	23/22, 21/20 ⁽⁷⁾	[56,64,65]
		tissue	–	cytosol	23, 21	[66]
		hepatocytes, sparsely in non-paranchymal cells	–	cytosol	40, 38, 36 n.r. ⁽⁴⁾	[69]
	human	tissue	liver: fetal, adult and tumor	cytosol nucleus	23, 15	[73]
		tissue	human liver samples (normal, cholestasis and HCC)	–	23, 21, 15	[64,72,88]
		tissue	human liver samples (normal, ALD, NASH, HCV)	–	40, 38, 36 n.r. ⁽⁴⁾	[67]
		hepatocytes, cholangiocytes	–	cytosolic, perinuclear immunostaining	23	[71]
		hepatocytes, cholangiocytes	human liver sections (normal, ALD, HBV positive)	–	n.d. ⁽³⁾	[46]
		hepatocytes, cholangiocytes	rarely in cholangiocytes and endothelial cells	cytosol, negative or barely in nucleus	n.d. ⁽³⁾	[70,74]
		isolated primary human hepatocytes	–	cytosol	23, 21, 15	[64]
		HepG2	–	mitochondria cytosol, perinucleus	23, 21	[34]
		Hep3B, Huh7	–	mitochondria, cytosol	– 23, 21	[43,46,64,72]
Cervix	human	cell line SMMC-7721	–	–	23, 21	[64]
		cell line SMMC-7721	–	mitochondria / cytosol	23 / 15	[106] ⁽⁸⁾
		Hela cells	–	mitochondria	23	[103]

ALR και Απόπτωση

- Έλλειψη μιτοχονδριακού ALR αυξάνει το οξειδωτικό στρες, προκαλεί γρήγορη μείωση ATP και προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση και νέκρωση.
- Η αντιαποπτωτική δράση του ALR επιτυγχάνεται δια μεσολαβήσεως:
 1. Άμεση διεκόλυνση της συσσώρευσης αντιοξειδωτικών μέσα στα μιτοχόνδρια
 2. Αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 και κυτταροπλασματικής / εκκριτικής μορφής της κλαστερίνης

ALR και Απόπτωση

- ◎ Αναστέλλει την απόπτωση σε:
 1. Τ - Λεμφοκύτταρα
 2. Κύτταρα νεφρικών σωληνάρων
 3. Κύτταρα νευροβλαστώματος
 4. Κύτταρα γλοιώματος
 5. Σκελετικά μυϊκά κύτταρα

ALR και Καρκίνος

ANTICANCER RESEARCH 37: 3379-3383 (2017)

doi:10.21873/anticancer.11704

Review

Clinical Implications of Augmenter of Liver Regeneration in Cancer: A Systematic Review

KEVIN H. NGUYEN, AUSTIN H. NGUYEN and DEEPA V. DABIR

Department of Biology, Loyola Marymount University, Los Angeles, CA, U.S.A.

Table I. Summary of study details investigating ALR in cancer.

Study	Cancer type	N (total)	N (cancer)	Gender M:F	Mean age (range)	Tissue	Assays
Cao <i>et al.</i> , 2009	HCC	11	11	9:2	54.1 (37-66)	Frozen	qPCR, H2DCF-DA, flow cytometry
Dayoub <i>et al.</i> , 2011	HCC	64	53	-	-	Cell line HepG2, FFPE	IHC, migration/invasion assays, RT-PCR, WB
Denk <i>et al.</i> , 2010	HCC	-	-	-	-	Cell line HuH-7	WB, PCR, formazan formation cell viability assay
Gandhi <i>et al.</i> , 2015	HCC	-	-	-	-	FFPE, mice	IHC, WB, RT-PCR, transmission electron microscopy
Gatzidou <i>et al.</i> , 2015	CRC	42	23	11:12	68.8	Cell lines, frozen tissue	qPCR
Ilowski <i>et al.</i> , 2011	Various	-	-	-	-	Cell lines	WB, FACS
Polimeno <i>et al.</i> , 2009	Neuroblastoma	-	-	-	-	Cell line SH-SY5Y	Cell viability, flow cytometry, ICC, WB
Polimeno <i>et al.</i> , 2012	Glioma	-	-	-	-	Cell line T98G	WB, ICC, flow cytometry, electron microscopy
Shen <i>et al.</i> , 2013	T cell leukemia	-	-	-	-	Cell line Jurkat	Cell viability, flow cytometry, WB
Tang <i>et al.</i> , 2009	HCC	-	-	-	-	Cell line HepG2, mice	ICC, RT-PCR, mouse tumor model
Thasler <i>et al.</i> , 2005	HCC	71	9	5:4	66.2	FFPE, cell line HepG2	IHC, RT-PCR, WB
Yu <i>et al.</i> , 2010	HCC	Serum: 72 Tissue: 58	Serum: 20 Tissue: 6	-	-	Serum, FFPE	ELISA, RT-PCR, IHC

Table II. Summary of clinical implications of ALR in cancer.

Study	Cancer	Findings
Cao <i>et al.</i> , 2009	HCC	• ALR is up-regulated by greater than twofold in 81.9% of HCC specimens, compared to adjacent noncancerous tissue • Overexpression of ALR in HCC cell lines was associated with increased survival after irradiation, attenuates post-irradiation mitochondrial dysfunction, and inhibits mitochondria-dependent apoptosis • ALR silencing inhibited growth and survival of HCC lines, but had minimal effect on normal hepatocyte cells
Dayoub <i>et al.</i> , 2011	HCC	• The short ALR isoform of 15 kDa is expressed less in HCC cells, compared to normal liver tissue • Reexpression of the 15 kDa ALR isoform in HCC cells reduces migration and invasiveness and attenuates tumorigenicity
Denk <i>et al.</i> , 2010	HCC	• ALR expression in HCC tissue inversely correlates with tumor grade and rate of histological angioinvasion • Transfection of HCC cells with ALR does not decrease apoptosis after treatment with glycochenodeoxycholic acid
Gandhi <i>et al.</i> , 2015	HCC	• Liver-specific ALR knock-out mice demonstrated decreased mitochondrial respiratory function, defective mitochondrial fatty acid transport and ATP synthesis • They also demonstrated increased oxidative stress, steatosis, hepatocyte apoptosis, mitochondrial structural abnormalities • HCC developed in nearly 60% of liver-specific ALR knock-out mice by 1 year • ALR levels were lower in patients with advanced alcoholic liver disease and nonalcoholic steatohepatitis compared to controls
Gatzidou <i>et al.</i> , 2015	CRC	• ALR was expressed at higher levels in CRC cell lines compared to controls • ALR expression was significantly increased in well/moderately differentiated tumors compared to poorly differentiated tumors • ALR tended to be higher in CRC tissue compared to matched non-neoplastic tissue
Ilowski <i>et al.</i> , 2011	Various	• HCC cells cultured in rhALR significantly decreased apoptosis induced by ethanol, TRAIL, anti-Apo, TGF-β, and actinomycin D • rhALR treatment did not reduce apoptosis in bronchial, colonic, gastric, and pancreatic cell lines
Polimeno <i>et al.</i> , 2009	Neuroblastoma	• Neuroblastoma cells cultured with ALR exhibited improved survival in H₂O₂-induced apoptosis
Polimeno <i>et al.</i> , 2012	Glioma	• Glioma cells treated with rhALR dose-dependently decreased ROS levels in H₂O₂-treated cells • Silencing of ALR-encoding mRNA decreased clusterin and bcl-2 levels and increased apoptosis and apoptotic markers caspase-9, activated caspase-3, ROS, and mitochondrial degeneration
Shen <i>et al.</i> , 2013	T cell leukemia	• Leukemic T cells show upregulation of ALR compared to normal T lymphocyte controls • Culture of leukemic T cells with ALR reduces sensitivity to vincristine treatment but does not effect proliferation
Tang <i>et al.</i> , 2009	HCC	• Silencing of ALR inhibited growth of HCC cells <i>in vitro</i> • Silencing of ALR and treatment of anti-ALR monoclonal antibodies both inhibited xenografted HCC tumors in nude mice
Thasler <i>et al.</i> , 2005	HCC	• HCC tissue demonstrated intense cytoplasmic granular immunostaining for ALR • ALR mRNA expression in HCC tissue was significantly higher compared with normal liver tissue samples
Yu <i>et al.</i> , 2010	HCC	• Serum ALR levels did not differ among patients with HCC, chronic hepatitis B, and healthy controls • ALR mRNA and protein levels were significantly higher in HCC liver tissues compared to healthy controls

Κλινικές επιπτώσεις του ALR στον καρκίνο

- Η έκφραση του ALR καταγράφηκε τόσο με ποσοτικές όσο και με ποιοτικές αναλύσεις.
- Το προφίλ της έκφρασης του ALR παρουσιάστηκε τροποποιημένο στα διάφορα είδη κακοήθειας.
- Ο αυξητικός παράγων ALR εμφανίζεται να αυξάνεται σε κακοήθη κύτταρα και ιστούς.
- Θεραπεία των κυττάρων με ALR παρουσιάζει αντι-αποπτωτική επίδραση, ενώ η αναστολή του μειώνει την κυτταρική και καρκινική επιβίωση.

Ηπατοκυτταρικός καρκίνος (HCC) και ALR

- Αύξηση της έκφρασης του ALR στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς ιστούς
- Η κακοήθης κατάσταση σχετίζεται με το τροποποιημένο προφίλ του μεγάλου ισομορφές του ALR (23 kDa)
- Η σιγή ή αναστολή του ALR πιθανό να είναι αντι-καρκινική.

Ηπατοκυτταρικός καρκίνος (HCC) και ALR

Εξαίρεση στον κανόνα:

1. Μικρότερα επίπεδα έκφρασης του ALR στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο από ότι σε υγιή ιστό.
2. Ωστόσο, η έκφραση αυτή σχετίζονταν αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης και το histological angiogenesis.

Liver Regeneration Associated Protein (ALR) Exhibits Antimetastatic Potential in Hepatocellular Carcinoma

Rania Dayoub,^{1,5} Hannah Wagner,^{1,2} Frauke Bataille,³ Oliver Stöltzing,² Thilo Spruss,⁴ Christa Buechler,⁶ Hans-Jürgen Schlitt,^{1,2} and Thomas S Weiss^{1,5}

MOL MED 17(3-4)221-228, MARCH-APRIL 2011

Άλλα είδη καρκίνου και ALR: Καρκίνος του παχέος εντέρου – ορθού

JBUON 2015; 20(1): 84-91

ISSN: 1107-0625, online ISSN: 2241-6293 • www.jbuon.com

E-mail: editorial_office@jbuon.com

ORIGINAL ARTICLE

Augmenter of liver regeneration gene expression in human colon cancer cell lines and clinical tissue samples

Elisavet Gatzidou¹, Marina Mantzourani², Constantinos Giaginis^{1,3}, Athina Giagini¹, Efstratios Patsouris¹, Gregory Kouraklis⁴, Stamatios Theocharis¹

¹First Department of Pathology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens; ²First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University, Laikon General Hospital, Athens; ³Department of Food Science and Nutrition, School of the Environment, University of the Aegean, Myrina, Lemnos; ⁴Second Department of Propedeutic Surgery, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

● Μεταγραφικό προφίλ του ALR σε καρκίνο του παχέος εντέρου - ορθού

Ο αυξητικός παράγων ALR εκφράζεται:

- στον ανθρώπινο ιστό παχέος εντέρου, σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα
- 6 κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου
- 1 κυτταρική σειρά μυελογενούς λευχαιμίας
- 1 κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων «μη νεοπλασματικών»

Υλικά και Μέθοδοι

Βιολογικό Υλικό
Κυτταρικές Σειρές

Απομόνωση του RNA

Ποσοτικός έλεγχος του RNA

Ποιοτικός έλεγχος του RNA

Σύνθεση συμπληρωματικού DNA
(cDNA)

Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός
των ακολουθιών cDNA
με τη μέθοδο της
Real time qRT-PCR

Ποιοτικός έλεγχος του προϊόντος
της Real time qRT-PCR

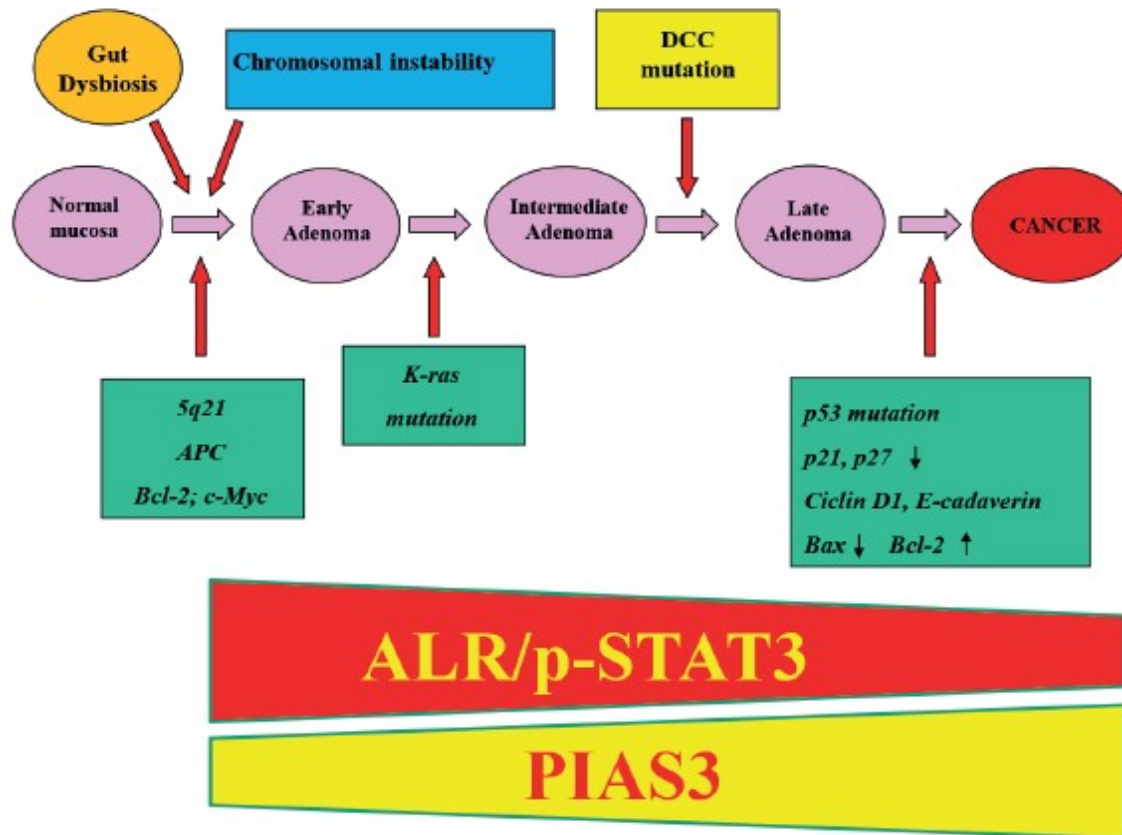
Άλλα είδη καρκίνου και ALR:

Καρκίνος του παχέος εντέρου - ορθού

- Αυξημένη έκφραση του ALR σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (διαφοροποίηση) και το στάδιο της νόσου (σταδιοποίηση κατά **Dukes**).
- Τα επίπεδα έκφρασης στους καρκινικούς ιστούς είναι υψηλότερα σε περιπτώσεις νεοπλασμάτων ανωτέρας (Βαθμός διαφοροποίησης 1) και μέσης διαφοροποίησης (Βαθμός διαφοροποίησης 2) σε σύγκριση με τα χαμηλής διαφοροποίησης (Βαθμός διαφοροποίησης 3).
- Αντίστροφη συσχέτιση παρατηρήθηκε και ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου και στο ιστοπαθολογικό στάδιο. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALR στον καρκινικό ιστό είναι υψηλότερα σε περιπτώσεις σταδίου **A** και **B** κατά **Dukes** σε σύγκριση με αυτές του σταδίου **C** κατά **Dukes**.
- Εμπλέκεται η έκφραση του γονιδίου ALR με τα πρώιμα στάδια της νόσου.
- Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν και στις κυτταρικές σειρές.

Καρκίνος του παχέος εντέρου και ALR

MULTISTEP MODEL OF COLON CARCINOGENESIS



The role of PIAS3, p-STAT3 and ALR in colorectal cancer: new translational molecular features for an old disease

Άλλα είδη καρκίνου και ALR: Λευχαιμία και Πολλαπλούν Μυέλωμα

Τ λεμφοκυτταρική λευχαιμία:

1. Αυξημένη έκφραση του ALR στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή κύτταρα
2. Αναστολή του ALR μπορεί να μειώσει την ευαισθησία στην βινκριστίνη
3. Ανταγωνίζεται τη βινκριστίνη στην παρεμπόδιση από τη φάση S του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M.
4. Εμφανίζει αντιαποπτωτικές ιδιότητες

Πολλαπλούν Μυέλωμα:

1. Σιγή της έκφρασης του ALR σε κυτταρική σειρά ανθρώπινου μυελώματος αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δίνει το έναυσμα για τη απόπτωση.
2. Φραγή της εξωκυττάριας μικρής ισομορφής (15kDa) ALR αναχαιτίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω MAPK και STAT3 σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς και μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου χωρίς να αυξάνεται η απόπτωση.

Συμπεράσματα

- Η υπάρχουσα βιβλιογραφία προσδίδει ογκογόνο δράση στον αυξητικό παράγοντα ALR.
- Η πλήρη λειτουργία στην ανάπτυξη του καρκίνου πρέπει να διελευκανθεί.

Μέλλον και ALR

1. Ποιες είναι οι λειτουργίες των δύο ισομορφών του ALR και τι επίδραση θα έχουν στη βιολογία του καρκίνου;
2. Μπορεί να προταθεί ως θεραπευτικός στόχος, ως θεραπεία σε διάφορα είδη καρκίνου;
3. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης;

Ευχαριστώ