



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ανάλυση μεταμεταγραφικών δικτύων στη φυσιολογία και τον
μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΣΓΑΝΤΖΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2009





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάλυση μεταμεταγραφικών δικτύων στη φυσιολογία και τον
μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΣΓΑΝΤΖΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2009



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321975



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Σγαντζή Νικολάου: 28-11-2005

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

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παπαμαρκάκη Θωμαή Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Κοντογιάννης Δημήτριος Ερευνητής Β' Ινστιτούτου Ανοσοβιολογίας ΕΚΕΒΕ «Α. Φλέμινγκ»

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-12-2005

«Ανάλυση μεταμεταγραφικών δικτύων στην Φυσιολογία και τον μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου»

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

1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Παπαμαρκάκη Θωμαή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Φριλίγγος Ευστάθιος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κοντογιάννης Δημήτριος Ερευνητής Β' Ινστιτούτου Ανοσοβιολογίας ΕΚΕΒΕ «Α. Φλέμινγκ»

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-6-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Κ^{ου} Κοντογιάννη στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 264.

Για τους περισσότερους ανθρώπους της ηλικίας μου είναι ιδιαίτερα δύσκολο να μπορέσουν να προσδιορίσουν τι θέλουν να κάνουν στη ζωή τους για να αισθάνονται ολοκληρωμένοι και να εκφράζουν τη δημιουργικότητά τους. Έτσι και εγώ, πριν από τρεισήμισι χρόνια βρέθηκα στο γραφείο του κ. Κοντογιάννη, βρισκόμενος σε μια κατάσταση αναζήτησης στόχων. Είναι γεγονός, ότι η στάση που έδειξε απέναντι μου τη δεδομένη στιγμή, καθώς και η πίστη που έδειξε σε μένα όλο αυτό τον καιρό της συνεργασίας μας, αποτέλεσαν ένα σημαντικά προωθητικό και κατευθυντήριο βήμα για τις μελλοντικές μου επιδιώξεις. Χωρίς μελοδραματισμούς, θεωρώ δεδομένο ότι στα πλαίσια αυτής της συνεργασίας οι συναισθηματικές αλληλεπιδράσεις είναι αναπόφευκτες. Για αυτό το λόγο οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο πρόσωπο του κ. Κοντογιάννη, που τις περισσότερες φορές μου συμπεριφέρθηκε σαν φίλος και σύμβουλος, παρά ως ένας αποστασιοποιημένος επιβλέπων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, την κα Παπαμαρκάκη και τον κ. Λαζαρίδη για τη βοήθεια τους και για τις καίριες επισημάνσεις τους.

Σε αυτό το σημείο μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα άτομα που στάθηκαν δίπλα μου τόσο σε επαγγελματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής. Από τα μέλη του εργαστηρίου, πρώτον απ' όλους οφείλω να ευχαριστήσω το Μάριο που από την πρώτη μέρα που μπήκα στο εργαστήριο έδειξε αμέριστη προθυμία να με εξοικειώσει με το χώρο και τις τεχνικές του εργαστηρίου. Πέρα από τις ωραίες στιγμές, τα γέλια μέχρι και τους τσακωμούς που είχαμε, στάθηκε και στέκεται ακόμα, αξιόπιστος φίλος. Δεν γίνεται φυσικά να παραβλέψω να ευχαριστήσω και τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Βίκυ, Ολυμπία και Σταύρο για την εμπειρία τους και τη συνεισφορά τους. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα όχι κατά πολύ νεότερα μέλη. Ευχαριστώ λοιπόν την κα Γραμμενούδη (ή αλλιώς φυτάκι) για την επιστημονική της μεθοδικότητα που προσπάθησε να μου δείξει και πάνω από όλα για την υπομονή της! Ευχαριστώ επίσης τη lab manager και νυν μαμά, Αναστασία η οποία, πέρα από την οργανωτικότητα που τη διέπει, «προστάτευσε» το εργαστήριο με τις παρατηρήσεις τις...και με τις φωνές τις ενίοτε. Για να κλείσει αυτή η παράγραφος με την καλύτερη θετική ενέργεια, επέλεξα να ευχαριστήσω στο τέλος τη συνεργάτιδα και φίλη Ανθή, η οποία πραγματικά είναι μία αστείρευτη πηγή θετικής ενέργειας που προσπαθεί να τη μεταδίδει με το αξέχαστο γέλιο της.



Θα ήθελα τέλος, να αφιερώσω αυτή την εργασία στον εαυτό μου, όχι όμως για εγωιστικούς λόγους, αλλά για να μου θυμίζει ότι όταν ακολουθείς ένα δύσκολο και άγνωστο μονοπάτι, πρέπει να κοπιάσεις και να αφοσιωθείς πραγματικά ώστε να μπορέσεις να αγγίξεις τα χώματα της Ιθάκης σου όποια και αν είναι.

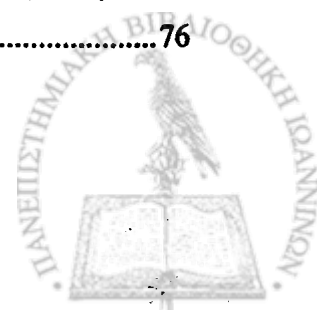


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Η σημασία του RNA στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	12
1.2 Γενικές αρχές RNA μεταβολισμού	13
1.2.1 Ωρίμανση	13
1.2.2 Έξοδος στο κυτταρόπλασμα-Πυρηνικό/Κυτταροπλασματική μεταφορά-Υποκυτταρικός εντοπισμός.....	14
1.2.3 Μετάφραση	15
1.2.4 Σταθεροποίηση-Αποδόμηση	17
1.3 ARE-Διαμεσολαβούμενος μεταμεταγραφικός έλεγχος	18
1.3.1 Cis στοιχεία-ARE (AU-rich elements)	18
1.3.2 Πρωτεΐνες που δεσμεύουν ARE στοιχεία (ARE-binding proteins, ARE-BPs) ..	20
1.3.3 Κυτταροπλασματικές δομές σχετιζόμενες με τη δράση των ARE-BPs	23
1.3.4 Ο ρόλος του ARE-διαμεσολαβούμενου μεταμεταγραφικού ελέγχου σε παθολογικές καταστάσεις	26
1.4. Η ARE-BP HuR/HuAElavl	28
1.4.1 Γενικά.....	28
1.4.2 Δομή και χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης HuR.....	30
1.4.3 Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη δράση της πρωτεΐνης HuR	33
1.5 Η ARE-BP AUF1/hnRNPD	35
1.5.1 Δομή, χαρακτηριστικά και μεταφραστικές τροποποιήσεις του AUF1	35
1.6 Αναπνευστικό σύστημα	39
1.6.1 Γενικά.....	39
1.6.2 Εμβρυϊκή ανάπτυξη κατώτερου αναπνευστικού στον ποντικό	40
1.6.3 Ανατομία – Ιστολογία αγωγών κατώτερου αναπνευστικού	42
1.6.3.1 Τραχεία - Βρόγχοι.....	44
1.6.3.2 Απώτεροι βρόγχοι (δευτεροταγείς και τριτοταγείς) - Βρογχιόλια	45
1.6.3.3 Τελικά και αναπνευστικά βρογχιόλια	46
1.6.3.4 Αναπνευστικές κυψελίδες - Αναπνευστικοί αγωγοί.....	47



1.7 Μοριακά μονοπάτια κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα	50
1.7.1 Εγκαθίδρυση κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.....	50
1.7.2 Μορφογένεση του βρογχικού δένδρου - Παράγοντες που καθορίζουν το αναπτυξιακό πρόγραμμα των διαδοχικών διακλαδώσεων	51
1.7.2.1 Μορφογένεση των πνευμονικών εκβλαστημάτων-οριοθέτηση του FGF10....	52
1.7.2.2 Η μορφογένεση του βρογχικού δένδρου-ρύθμιση του FGF10 μονοπατιού	53
1.7.2.2α Η δράση του Sprouty2 (Spry2) και του Shh μονοπατιού	53
1.7.2.2β Το BMP μονοπάτι στη ρύθμιση των διαδοχικών διακλαδώσεων	54
1.7.2.2γ Το δίκτυο Wnt – FGF στη ρύθμιση της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου	55
1.8 Ο ρόλος της HuR και του AUF1 στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση	58
1.9 Καρκινογένεση - Μετασχηματισμός του πνευμονικού επιθηλίου	59
1.9.1 Γενικά.....	59
1.9.2 Καρκίνος	59
1.9.3 Καρκίνος του πνεύμονα	61
1.9.4 Μεταμεταγραφικός έλεγχος - Καρκίνος του πνεύμονα	62
1.9.5 Συσχέτιση της HuR και του AUF1 με την καρκινογένεση.....	63
1.10 ΣΚΟΠΟΣ	67
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	69
2.1 Γενικά χημικά και αντιδραστήρια	70
2.1.1 Ειδικά ένζυμα - Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας	70
2.1.2 Θρεπτικά μέσα - Αντιδραστήρια κυτταροκαλλιέργειας	70
2.1.3 Ειδικά πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	71
2.1.4 Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός	71
2.1.5 Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοσύτρωση Western και οι αραιώσεις τους.....	72
2.1.6 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημεία.....	73
2.1.7 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-PCR.....	74
2.1.8 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική ανάλυση των μεταγραφημάτων με Real-Time PCR	76
2.2 Καινοτόμες διαγονιδιακές τεχνολογίες και πειραματικά πρότυπα για την ανάλυση γονιδίων	76



2.2.1 Εφαρμογή της τεχνολογίας επιλεκτικής γονιδιακής τροποποίησης στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.....	80
2.3 Πειραματικές μέθοδοι	82
2.3.1 Ανάλυση γονοτύπου	82
2.3.2 Απομόνωση πνευμόνων	83
2.3.2.1 Ιστολογία και ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε τομές παραφίνης	83
2.3.2.2 Απομόνωση RNA με Trizol.....	85
2.3.2.2.1 Ποσοτική ανάλυση μεταγραφημάτων RNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).....	85
2.3.2.2.2 Ανάλυση μικροσυστοιχιών RNA.....	87
2.3.2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών με διάλυμα Laemmli	88
2.3.2.3.1 Στύπωμα κατά Western.....	88
2.3.2.3.1α Παρασκευή πηκτής SDS-PAGE.....	88
2.3.2.3.1β Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε SDS-page πηκτή	88
2.3.2.3.1γ Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	89
2.3.2.3.1δ Προσκόλληση αντισωμάτων στην μεμβράνη	89
2.3.2.3.1ε Ανίχνευση σήματος πρωτεϊνών.....	89
2.3.2.3.1στ Απομάκρυνση αντισωμάτων (Stripping)	90
2.3.2.4 <i>In situ</i> ανίχνευση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης σε τομές παραφίνης/κρυστάτη.....	90
2.4 Ex vivo πειραματικές διαδικασίες	91
2.4.1 Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός υποπληθυσμών βρογχοκυψελιδικών βλαστικών κυττάρων – BASCs	91
2.4.2 Καλλιέργειες πνευμονικών εκβλαστημάτων	93
2.5 In vitro πειραματικές διαδικασίες	93
2.5.1 Μέτρηση της σταθερότητας του mRNA μέσω της προσθήκης Ακτινομυκίνης D	93
2.6 In vivo πειραματικές διαδικασίες	93
2.6.1 Πρωτόκολλο χημικής επαγωγής της καρκινογένεσης με ουρεθάνη.....	93
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
3.1 Ο ρόλος της HuR στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία του πνεύμονα	96
3.1.1 Η καθολική απαλοιφή της HuR είναι εμβρυονικά θνησιγενής και προκαλεί σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη του πνεύμονα.....	96



3.1.2 Ο φαινότυπος στους εμβρυϊκούς πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών σχετίζεται με διαταραχές στο μεσεγχυματικό τμήμα του πνεύμονα	98
3.1.3 Η διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου δεν καταστέλλεται από την καθολική απαλοιφή της HuR	100
3.1.4 Η HuR ελέγχει το δίκτυο αλληλεπιδράσεων TBX4-FGF10-BMP4 κατά το στάδιο ανάπτυξης του βρογχικού δένδρου	103
3.1.5 Η εξωγενής χορήγηση του παράγοντα FGF10 σε πνευμονικά εκβλαστήματα ηλικίας E11.5, αναστρέφει το φαινότυπο	108
3.2 Ο ρόλος της HuR στην παθοφυσιολογία και το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου	110
3.2.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο επιθήλιο του πνεύμονα.....	110
3.2.2 Η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο προδιαθέτει την ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων	116
3.2.3 Οι διαγονιδιακοί ποντικοί που υπολείπονται της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο, εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά βλαστικών κυττάρων	118
3.2.4 Η απουσία της HuR από το πνευμονικό επιθήλιο προωθεί την καρκινογένεση κατόπιν καρκινικού ερεθίσματος.....	121
3.2.5 Προσδιορισμός των mRNA στόχων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση ...	124
3.3 Ο ρόλος της ριβονουκλεοπρωτεΐνης AUF1 στην παθολογία και το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου	125
3.3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με καθολική απαλοιφή της λειτουργικής πρωτεΐνης του AUF1-Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.....	125
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	131
4.1 Η HuR είναι απαραίτητη στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα	132
4.2 Η απώλεια της HuR προδιαθέτει το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου.....	133
4.3 Η πρωτεΐνη hnRNP/AUF1 δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του πνευμονικού επιθηλίου.....	137
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	139
5.1 Περίληψη.....	140
5.2 Summary.....	142
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	143



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**A**

AMPK	Adenosine Monophosphate Kinase (Κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης)
AP-1	Activator Protein I (Πρωτεΐνη ενεργοποίησης 1)
APRIL	Acidic protein rich in leucine (Οξίνη πρωτεΐνη πλούσια σε λευκίνη)
ARE	AU-rich elements (Στοιχεία πλούσια σε βάσεις Αδενίνης-Ουρακίλης)
AREBP	ARE binding protein (Πρωτεΐνη που προσδένεται στα στοιχεία ARE)
ARED	ARE database (Ηλεκτρονική βάση δεδομένων για τα στοιχεία ARE)
AUF1	ARE/poly(U)-binding degradation factor (Παράγοντας αποικοδόμησης που προσδένεται σε στοιχεία ARE/πλούσια σε ουρακίλη)

B

BMDM	Bone marrow derived macrophages (Μακροφάγα από το μυελό των οστών)
BRF1	Butyrate Response Factor 1 (Παράγοντας απόκρισης βουτυρικού άλατος 1)
BASCs	Bronchial - Alveolar Stem Cells (βρογχο-κυψελιδικά βλαστικά κύτταρα)
BADJ	Bronchial - Alveolar Duct Junction (σύζευξη βρογχο-κυψελιδικού αγωγού)
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4 (οστικός μορφογενετικός παράγοντας 4)

C

CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (Σχετιζόμενη με συνενεργοποιητή μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης 1)
CDE	Constitutive Decay Element (Ουσιαστικό στοιχείο αποικοδόμησης)
cDNA	Complementary DNA (Συμπληρωματικό DNA)
COX2	Cyclooxygenase 2 (Κυκλοοξυγενάση 2)
CRD	Coding Region Determinant (Καθοριστής κωδικής περιοχής)
CRD-BP	CRD-Binding Protein (Πρωτεΐνη που προσδένεται στο CRD)
Cre	Causes recombination (Προκαλεί ανασυνδυασμό)
CREB	cAMP Response Element Binding Protein (Πρωτεΐνη που προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης στο cAMP)
CRM1	Chromosomal region maintenance protein 1 (Πρωτεΐνη διατήρησης της χρωμοσωμικής περιοχής 1)



D

dd	double distilled (δισ-απεσταγμένο)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
dpc	days post conception (μέρες μετά τη σύλληψη)
dsRBD	double stranded RNA Binding Domain (περιοχή πρόσδεσης δίκλωνου RNA)

E

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλένο-διάμινο-τετραοξικό οξύ)
EGF	Epidermal Growth Factor (Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)
eIF2α,2B,3,4E,4G	Eukaryotic Initiation Factor 2α,2B,3,4E,4G (Παράγοντας έναρξης της μετάφρασης στους ευκαρυώτες 2α,2B,3,4E,4G)
EJC	Exon Junction Complex (Σύμπλοκο θέσης συρραφής εξονίων)
ELAV-like	Embryonic Lethal Abnormal Vision-like (Παρόμοιο με εμβρυικά θνησιγόνο ανωμαλία στην όραση)
ERF	EGF response factor (Παράγοντας απόκρισης στον EGF)
ERK	Extracellular-signal -Regulated Kinase (Κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάρια σήματα)
ES	Embryonic Stem cells (Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα)

F

FBS	Fetal Bovine Serum (Ορός εμβρύου βοός)
FCMD	Fukuyama-type Congenital Muscular Dystrophy (τύπου-Fukuyama συγγενής μυική δυστροφία)
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9 (Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 9)
FGF10	Fibroblast Growth Factor 10 (Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 10)

G

GAPDH	Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (Αφυδρογονάση της 3- φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης)
GDP/GTP	Guanosine diphosphate/triphosphate (Δ/Τρι-φωσφορική Γουανοσίνη)
GH	Growth Hormone (Αυξητική ορμόνη)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (Παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων)
GOS24	G0/G1 switch regulatory gene 24 (Ρυθμιστικό γονίδιο για τη μετάπτωση G0/G1 24)
GST	Glutathione-S Transferase (Τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης)



H

HBM	HuR Binding Motif (Μοτίβο πρόσδεσης της HuR)
hnRNP A1, C, D	Heterogeneous nuclear RNP A1, C, D (Ετερογενές πυρηνικό RNP A1, C, D)
HNS	HuR Nucleocytoplasmic Shuttling Sequence (Αλληλουχία για την αμφίδρομη πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση της HuR)
HPV-16	Human Papilloma virus-16 (Ιός ανθρώπινων κονδυλωμάτων στέλεχος 16)
Hsp 70	Heat Shock protein 70 (Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70)

I

IFN α, γ	Interferon α, γ (Ιντερφερόνη α, γ)
IGF II	Insulin-like Growth Factor (Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας)
IKK	Inhibitor of κ B Kinase (Κινάση του αναστολέα του κ B)
IL-1R	IL-1 Receptor (Υποδοχέας της Ιντερλευκίνης 1)
IL-1 $\beta, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12$	Interleukin 1 $\beta, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12$ (Ιντερλευκίνη 1 $\beta, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12$)
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (Επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξειδίου)
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside (Ισοπρόπυλο β -D-θειογαλακτοζίτης)
IRAK	IL-1R-associated kinase (κινάση που σχετίζεται με τον IL-1 R)
IRE	Iron Responsive Element (Στοιχείο απόκρισης στο σιδήρο)
IRP	Iron Regulatory Protein (Ρυθμιστική πρωτεΐνη σιδήρου)
I κ B	Inhibitor of κ B (Αναστολέας του κ B)

J

JNK	Jun N-terminal kinase (Κινάση της αμινοτελικής περιοχής του Jun)
-----	--

K

Kb	Kilo bases (Κιλοβάσεις)
kD	Kilo Dalton (Κιλοντάλτον)
KH motif	K homology motif (Μοτίβο ομολογίας K)
KSRP	KH-type splicing regulatory protein (πρωτεΐνη ρύθμισης του ματίσματος τύπου KH)



L

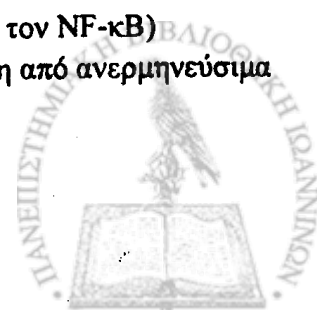
loxP	locus of crossing over-x- from P1 (Γενετικός τόπος ανασυνδυασμού από τον βακτηριοφάγο P1)
LPS	Lipopolysaccharide (Λιποπολυσακχαρίτης)
LRR	Leucine Rich Region (Περιοχή πλούσια σε λευκίνη)

M

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα)
MAPKAPK-2	MAPK Activated Protein Kinase 2 (2- Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από τις MAPK)
MCP-1	Monocyte chemo-attractant protein -1 (Χημειοτακτική Πρωτεΐνη μονοκυττάρων -1)
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts (Εμβρυικοί Ινοβλάστες Ποντικού)
MEKK1-4	MAPK/ERK kinase kinase 1-4 (MAPK/ERK κινάση κινάση 1-4)
mg	milligram (χιλιοστόγραμμα)
MIF	Macrophage Inhibition Factor (Παράγοντας αναστολής μακροφάγων)
MIP 1α,1β,2	Macrophage Inflammatory Protein 1α,1β,2 (Προφλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1α, 1β, 2)
mi-RNAs	micro-RNA (μικροRNA)
MKKKs	MKK Kinases (Κινάσες των MKK)
MKKs	MAPK Kinases (Κινάσες των MAPK)
ml	milliliter (χιλιοστόλιτρο)
mM	milliMolar (χιλιοστομοριακότητα)
mRNA	messenger RNA (Αγγελιοφόρο RNA)
mRNP	messenger RNP (Αγγελιοφόρα RNP)
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88 (Πρωτεΐνη αρχικής απόκρισης της μυελώδους διαφοροποίησης 88)
μg	microgram (μικρογραμμάριο)

N

NaCl	Sodium Chloride (Χλωριούχο νάτριο)
NaOH	Sodium Hydroxide (Υδροξείδιο του νατρίου)
NES	Nuclear Export Signal (Σήμα εξόδου από τον πυρήνα)
NF-κB	Nuclear Factor κB (Πυρηνικός παράγοντας κB)
NIK	NF-κB Inducing Kinase (Κινάση η οποία επάγει τον NF-κB)
NMD	Non-sense Mediated mRNA Decay (Εξαρτώμενη από ανερμηνεύσιμα κωδικόνια αποσύνθεση του mRNA)



NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain (Περιοχή ολιγομερισμού – πρόσδεσης νουκλεοτιδίων)
NPC	Nuclear Pore Complex (Σύμπλοκο πυρηνικού πόρου)
NR	Nuclear hormone Receptor (Πυρηνικός Υποδοχέας ορμονών)
NUP475	Nuclear Protein 475 (Πυρηνική πρωτεΐνη 475)

P

PABPC	Poly(A)-Binding Protein Cytoplasmic (Κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που προσδένεται στην πολύ-A ουρά)
PABPN	Poly(A)-Binding Protein Nuclear (Πυρηνική πρωτεΐνη που προσδένεται στην πολύ-A ουρά)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns (Παθογόνο-σχετιζόμενα μοριακά πρότυπα)
P-bodies	Processing bodies (Σωμάτια-P)
PCR	Polymerase chain reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase (Κινάση της 3-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης)
PRRs	Pattern Recognition Receptors (Υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων)

R

R-IP	Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (Ανοσοκατακρήμνηση Ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων)
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Σύμπλοκο αποσιώπησης εξαρτώμενο από RNA)
RNA	Ribonucleic acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
RNP	Ribonucleoprotein complex (Ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο)
RPA	RNAse Protection Assay (Μέθοδος προστασίας από ριβονουκλεάσες)
RRM	RNA Recognition Motif (Μοτίβο αναγνώρισης RNA)
RT	Reverse transcriptase (Αντίστροφη μεταγραφή)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
rtTA	reverse Tetracycline Transactivator (Αντίστροφος διαενεργοποιητής της τετρακυκλίνης)

S

SAPK	Stress Activated Protein Kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από στρες)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Δωδέκυλο-θειϊκό νάτριο)



SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης)
SGs	Stress Granules (κοκκία στρες)
si-RNAs	Small-interfering RNA (Μικρά παρεμβατικά RNA)
SMNI	Survival of Motor Neuron 1 (Γονίδιο επιβίωσης των κινητικών νευρώνων 1)
snRNPs	small nuclear RNP (μικρά πυρηνικά RNP)
T	
TAK1	TGF- β -Activated Kinase 1 (Κινάση 1 που ενεργοποιείται από TGF- β)
TetR	Repressor of Tetracycline (Καταστολέας της τετρακυκλίνης)
TGF β 1,2,3	Transforming growth factor β 1,2,3 (Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β 1,2,3)
TIA-1	T-cell restricted intracellular antigen-1 (Ειδικό των Τ-λεμφοκυττάρων ενδοκυττάριο αντιγόνο-1)
TIAR	T-cell restricted intracellular antigen-1 Related (Σχετιζόμενο με το TIA-1)
TIR	Toll/IL1 Receptor (Υποδοχέας των Toll/IL1)
TIRAP/MAL	TIR-associated protein/MyD88-adaptor-like (Πρωτεΐνη που σχετίζεται με την TIR/όμοιο με προσαρμοστή του MyD88)
TIS11	TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)-induced sequence 11 (Επαγόμενη από TPA αλληλουχία 11)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Παράγοντας νέκρωσης όγκων)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (Υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκων)
tTA	tetracycline Transactivator (Διαενεργοποιητής της τετρακυκλίνης)
TTP	Tristetraprolin (Τριστετραπρολίνη)
U	
UTR	untranslated region (μη μεταφραζόμενη περιοχή)
V	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)

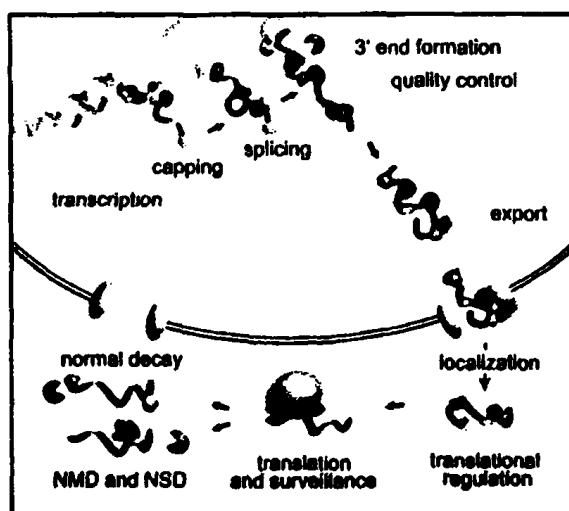


1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Η σημασία του RNA στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Το κεντρικό δόγμα που είχε προταθεί τη δεκαετία του '60, για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είχε περιοριστεί στο επίπεδο της μεταγραφής του DNA σε RNA. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η ροή της γονιδιακής πληροφορίας ελέγχεται αποκλειστικά από τους μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες δηλαδή, που είτε αναστέλλουν ή προάγουν την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης σε ειδικές γενωμικές περιοχές (promoter sites) από τις οποίες αρχίζει η μεταγραφή. Το δόγμα αυτό εξηγούσε σχετικά ικανοποιητικά τα βιολογικά φαινόμενα και κυριάρχησε για αρκετές δεκαετίες. Παρόλα αυτά, το δόγμα αυτό άρχισε προοδευτικά να χάνει την ισχύ του καθώς η έννοια του γονιδίου έγινε αμφίσημη. Αρχικά, η πιθανότητα εναλλακτικού ματίσμος του RNA σήμαινε ότι η πληροφορία προερχόμενη από μία γονιδιακή περιοχή μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου ή του περιβάλλοντός του. Σε βιοχημικό επίπεδο το εναλλακτικό μάτισμα προϋποθέτει την παρουσία ριβονουκλοπρωτεϊνικών μορίων, των λεγόμενων snRNPs που δρουν κατά *trans* και καταλύουν αυτή τη διαδικασία. Επίσης, στο «εν τω γεννάσθαι» RNA προσδένονται πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA, RNA-BPs) οι οποίες προάγουν ή αναστέλλουν τη δημιουργία ριβονουκλοπρωτεϊνικών συμπλόκων (RNP – Ribo Nucleic Protein, σύμπλοκα) (εικόνα 1)



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής των mRNPs

Οι μεταμεταγραφικοί μηχανισμοί που καθορίζουν την τύχη του mRNA περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση cis-στοιχείων των μορίων RNA με ειδικές πρωτεΐνες (RNA Binding Proteins-RBPs) και δημιουργούν ριβονουλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (Ribonucleoprotein complexes-RNPs) (Hieronymus and Silver, 2004)

Η δημιουργία αυτών των συμπλόκων είναι απόρροια της ιδιαίτερης ιδιότητας του RNA, να διαμορφώνει δευτεροταγείς δομές, ώστε να καλύπτει ή να εκθέτει ορισμένες αλληλουχίες και να επιτρέπει ή όχι την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Η



μεταφορά του RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ο υποκυτταρικός του εντοπισμός, καθώς και ο μεταβολισμός του, ρυθμίζονται κατά κύριο λόγο από την αλληλεπίδραση των RNP συμπλόκων με τις εκάστοτε RNA-προσδεδεμένες πρωτεΐνες. Συνεπώς, ο μεταμεταγραφικός έλεγχος της γονιδιακής πληροφορίας αναδεικνύει την πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αλλά παράλληλα εξηγεί και την πλαστικότητα που μπορεί να εμφανίζει το κύτταρο τόσο σε ερεθίσματα προερχόμενα από το μικροπεριβάλλον του, όσο και σε ενδοκυτταρικές διαδικασίες.

1.2 Γενικές αρχές RNA μεταβολισμού

1.2.1 Ωρίμανση

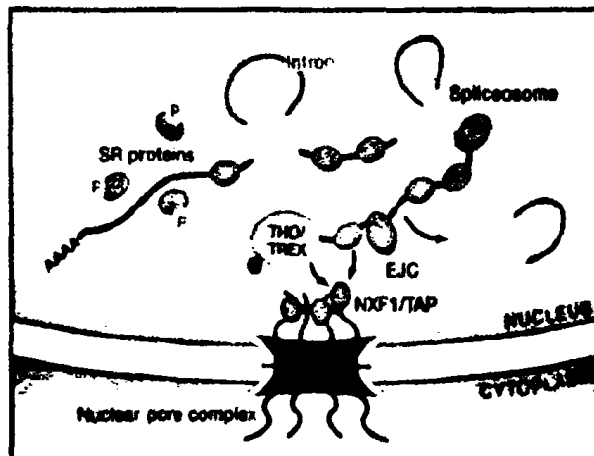
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα όπως προαναφέρθηκε, κατά τη μεταγραφή το «εν τω γεννάσθαι» RNA αλληλεπιδρά με RNA δεσμευτικές πρωτεΐνες που δρομολογούν την ωρίμανσή του γνωστές ως ετερογενείς ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες παραμένουν προσδεδεδεμένες στο πρώιμο mRNA και μετά το πέρας της μεταγραφής και σχηματίζουν RNP σύμπλοκα (σύμπλοκα hnRNP – ετερογενή ριβονουκλεϊκά σύμπλοκα) (Moore, 2005). Οι διαδικασίες ωρίμανσης καθορίζονται από την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων αλληλουχιών ή/και στερεοδομών του πρώιμου mRNA με τις ετερογενείς ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Οι περισσότερες, αν όχι όλες οι πρωτεΐνες αυτές, φέρουν ένα ή περισσότερα μοτίβα αναγνώρισης/δέσμευσης. Μερικά από τα πιο κοινά μοτίβα αναγνώρισης RNA είναι το RRM (RNA Recognition Motif), η περιοχή KH και οι περιοχές RGG (Arginine – Glycine – Glycine).

Η ωρίμανση του πρώιμου mRNA περιλαμβάνει τρεις διαδικασίες: 1) την επικάλυψη του 5' άκρου (*5' capping*) του mRNA με την προσθήκη μεθυλιωμένης γουανιδίνης σε αυτό (*7meGpppA*) προστατεύοντας έτσι το νεοσχηματιζόμενο mRNA από τη δράση των εξωνουκλεασών, 2) την εκτομή των εσωνίων και τη σύνδεση των εξονίων (*splicing*) και 3) την πολύ-αδενυλίωση στο 3' άκρο. Οι τροποποιήσεις που επιδέχεται το πρώιμο RNA είναι πρωταρχικής σημασίας για το mRNA, καθώς εξασφαλίζουν τη σταθερότητά του, το προστατεύουν από την πρόωρη αποδόμηση (Jacobson & Peltz, 1996; Sachs et al, 1997; Shuman, 2001) και καθορίζουν τη μετέπειτα τύχη του σε όλα τα στάδια (μεταφορά, υποκυτταρικός εντοπισμός, μετάφραση, αποδόμηση) (Giorgi & Moore, 2007; Le Hir et al, 2003)



1.2.2 Έξοδος στο κυτταρόπλασμα – Πυρηνικό/Κυτταροπλασματική μεταφορά – Υποκυτταρικός εντοπισμός

Η ωρίμανση του mRNA και η εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένες διαδικασίες. Το RNP σύμπλοκο που δημιουργείται κατά τη μεταγραφή, αποτελεί μία δυναμική δομή που λειτουργεί ως βάση για την αλληλεπίδραση με ένα μεγάλο ρεπερτόριο πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA, οι οποίες μαζί με το ώριμο mRNA σχηματίζουν τα mRNP σύμπλοκα. Πριν την εξαγωγή του mRNA στο κυτταρόπλασμα, οι πρωτεΐνες του συμπλόκου συρραφής EJC (Exon Junction Complex) προσδένονται στα σημεία συρραφής των εξωνίων. Η θέση πρόσδεσης αυτού του συμπλόκου είναι πολύ σημαντική γιατί είτε προάγει τη μετάφραση (όταν προσδένονται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης – ORF) ή κατευθύνει την αποδόμηση του mRNA (όταν βρίσκονται κοντά σε μη νοηματικό κωδικόνιο ΛΗΞΗΣ – Non sense STOP codon, non-sense mediated mRNA decay) (Le Hir & Seraphin, 2008; Tange et al. 2004). Επίσης οι SR πρωτεΐνες προσδένονται στο mRNA κατά την ωρίμανση του και συμμετέχουν στην μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα όταν βρίσκονται στην αποφωσφορυλιωμένη τους κατάσταση. Η βασική μονάδα που μεσολαβεί στην εξαγωγή του mRNP συμπλόκου είναι το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου (NPC – Nuclear Pore Complex). Το σύμπλοκο αυτό φέρει τον υποδοχέα NXF1/TAP που αλληλεπιδρά με τις SR πρωτεΐνες καθώς και με το σύμπλοκο THO/TREX και διαμεσολαβείται η έξοδος του mRNP από τον πυρήνα (Huang & Steitz, 2005; Kohler & Hurt, 2007) (εικόνα2).



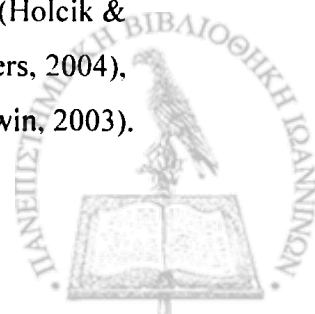
Εικόνα 2. Παράγοντες της ωρίμανσης του RNA και Π/Κ μεταφορά.

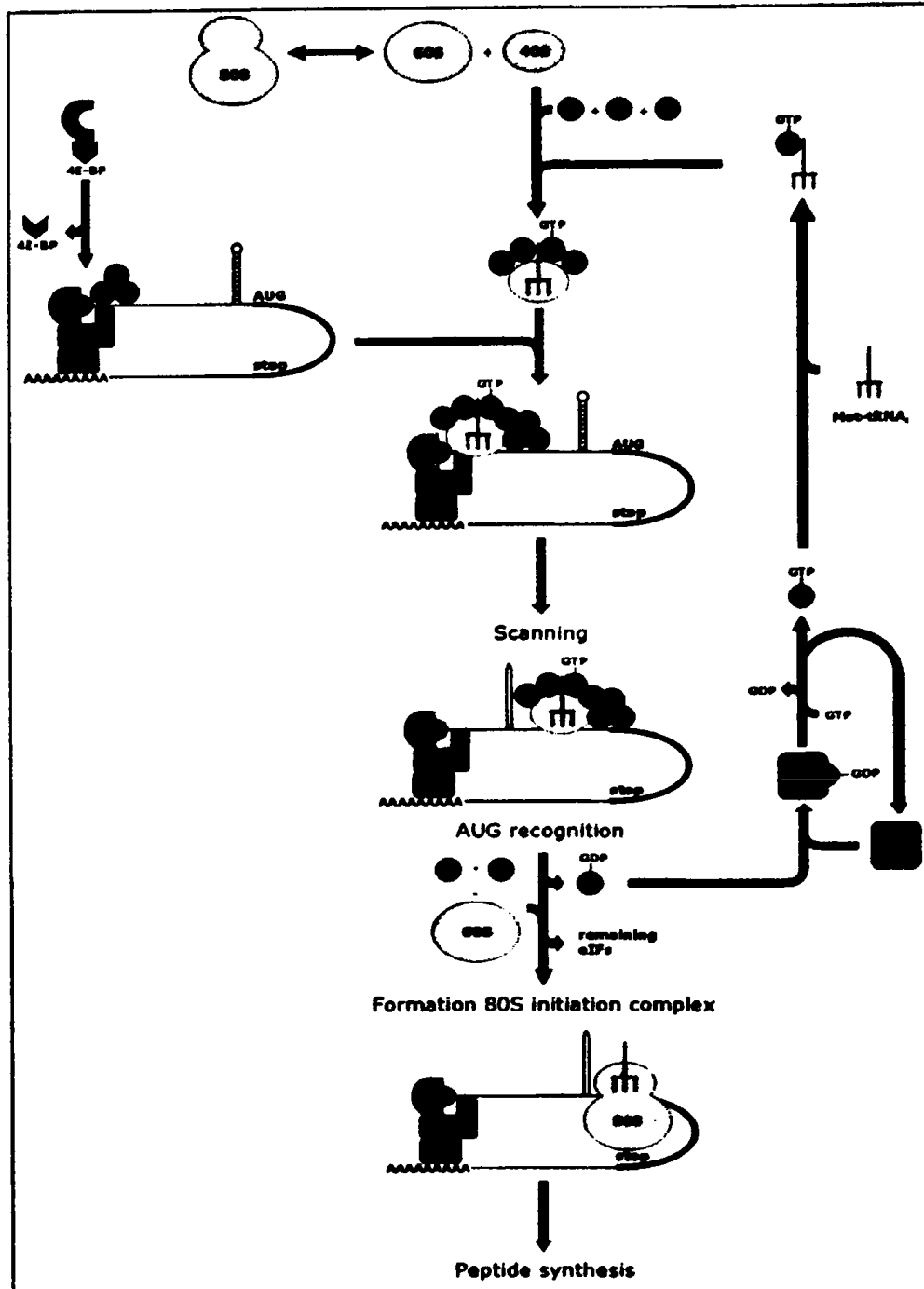
Τα στοιχεία των mRNPs που σχετίζονται με το μάτισμα του mRNA συμμετέχουν και στην πυρηνικό-κυτταροπλασματική του μεταφορά (βλ. κείμενο) (Moore and Proudfoot, 2009)

Μόλις απελευθερωθεί το mRNA από το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου, θα μεταφερθεί σε συγκεκριμένη θέση στο κυτταρόπλασμα (Besse & Ephrussi, 2008), η τύχη του όμως εξαρτάται από το μήνυμα που μεταφέρει και από τις RNA-BPs με τις οποίες θα αλληλεπιδράσει. Σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του mRNA παίζουν *cis* στοιχεία τα οποία διαμορφώνουν συγκεκριμένες δομές (stem-loop structures) και αναγνωρίζονται από *trans-acting* πρωτεΐνες. Τα RNPs που σχηματίζονται τροποποιούνται είτε μεμονωμένα ή με άλλα RNPs και συγκροτούνται σε κυστίδια. Τα RNA κυστίδια αλληλεπιδρούν με κινητικές πρωτεΐνες και με στοιχεία του κυτταροσκελετού ώστε να μεταφερθούν στον τελικό τους προορισμό (Martin & Ephrussi, 2009).

1.2.3 Μετάφραση

Εφόσον η γενετική πληροφορία που μεταφέρεται στο mRNP πρόκειται να εκφραστεί, τότε το mRNA εισέρχεται στο στάδιο της μετάφρασης. Στο κυτταρόπλασμα, η έναρξη της μετάφρασης περιλαμβάνει την πρόσδεση του παράγοντα έναρξης eIF4E στην 5' καλύπτρα του mRNA καθώς και την πρόσδεση των RNA ελικασίων eIF4a και eIF4G. Το σύμπλοκο αυτό, προσελκύει τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και κατά αυτό τον τρόπο ξεκινά η σάρωση του mRNA για την αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης AUG. Επίσης, στην πολύ-A ουρά βρίσκονται προσδεδεμένες πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (PABNI και PABPCs αντίστοιχα). Μόλις βρεθεί το κωδικόνιο έναρξης, προσελκύεται και η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα με αποτέλεσμα τη δημιουργία του σύνθετου ριβοσωμικού συμπλόκου 80S και την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης (Lejeune et al, 2004) (εικόνα 3). Όταν το ριβόσωμα εντοπίσει ένα κωδικό λήξης, τότε αποδεσμεύεται από το mRNA και διασπάται στις αρχικές του υπομονάδες. Συνήθως, σε ένα μετάγραφο είναι προσδεδεμένα περισσότερα από ένα ριβοσώματα, σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο πολυσώματα (polysomes) (Moore, 2005). Στη διαδικασία αυτή, RBPs αλληλεπιδρούν με ειδικές *cis* δομές ή στοιχεία ελέγχου τα οποία εντοπίζονται στα μη μεταφραζόμενα άκρα των mRNA (UTRs) και ρυθμίζουν τη μετάφραση ανάλογα με το είδος του μεταγραφήματος. Η ρύθμιση της μετάφρασης έχει ιδιαίτερη σημασία σε συνθήκες οι οποίες απαιτούν απότομες και ακριβείς μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει σε συνθήκες στρες (Holcik & Sonenberg, 2005), στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (Jorgensen & Tyers, 2004), στις διαδικασίες της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης (Kuersten & Goodwin, 2003).



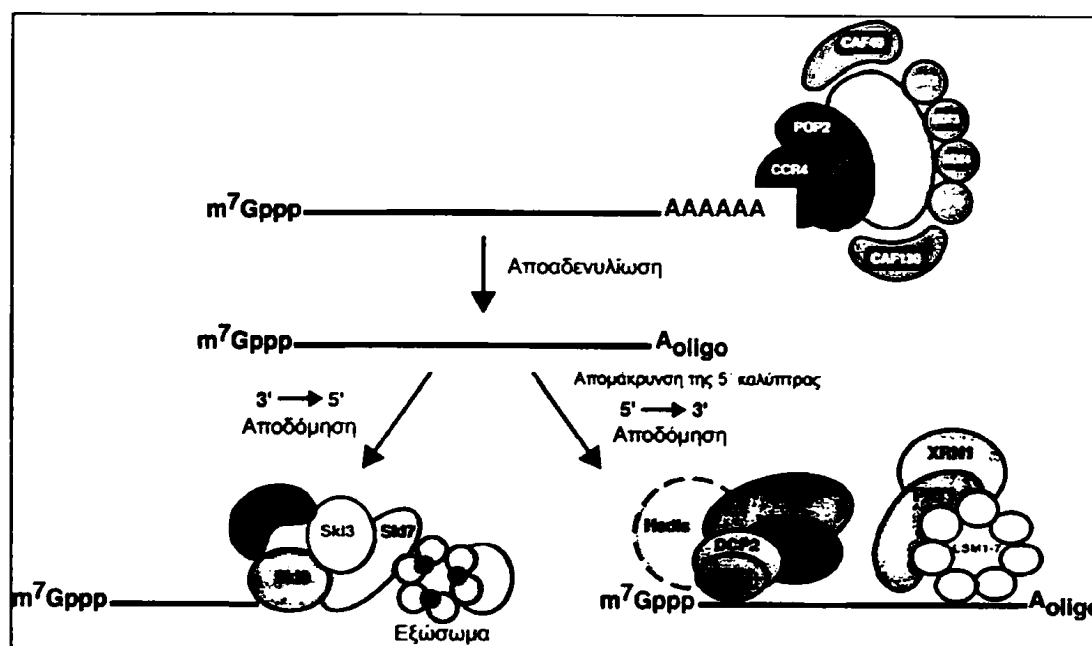


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της έναρξης της μετάφρασης

Η έναρξη της πρωτεϊνوسύνθεσης απαιτεί το σχηματισμό του 80S συμπλόκου στο mRNA. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η 40S υπομονάδα τοποθετείται δίπλα από την καλύπτρα στο 5' άκρο και διατρέχει την 5' μη μεταφράζομενη περιοχή μέχρι να εντοπίσει ένα κωδικόνιο έναρξης AUG και τότε μπορεί να προσαρμοστεί και η υπομονάδα 60S και να σχηματίσει το ριβοσωμικό σύμπλοκο 80S (Meijer & Thomas 2002).

1.2.4 Σταθεροποίηση – Αποδόμηση

Η σταθερότητα του mRNA ουσιαστικά αντιπροσωπεύει το χρόνο ζωής του και τη διαθεσιμότητα του για πρωτεϊνοσύνθεση. Όπως προαναφέρθηκε, η σταθερότητα και η προστασία του mRNA από την αποδόμηση στηρίζεται στη δημιουργία και στη σύσταση των RNP συμπλόκων. Τόσο η σταθεροποίηση όσο και η αποδόμηση του mRNA αποτελούν δύο δυναμικές διαδικασίες που μπορούν και μεταβάλλονται από σήματα του εξωκυττάριου περιβάλλοντος (ορμόνες, αναπτυξιακά σήματα, κυτοκίνες κ.ά.) ή από ενδοκυτταρικά σήματα (γήρανση, κυτταρικός κύκλος, μεταγραφικά σφάλματα). Γενικά, το πρώτο στάδιο για την αποδόμηση του mRNA είναι η αποπολυαδενυλίωση από το 3' άκρο που εκτελείται από τη δράση του συμπλόκου CCR4-NOT (Ford et al, 1997; Parker & Sheth, 2007) (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Γενικό μονοπάτι αποδόμησης των mRNAs

Το πρώτο στάδιο για την αποδόμηση του mRNA είναι η ενζυμική απομάκρυνση της πολυ-A ουράς. Με την απομάκρυνση της καλύπτρας έχουμε τη ταυτόχρονη τη δράση εξωνουκλεασών όπου επιτελείται η αποδόμηση του mRNA (βλ. κείμενο) (Parker & Sheth, 2007)

Το γεγονός αυτό αναστέλλει την μετάφραση και επιτρέπει την πρόσβαση εξωνουκλεασών στο mRNA. Στο 5' πραγματοποιείται η διαδικασία απομάκρυνσης της καλύπτρας (decapping) από την ενζυματική δράση του DCP2 και άλλων συμπαραγόντων (Simon et al. 2006). Στη συνέχεια το «απογυμνωμένο» RNA αποδομείται από δύο παράλληλα μονοπάτια, όπου στο ένα η εξωνουκλεάση Xrn1

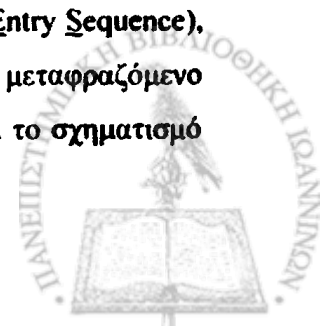
καταλύει την 5' → 3' αποδόμηση και στο άλλο το εξώσωμα, ένα σύμπλοκο 9 πρωτεϊνών, αναλαμβάνει την 3' → 5' αποδόμηση. Όπως και στα προηγούμενα στάδια, σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα/αποδόμηση του mRNA έχουν και πάλι οι RNA δεσμευτικές πρωτεΐνες που είτε προσελκύουν αυτά τα ένζυμα είτε προστατεύουν το mRNA από αυτά.

Συνοψίζοντας, τα mRNAs από την αρχή της βιοσύνθεσής τους μέχρι τον τελικό τους προορισμό συνδέονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, κάποιες από τις οποίες προσδένονται σταθερά ενώ άλλες υποβάλλονται σε δυναμικές αλληλεπιδράσεις. Ο συνδυασμός των παραγόντων που συνοδεύουν ένα συγκεκριμένο mRNA, καθώς και η κατανομή τους πάνω στο μεταγράφημα καθορίζουν την περαιτέρω τύχη του στο κυτταρόπλασμα. Η ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών με διαφορετική δράση σε κάθε mRNA το καθιστά ικανό να ανταποκρίνεται σε πολυάριθμα μεταβαλλόμενα μηνύματα ρυθμίζοντας με εξαιρετική ακρίβεια την ταχύτητα και την έκφρασή του ανάλογα με τις απαιτήσεις του κυττάρου. Παρακάτω περιγράφεται μια ειδική κατηγορία μεταμεταγραφικού ελέγχου που παίζει εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

1.3 ARE- Διαμεσολαβούμενος μεταμεταγραφικός έλεγχος

1.3.1 *Cis* στοιχεία – ARE (AU – rich elements)

Όπως προαναφέρθηκε, τα mRNAs ρυθμίζονται και ελέγχονται σε όλα τα στάδια του μεταβολισμού τους. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί ποικίλουν σημαντικά και είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενοι από *cis* στοιχεία του μεταγραφήματος, αλληλουχίες ή δομές δηλαδή, που αναγνωρίζονται από *trans* παράγοντες. Αρκετά από αυτά τα στοιχεία είναι κοινά μεταξύ των mRNAs ενώ άλλα είναι πιο εξειδικευμένα. Χαρακτηριστικό κοινών τέτοιων στοιχείων είναι η 5' καλύπτρα (cap) και η πολύ – Α ουρά που είναι κρίσιμης σημασίας για όλα τα mRNA (εκτός από τα mRNAs των ιστονών που δεν πολυαδενυλιώνονται) (Marzluff et al, 2008). Επιπλέον, τα στοιχεία αυτά μπορεί να βρίσκονται είτε στις 3' ή 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές είτε στην κωδική περιοχή ενός mRNA. Για παράδειγμα, το στοιχείο IRES (Internal Ribosome Entry Sequence), μια αλληλουχία που σχηματίζει μια συγκεκριμένη δομή στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο ορισμένων mRNAs (όπως το *c-fos* και *Igf-IR*) η οποία προάγει το σχηματισμό



του συμπλόκου μετάφρασης ανεξάρτητα από την καλύπτρα (Meng et al, 2005; Stoneley et al, 1998). Αντίστοιχα, το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του mRNA του υποδοχέα τρανσφερίνης φέρει μία δομή φουρκέτας γνωστή ως IRE (Iron Responsive Element – στοιχείο απόκρισης σιδήρου) στο οποίο προσδένονται οι «ρυθμιστικές πρωτεΐνες σιδήρου» IRPs (Iron Regulatory Proteins) όταν τα επίπεδα του σιδήρου στο κύτταρο αυξάνονται, με αποτέλεσμα την ταχεία αποδόμηση του mRNA της τρανσφερίνης (Hentze & Kühn, 1996). Επιπρόσθετα, το στοιχείο CRD (Coding Region Sequence) εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *c-myc* mRNA, η οποία αναγνωρίζεται από την CRD δεσμευτική πρωτεΐνη και προστατεύει το mRNA του *c-myc* από τη δράση των ενδονουκλεασών (Nguyen-Chi & Morello, 2008; Sparanese & Lee, 2007).

Ένα από τα πιο καλά μελετημένα *cis* στοιχεία που εντοπίζονται συνήθως στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο πολλών mRNAs, είναι τα AREs (AU – rich elements – στοιχεία πλούσια σε αδενίνη και ουρακίλη). Τα ARE στοιχεία συναντώνται συνήθως στα γονίδια άμεσης απόκρισης (early response genes) τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την απόκριση σε εξωτερικούς παράγοντες. Η σημαντικότητα των γονιδίων που φέρουν ARE στοιχεία αναδεικνύεται από το γεγονός ότι 10% των ανθρώπινων γονιδίων κωδικοποιούν mRNAs που εμπεριέχουν ARE στοιχεία (όπως αναγράφεται στη βάση δεδομένων για τα mRNAs φέρουν ARE στοιχεία – ARED <http://rc.kfshrc.edu.sa/ared>). Κοινό γνώρισμα αυτών των mRNAs αποτελεί ο μικρός χρόνος ζωής και η γρήγορη αποδόμησή τους. Οι αλλαγές στη σταθερότητα των mRNAs μέσω των ARE στοιχείων είναι κρίσιμες σε κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες απαιτούν αιφνίδιες και παροδικές αποκρίσεις όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η τονικότητα του καρδιαγγειακού συστήματος, οι ανοσιακές αποκρίσεις και τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κάτω από συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (Bakheet et al, 2001). Στα mRNAs τα οποία περιέχουν ARE στοιχεία συμπεριλαμβάνονται αυτά που κωδικοποιούν κυτταροκίνες (πχ ILs, Chemokines), μεσολαβητές της φλεγμονής (πχ TNF α), πρωτοογκογονίδια (πχ *c-fos*, *K-ras*, *pim1*) και αυξητικούς παράγοντες (πχ EGF, VEGF). Στα ARE στοιχεία συμπεριλαμβάνεται μια πληθώρα αλληλουχιών πλούσιων σε βάσεις αδενίνης και ουρακίλης, μήκους 50-150 νουκλεοτιδίων, χωρίς όμως να υπάρχει ένα μοναδικό και συντηρημένο πρότυπο μοτίβο το οποίο να τα ορίζει (Chen et al, 1995). Αρκετά AREs περιέχουν πολυάριθμα αντίγραφα της πενταμερούς αλληλουχίας AUUUA ή της



εννεαμερούς UUAUUUAUU, μαζί με μία ή περισσότερες αλληλουχίες πλούσιες σε ουρακίλη. Για τον καθορισμό της σταθερότητας του mRNA σημαντικό ρόλο παίζει τόσο ο αριθμός όσο και η αλληλουχία που περιβάλλει τα μοτίβα αυτά και όπως έχει δειχθεί σε ορισμένα πειραματικά συστήματα, δύο αντίγραφα του εννιαμερούς μοτίβου έχουν μεγαλύτερη αποσταθεροποιητική δράση από ένα μόνο μοτίβο (Lagnado et al, 1994; Zubiaga et al, 1995). Τα ARE στοιχεία έχουν ομαδοποιηθεί πειραματικά σε τρεις κατηγορίες με βάση την πρωτοταγή τους αλληλουχία και τον τρόπο με τον οποίο προκαλούν τη γρήγορη αποπολυαδενυλίωση και την συνεπαγόμενη αποσταθεροποίηση του mRNA (πίνακας 1.1)

Ομάδα	Αλληλουχία	Παραδείγματα
I	WAUUUAW και περιοχή πλούσια σε- U	c-fos,c-myc
IIA	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF,TNF
IIB	AUUUAUUUAUUUAUUUA	IFN-a
IIC	WAUUUAUUUAUUUAW	Cox-2,IL-2,VEGF
IID	WWAUUUUAUUUAWW	FGF2
IIE	WWWAUUUUAUUUAWWW	Υποδοχέας u-PA
III	περιοχή πλούσια σε- U και απουσία της πενταμερούς αλληλουχίας AUUUA	c-jun

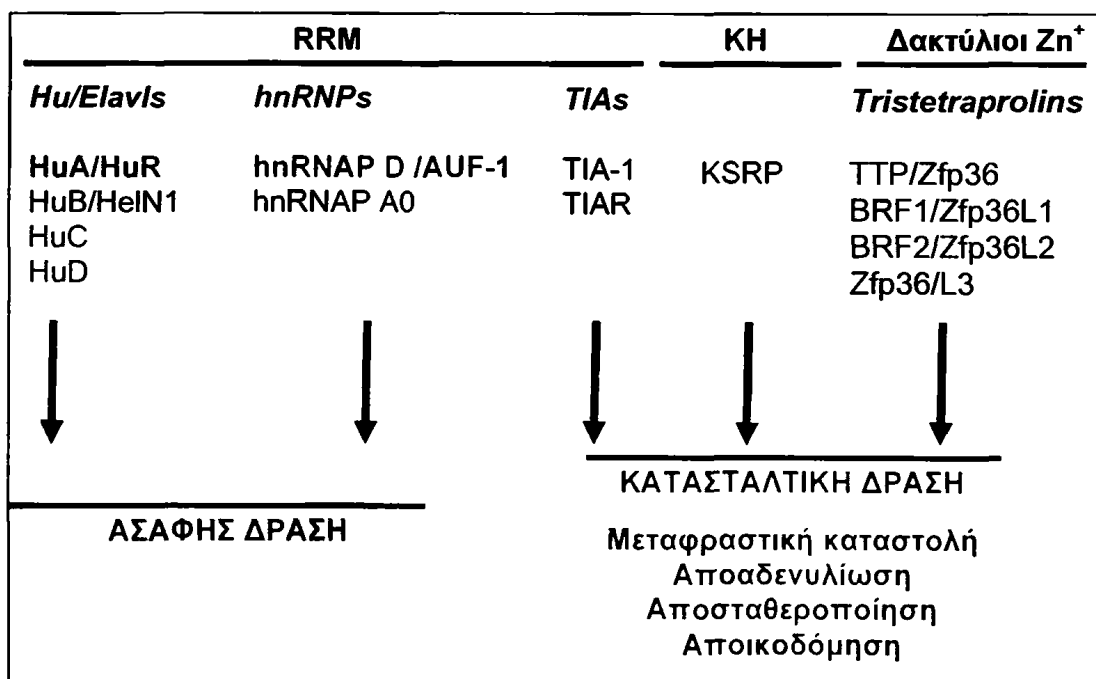
Όπως είναι κατανοητό τα mRNAs που φέρουν ARE στοιχεία κωδικοποιούν λειτουργικά γονίδια που συμμετέχουν σε ζωτικής σημασίας βιολογικές διαδικασίες. Παρόλα αυτά, τα ARE στοιχεία από μόνα τους δεν επαρκούν για να καθορίσουν την τύχη των mRNA που τα φέρουν. Όπως περιγράφεται παρακάτω, ο τρόπος με τον οποίο δρουν αυτά τα στοιχεία στη σταθεροποίηση/αποδόμηση των mRNAs που τα φέρουν, είναι άμεσα εξαρτώμενος από την πρόσδεση των ARE δεσμευτικών πρωτεϊνών (ARE-binding proteins, ARE-BPs) σε αυτά.

1.3.2 Πρωτεΐνες που δεσμεύουν ARE στοιχεία (ARE – binding proteins, ARE-BPs)

Οι ARE-BPs αποτελούν μια ειδική κατηγορία *trans* παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τα ARE στοιχεία των mRNAs. Η αλληλεπίδραση αυτή συντελείται σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού των mRNAs και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς μεταμεταγραφικής ρύθμισης. Ο τρόπος δράσης των ARE-BPs στο μεταμεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής πληροφορίας, στηρίζεται κατά κύριο λόγο, στην ιδιότητάς τους να καθορίζουν άμεσα ή έμμεσα (αλληλεπιδρώντας



και με άλλους παράγοντες) τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη σταθερότητα/αποδόμηση και τη μεταφραστική ενεργοποίηση των mRNAs. Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με στοιχεία ARE κατηγοριοποιούνται βάση της συγκεκριμένης περιοχής (domain) μέσω της οποίας πραγματοποιείται η πρόσδεση. Επομένως, οι ARE-BPs διακρίνονται στις υπεροικογένειες οι οποίες περιέχουν: α) μοτίβα RRM (όπως είναι οι AREBPs TIA-1, TIAR, CUGBP2, HuR, AUF1). β) δακτυλίους ψευδαργύρου (όπως οι TTP, BRF1, BRF2) και γ) περιοχές KH (όπως οι FXR1P, KSRP) (Dreyfuss et al. 2002; Varani & Nagai. 1998; Wilusz et al, 2001) (εικόνα 5).

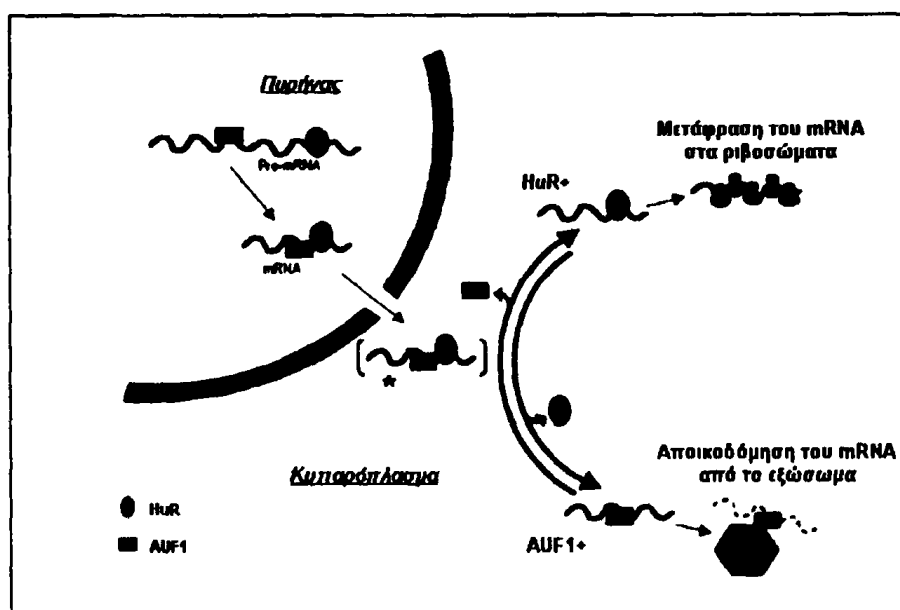


Εικόνα 5. Πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης σε ARE στοιχεία - AREBPs

Γενικά, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των AUUA επαναλήψεων τόσο πιο αποδοτική είναι και η αλληλεπίδραση των ARE-BPs με τα AREs. Επιπρόσθετα, όπως προαναφέρθηκε, τα ARE στοιχεία μπορούν να διαμορφώνουν δευτεροταγείς δομές που επίσης αναγνωρίζονται από τις ARE-BPs (Bevilacqua et al., 2003). Συγκεκριμένα, σε μια ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν RNA στόχοι της ARE-BP HuR, για την αναζήτηση μοτίβων αναγνώρισης RNA και εντοπίστηκε ένα μοτίβο 17-20 νουκλεοτιδίων που διαμορφώνει *stem loop* δευτεροταγή δομή (Lopez de Silanes et al. 2004) και ενδέχεται να συνεισφέρει στη μετάφραση, στη σταθερότητα και στον εντοπισμό του mRNA (Bevilacqua, 2003).



Σε γενικές γραμμές, θεωρείται ότι διαφορετικές ARE-BPs μπορούν να προσδένονται στο ίδιο ARE στοιχείο και ανάλογα με τον τρόπο (θετικά ή αρνητικά) που καθορίζουν τη σταθερότητα του mRNA μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά ή συνεργατικά. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις έχουν μελετηθεί τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα. Για παράδειγμα, ανάλυση μικροσυστοιχιών σε HeLa κύτταρα, έδειξε ότι η HuR και ο AUF1, μοιράζονται κοινούς ARE-mRNA στόχους, με αντίθετη επίδραση στη σταθερότητά τους. Συγκεκριμένα σε HeLa κύτταρα, η HuR και ο AUF1 δεσμεύονται ταυτόχρονα και σε μη αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές στα μεταγραφήματα των γονιδίων *p21* και *cyclin D*, έχοντας ανταγωνιστική δράση (Lal et al, 2004) (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ARE-BPs

Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου δομικής και λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών HuR και AUF1 μέσω της οποίας καθορίζεται εάν το συγκεκριμένο mRNA θα μεταφραστεί σε λειτουργική πρωτεΐνη ή θα οδηγηθεί προς αποικοδόμηση (Lal et al, 2004)

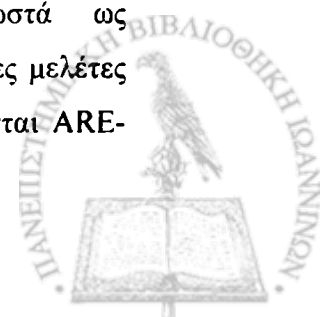
Επιπρόσθετα, σε μακροφάγα προερχόμενα από διαγονιδιακούς ποντικούς που υπερεκφράζουν τη HuR, παρατηρείται η συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ της HuR και της TIA-1 στον έλεγχο της μεταφραστικότητας των mRNAs κυτταροκινών (Katsanou et al, 2005). Αντίθετα, ο ρυθμός της μετάφρασης του mRNA του κυτοχρώματος C' σε κύτταρα HeLa, καθορίζεται από την αντίθετη δράση της HuR και της TIA-1, αφ' ενός γιατί και οι δύο προσδένονται σε διαφορετικά σημεία στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του mRNA του κυτοχρώματος C' και αφ' ετέρου η HuR και η

TIA-1 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση ή την αναστολή αντίστοιχα, της μετάφρασης του mRNA του κυτοχρώματος C. Σε φυσιολογικές συνθήκες, και οι δύο ARE-BPs χρειάζονται για τη διατήρηση του σωστού ρυθμού μετάφρασης του mRNA του κυτοχρώματος C, αλλά έναντι απόκρισης σε ενδοπλασματικό στρες, η πρόσδεση της HuR μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα να ελαττώνεται και ο ρυθμός μετάφρασης του αυτού του RNA (Kawai et al, 2006). Συνεπώς, η ισορροπημένη παρουσία διαφορετικών ARE-BPs στο κύτταρο, καθορίζει και την τύχη των ARE-mRNAs.

Τέλος, ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των ARE-BPs που παρατηρήθηκε στα κύτταρα HeLa, είναι ότι η έκφραση των ARE-BPs αυτορυθμίζεται μετά-μεταγραφικά. Η αυτορύθμιση στις ARE-BPs μπορεί να εξηγηθεί απλουστευμένα από το γεγονός ότι οι περισσότερες από αυτές (AUF1, HuR, TIA-1 και TIAR) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ίδιο το mRNA που τις κωδικοποιεί και να επηρεάσουν την έκφρασή του. Παρόλα αυτά, ο μεταμεταγραφικός έλεγχος των ARE-BPs γίνεται και με έτερο-ρυθμιστικό τρόπο, δεδομένου ότι τα περισσότερα mRNAs των ARE-BPs φέρουν στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο τους ARE στοιχεία στα οποία μπορούν να προσδένονται άλλες ARE-BPs εκτός από τις ίδιες. Ένα παράδειγμα της έτερο-ρύθμισης μεταξύ των ARE-BPs, αποτελεί η περίπτωση της HuR και της TIA-1, όπου η υπερέκφραση της HuR με επιμόλυνση σε κύτταρα HeLa, οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης TIA-1 (Pullmann et al, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά σκιαγραφούν την πολυπλοκότητα στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ARE-BPs, ενώ παράλληλα αναδεικνύουν τη σημαντικότητα της συντονισμένης δράσης τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διεργασιών.

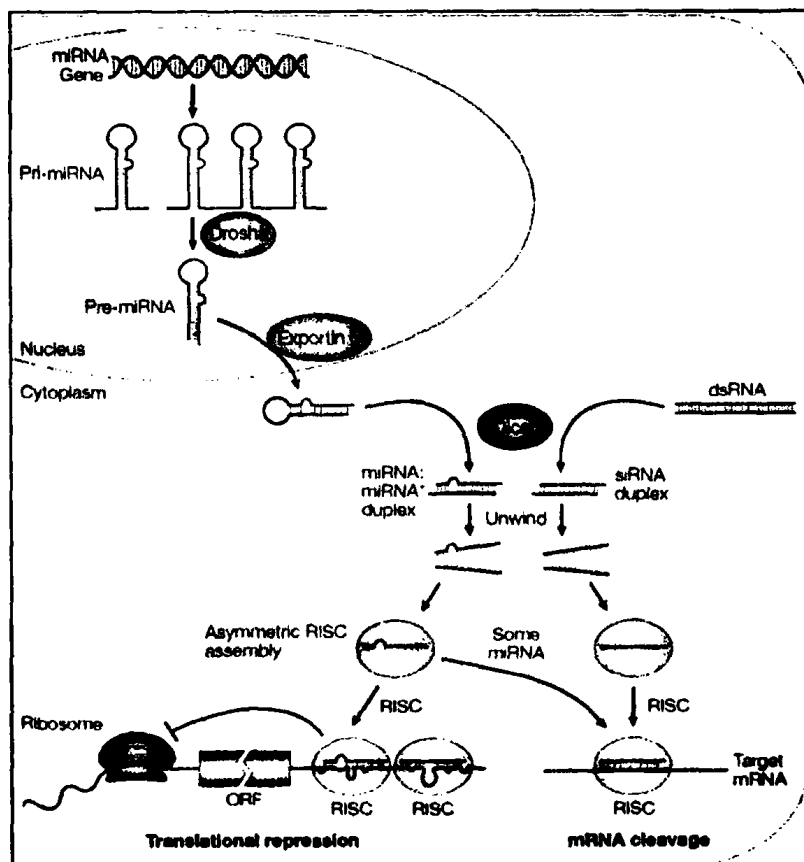
1.3.3 Κυτταροπλασματικές δομές σχετιζόμενες με τη δράση των ARE-BPs

Όπως έχει προαναφερθεί, οι ARE-BPs δεν έχουν ενζυματική δράση αλλά διεκπεραιώνουν το λειτουργικό τους ρόλο δρώντας ως προσαρμοστές σε κυτταροπλασματικές δομές στις οποίες επιτελούνται η μετάφραση, η αποδόμηση ή προσωρινή αποθήκευση των mRNAs. Τα λειτουργικά στοιχεία αυτών των μηχανιστικών συμπλόκων, συγκεντρώνονται μαζί με τα mRNAs σε κυτταροπλασματικές περιοχές - δομές (*cytoplasmic foci*) γνωστά ως κυτταροπλασματικά κυστίδια (*granules*) ή «σωμάτια» (*bodies*). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη μικρών κυστιδίων, στα οποία συγκεντρώνονται ARE-



mRNAs καθώς και στοιχεία του εξωσώματος (Lin et al, 2007). Παρόλα αυτά, τα ARE-mRNAs μπορεί να εντοπίζονται και σε μια άλλη κυτταροπλασματική περιοχή – δομή γνωστή ως Ρ-σωμάτια (P-bodies – PBs, processing bodies). Στα PBs συγκεντρώνονται mRNAs που βρίσκονται σε μεταφραστική αναστολή, καθώς και παράγοντες που σχετίζονται με την μεταφραστική καταστολή και την αποδόμηση των mRNAs.

Αν και δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως η σύσταση των PBs, στα λειτουργικά στοιχεία που εντοπίζονται σε αυτά περιλαμβάνονται ένζυμα απομάκρυνσης της 5' καλύπτρας (DCP1/DCP2), ένζυμα με 5' - 3' εξωνουκλεολυτικής δράσης (XNRN1), ο παράγοντας GW182 και το σύμπλοκο RISC (RNA Induced Silencing Complex) το οποίο σχετίζεται με την αποδόμηση του mRNA μέσω του μονοπατιού των miRNAs (micro – RNAs decay pathway, εικόνα 7) (Eulalio et al, 2007; Liu et al, 2005; Pillai et al, 2007; Rehwinkel et al, 2005).



Εικόνα 7. Η δράση των microRNAs και των siRNAs (small interfering RNAs) στον μεταμεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής ρύθμισης.

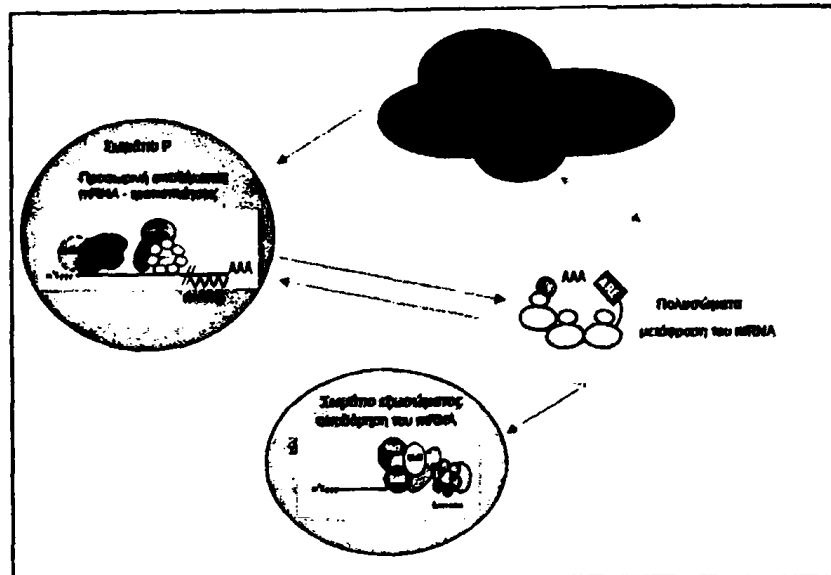
Τα μονοπάτια των siRNA και miRNA στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι δύο εξελικτικά συντηρημένοι μηχανισμοί όπου μη μεταφράζομενα μόρια RNA παρεμβαίνουν στο επίπεδο του mRNA



είτε καταστέλλοντας τη μετάφραση ή προωθώντας την αποδόμηση των mRNAs στα οποία προσδένονται. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μικρών μορίων RNA, τα siRNAs και τα microRNAs, τα οποία δρουν ως εξειδικευμένοι, με βάση την αλληλουχία του mRNA, ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Τα μόρια αυτά παράγονται αρχικά σε δίκλωνη μορφή και στη συνέχεια υπόκεινται σε ενζυματική διαδικασία ωρίμανσης όπου και μετατρέπονται σε μονόκλωνα μόρια. Με τη μορφή αυτή προσαρμόζονται στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) και προκαλούν μεταφραστική καταστολή ή αποδόμηση των mRNA στόχων.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα mRNAs τα οποία εντοπίζονται στα PBs μπορούν να εξαχθούν από αυτά και να επανέλθουν στην μεταφραστική διαδικασία, όπως έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του *Cat-1* mRNA, του οποίου η παρουσία στα PBs σχετίζεται με τη δράση του miR122 και της HuR (Bhattacharyya et al, 2006). Επιπρόσθετα, τα ARE-mRNAs μπορεί να εντοπίζονται σε μια άλλη κυστιδιακή δομή, γνωστή ως κυστίδιο στρες (*stress granule*-SG). Τα κυστίδια αυτά σχηματίζονται κάτω από συνθήκες στρες, συγκεντρώνοντας συσσωματώματα από μη μεταφραζόμενα mRNAs σε σύζευξη με ένα σύνολο παραγόντων που περιλαμβάνει την 40S ριβοσωμική υπομονάδα, παράγοντες της έναρξης της μετάφρασης (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF2) και αρκετές ARE-RBPs, όπως η HuR, η TIA-1 και η TIA-R. Μάλιστα, οι μεταφραστικοί καταστολείς TIA-1 και TIA-R παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των SGs (Parker & Sheth, 2007). Επιπλέον τα PBs και τα SGs, μοιράζονται κοινά συστατικά (πχ ARE-BPs) τα οποία βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και μπορούν να αλληλεπιδρούν υπό ορισμένες συνθήκες (πχ οξειδωτικό στρες) καθορίζοντας την τύχη των mRNAs που εμπεριέχουν. Θεωρείται ότι η ARE-BP TTP μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση των συστατικών μεταξύ PBs και SGs (Kedersha et al, 2005). Γενικά τα SGs και τα PBs θεωρούνται ως κέντρα ταξινόμησης, όπου τα mRNAs αποθηκεύονται πριν προσδιοριστεί ο τελικός τους προορισμός στα πολυσώματα (μετάφραση) ή στο εξώσωμα (αποδόμηση) (εικόνα 8).





Εικόνα 8. Κυτταρικός εντοπισμός των mRNAs σε κυτταροπλασματικές δομές

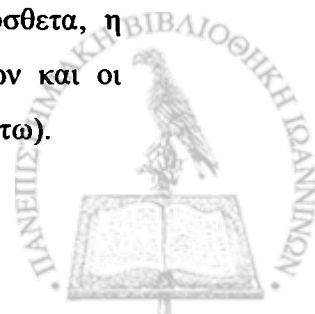
Τα mRNAs εντοπίζονται σε κυτταροπλασματικές δομές όπου είτε αποθηκεύονται προσωρινά (κυστίδια στρες και σωμάτια-P) ή αποδομοούνται (σωμάτια εξωσώματος και σωμάτια P). Υπό την ενεργοποίηση κάποιου μοριακού μονοπατιού τα mRNAs μπορούν να απελευθερωθούν από τις παραπάνω δομές και να οδηγηθούν στα πολυσώματα για την έναρξη της μετάφρασης. Η μετάβαση των mRNAs από τη μία δομή στην άλλη, είναι δυναμική και εξαρτάται από το μοριακό μονοπάτι που έχει ενεργοποιηθεί καθώς και από τη σύνθεση των RNA-BPs που προσδένονται σε αυτά

1.3.4 Ο ρόλος του ARE-διαμεσολαβούμενου μεταμεταγραφικού ελέγχου σε παθολογικές καταστάσεις.

Οι διαταραχές σε οποιοδήποτε στάδιο μεταμεταγραφικού ελέγχου έχει άμεσο αντίκτυπο στη γονιδιακή έκφραση και εν τέλει την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Όπως προαναφέρθηκε, τα mRNAs που φέρουν ARE αλληλουχίες κωδικοποιούνται από γονίδια η ανώμαλη έκφραση των οποίων, μπορεί να επιφέρει στον οργανισμό αναπτυξιακές και ανοσολογικές διαταραχές, καθώς και καρκίνο. Ο ρόλος των ARE-BPs στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και στην ανάπτυξη ασθενειών αναδεικνύεται σε *in vivo* διαγονιδιακά μοντέλα απαλοιφής ή υπερέκφρασης των ARE-BPs. Η πλήρης απαλοιφή της HuR από το γονιδίωμα του ποντικού είναι θνησιγενής. Οι μεταλλαγμένοι εμβρυικοί ποντικοί πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της κύησης (από 10η έως 14η μέρα μετά τη σύλληψη) λόγω αναπτυξιακών διαταραχών στον πλακούντα ενώ παράλληλα εμφανίζουν αναπτυξιακές διαταραχές και σε άλλα όργανα (Katsanou et al, 2009). Παρόμοιος φαινότυπος παρατηρείται και

στην περίπτωση απαλοιφής του BRF1 όπου οι μεταλλαγμένοι ποντικοί πεθαίνουν εμβρυϊκά λόγω ανωμαλιών στον πλακούντα. Επίσης, οι ποντικοί που υπολείπονται όλων των ισομορφών της λειτουργικής πρωτεΐνης AUF1 γεννιούνται, αλλά έχουν σχεδόν υποδιπλάσιο μέγεθος και εμφανίζουν ευαισθησία σε ερέθισμα έναντι ενδοτοξικού σοκ (Lu et al, 2006b). Επιπρόσθετα, οι ARE-BPs εμπλέκονται και σε διαδικασίες διαφοροποίησης όπως η μυογένεση και η σπερματογένεση. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η HuR μετέχει στην πυρηνικοκυτταροπλασματική μεταφορά καθώς και στην έκφραση ειδικών για τη μυογένεση γονιδίων όπως το *MyoD* και *myogenin* (Figueroa et al, 2003; van der Giessen & Gallouzi, 2007). Αντίστοιχα, η υπερέκφραση της HuR σε πρώιμα γεννητικά κύτταρα διαγονιδιακών ποντικών εμποδίζει τη μεταβίβαση διαγονιδίων στους απογόνους λόγω διαταραχών κατά τη σπερματογένεση (Levadoux-Martin et al, 2003).

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια αναδεικνύεται ο ιδιαίτερος ρόλος του ARE-διαμεσολαβούμενου μεταμεταγραφικού ελέγχου στη ρύθμιση των διαδικασιών κατά την καρκινογένεση. Αλλοιώσεις ή μεταλλάξεις στην ARE αλληλουχία σημαντικών mRNAs (πχ ογκογονίδια, κυκλίνες) ή μεταβολές στην έκφραση, στον εντοπισμό και στην ικανότητα πρόσδεσης των ARE-BPs μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Τέτοιου είδους γενετικές μεταβολές έχουν ως συνέπεια την απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του πρώτο-ογκογονιδίου *c-Myc* και *c-fos* των οποίων η έκφραση ελέγχεται κατά κύριο λόγο μεταμεταγραφικά. Συγκεκριμένα για το *c-Myc*, σημειακές μεταλλάξεις ή καθολική απουσία του ARE στοιχείου στην 3' περιοχή του παρατηρήθηκαν σε μυελώματα και λευχαιμίες (Lopez de Silanes et al, 2007). Αντίστοιχα, οι κυκλίνες D1 και D3 ρυθμίζονται από καθορισμένα στοιχεία στην 3' μη μεταφραζόμενο άκρο (UTR). Έχει δειχθεί πως σε δύο κυτταρικές σειρές χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας το mRNA της κυκλίνης D1 υπερεκφράζεται λόγω της έλλειψης του 3'UTR (Withers et al, 1991). Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν την ARE-BP HuR στη δέσμευση των 3' UTR των κυκλινών A και B με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των mRNAs τους, γεγονός το οποίο μπορεί επίσης να συσχετιστεί και με τις αλλαγές στον υποκυτταρικό εντοπισμό της HuR κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε συνάρτηση με τις δυναμικές της φωσφορυλιώσεις (Kim & Gorospe, 2008; Wang et al, 2000a). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση ARE-BPs έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις όγκων και οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιαστεί στη HuR και στον AUF1 (βλ. παρακάτω).



Επιπλέον, οι ARE-BPs και ο ARE-διαμεσολαβούμενος έλεγχος, εκτός από σημαντικότητα τους στις αναπτυξιακές διαδικασίες και στον καρκίνο, παίζουν ρόλο και στη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Οι περισσότερες κυτοκίνες και λεμφοκίνες που παράγονται κατά την ανοσοαπόκριση κωδικοποιούνται από ασταθή mRNAs που φέρουν AREs, όπως ο *TNF α* , οι ιντερλευκίνες *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-8* και ο *GM-CSF*. Συγκεκριμένα, η απαλοιφή του ARE στοιχείου από την προφλεγμονώδη κυτοκίνη *TNF α* στον ποντικό, οδηγεί στη σταθεροποίηση του mRNA του *TNF α* , με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρόνιας αρθρίτιδας και εντερικής φλεγμονής (Kontoyiannis et al, 1999). Μάλιστα, διαγονιδιακοί ποντικοί που υπολείπονται του γονιδίου TTP εμφάνισαν τα ίδια συμπτώματα (Taylor et al, 1996). *Ex vivo* αναλύσεις έδειξαν ότι η TTP αποσταθεροποιεί το mRNA του *TNF α* , συσχετίζοντας έτσι τα παραπάνω αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η ιστοειδική υπερέκφραση της HuR στα κύτταρα της μυελώδους σειράς διαγονιδιακών ποντικών καταστέλλει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις *in vivo*, μέσω του μεταφραστικού ελέγχου που ασκεί στα mRNAs συγκεκριμένων κυτοκινών (Katsanou et al, 2005).

Καθότι, η δράση της HuR και του AUF1 κατέχουν πρωταρχική θέση στη ρύθμιση των μετά-μεγραφικών οδών ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών διαδικασιών και της καρκινικής εξαλλαγής, η διατριβή εστιάζεται σε αυτά τα δύο μόρια. Παρακάτω ακολουθεί μια πιο λεπτομερής περιγραφή των χαρακτηριστικών της HuR και του AUF1.

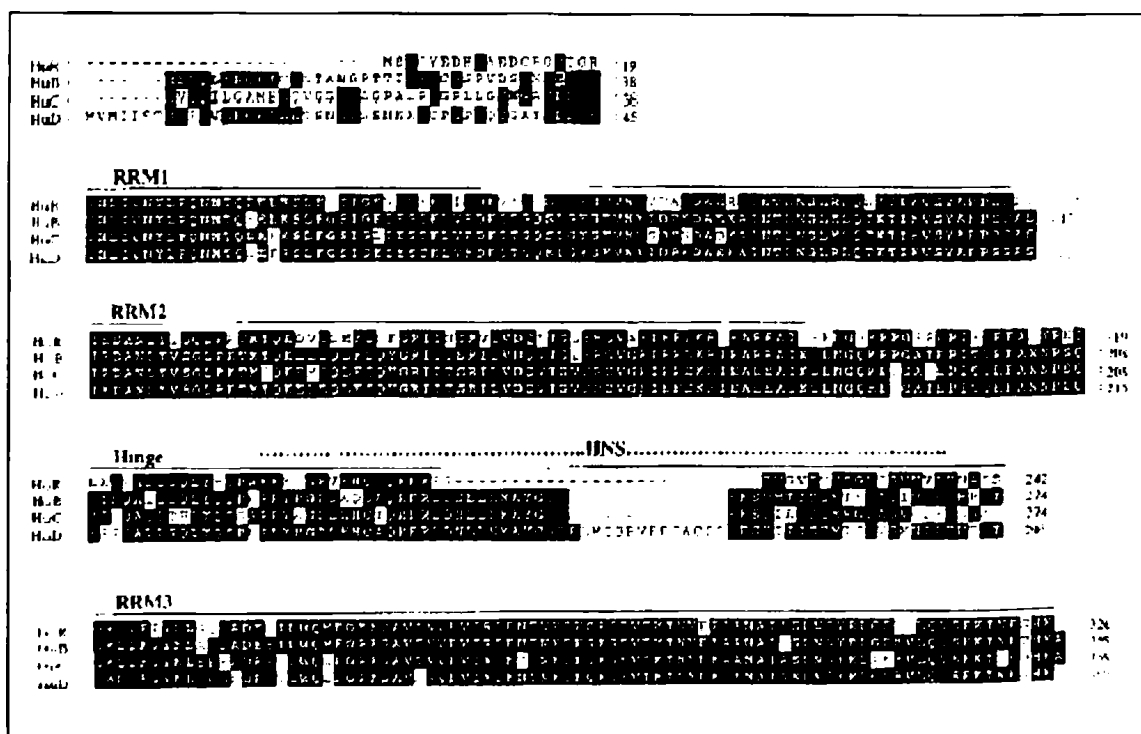
1.4 Η ARE-BP HuR/HuAElav1

1.4.1 Γενικά

Η πρωτεΐνη HuR ανήκει στην οικογένεια των ELAVlike-Hu πρωτεϊνών και εμφανίζει ένα καθολικό πρότυπο έκφρασης, σε αντίθεση με τα τρία υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (HuB, HuC και HuD) που εντοπίζονται αποκλειστικά σε κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Hu στα σπονδυλωτά, είναι ομόλογα της πρωτεΐνης ELAV της *Drosophila*. Η οικογένεια των Hu είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος (Campos et al, 1985; Robinow & White, 1988). Απαλοιφή του γονιδίου *Elav* από τον οργανισμό της *Drosophila* οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω της ανώμαλης ανάπτυξης και διαφοροποίησης των νευρώνων η



οποία είναι περισσότερο εμφανής από τον ελλιπή σχηματισμό των ματιών (Robinow et al. 1988; Robinow & White. 1991). Στο φαινότυπο αυτό οφείλεται και το όνομα του γονιδίου *elan* το οποίο προέρχεται από τα αρχικά των embryonic lethal abnormal vision (εμβρυϊκά θνησιγόνο ανωμαλία στην όραση). Τόσο η πρωτεΐνη ELAV, όσο και τα μέλη της οικογένειας Hu, ανήκουν στην υπεροικογένεια των RRM πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNAs. Οι πρωτεΐνες Hu παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους και έχουν μια πολύ συντηρημένη δομή η οποία αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή όπου βρίσκονται δύο συνεχόμενα μοτίβα RRM (RRM1 και RRM2), μια συνδετική περιοχή μήκους 50-70 αμινοξέων και μια καρβοξυτελική περιοχή στην οποία απαντάται ένα τρίτο μοτίβο RRM (RRM3) (Levine et al. 1993; Szabo et al. 1991) (εικόνα 9).



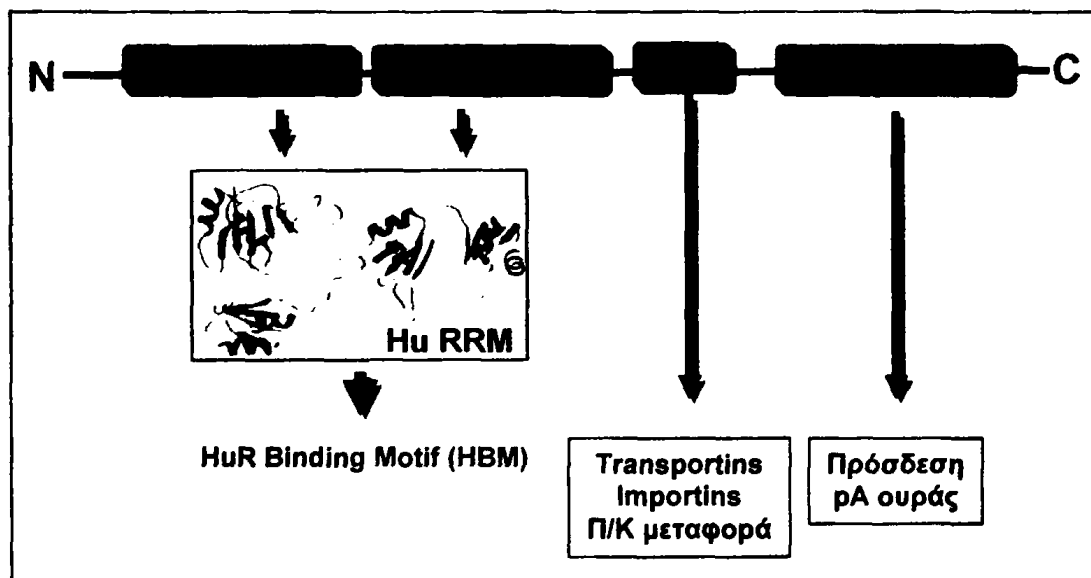
Εικόνα 9. Συγκριτική αντιστοίχιση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας μεταξύ των τεσσάρων μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών Hu του ανθρώπου.

Οι ομόλογες αλληλουχίες χρωματίζονται με μαύρο ενώ αυτές που εμφανίζουν ομοιότητες χρωματίζονται με γκρι. Επίσης, σημειώνονται τα αμινοξέα τα οποία συνιστούν το μοτίβο HNS της (Brennan et al. 2000)

Τα RRMs αποτελούν τη βασική δομή μιας λειτουργικής περιοχής μέσω της οποίας προσδένονται στο mRNA, ενώ η χαμηλά συντηρημένη συνδετική περιοχή πιθανώς να αλληλεπιδρά με άλλες κυτταρικές δομές (Gao & Keene, 1996). Η



αναγνώριση των ARE στοιχείων επιτελείται από τα δύο πρώτα RRM, ενώ το RRM3 φαίνεται να αλληλεπιδρά με την πολύ(A) ουρά (Abe et al, 1996; Ma et al, 1997) και να μην είναι απαραίτητο για την πρόσδεση στα AREs (Chung et al, 1997). Η ταυτόχρονη σύνδεση με τα ARE στοιχεία και την πολύ(A) ουρά πιθανώς αποτρέπει τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης και επάγει τη σταθεροποίηση των mRNAs (Fan & Steitz, 1998; Ma et al, 1997) (εικόνα 10). Η καθολική έκφραση της πρωτεΐνης HuR, τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όσο και στον ενήλικο οργανισμό, υποδηλώνει τον πολυσύνθετο και κρίσιμο ρόλο της πρωτεΐνης αυτής σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες.



Εικόνα 10. Διαγραμματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης HuR

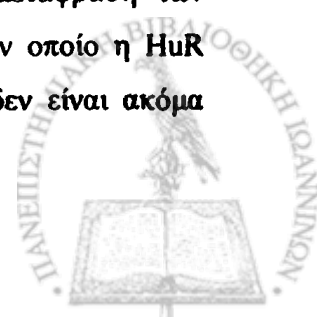
1.4.2 Δομή και χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης HuR

Η HuR αποτελεί το μέλος της οικογένειας των Hu πρωτεϊνών που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ενήλικου οργανισμού και του εμβρύου (Gouble & Morello, 2000; Ma et al, 1996). Η HuR αναγνωρίζει με μεγάλη συγγένεια τα ARE στοιχεία (Good, 1997; Levy et al, 1998; Ma et al, 1996; Sokolowski et al, 1999) και πρόσφατα χρησιμοποιώντας μια μεγάλης κλίμακας ανάλυση και μελετώντας τα ενδογενή mRNAs στόχους της HuR, περιγράφηκε τόσο η πρωτοταγής όσο και η δευτεροταγής αλληλουχία του μοτίβου το οποίο αναγνωρίζει στα mRNAs με τα οποία αλληλεπιδρά. Το μοτίβο αυτό μεγέθους 17-20 βάσεων φάνηκε να είναι περισσότερο πλούσιο σε ουρακίλη παρά σε αδενίνη και ουρακίλη όπως παραδοσιακά ορίζονται τα ARE στοιχεία. Επιπρόσθετα, η παρουσία της πενταμερούς αλληλουχίας



Η πρωτεΐνη HuR εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα αλλά έχει την ικανότητα να μετατοπίζεται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η πυρηνό-κυτταροπλασματική μεταφορά της HuR επιτυγχάνεται μέσω μιας αλληλουχίας η οποία βρίσκεται στη συνδετική περιοχή μεταξύ των RRM2 και RRM3. Η αλληλουχία αυτή, η οποία απαντάται αποκλειστικά στη HuR, ονομάζεται HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence), μοιάζει με την αλληλουχία M9, η οποία είναι υπεύθυνη για την παλίνδρομη μετακίνηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος της πρωτεΐνης hnRNP1 (Fan & Steitz, 1998) και όπως έχει δειχθεί πρόσφατα αποτελεί στόχο φωσφορυλιώσεων που επακόλουθα ρυθμίζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της HuR (Wang et al, 2000b). Θεωρείται ότι η HuR προσδέεται στα mRNAs τα οποία περιέχουν το HBM στον πυρήνα και τα μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα όπου είτε βρίσκουν πρόσβαση στο μεταφραστικό μηχανισμό είτε οδηγούνται σε γρήγορη αποδόμηση (Antic & Keene, 1998; Gao & Keene, 1996). Η HuR έχει την ικανότητα να προσδέεται σε πολύ(A) mRNAs τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και η παρουσία ενός μεγάλου μέρους (περίπου το ένα τρίτο) της κυτταροπλασματικής HuR στα πολυσώματα, ενισχύει την παραπάνω θεώρηση (Gallouzi et al, 2000). Η ρύθμιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς της HuR πραγματοποιείται από την αλληλεπίδραση τεσσάρων πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν αναστολείς της φωσφατάσης 2A και σχετίζονται με την ικανότητα της HuR να σταθεροποιεί τα mRNAs που περιέχουν το HBM και να τα μεταφέρει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι SETα, SETβ, pp32 και APRIL (acidic protein rich in leucine). Συγκεκριμένα έχει περιγραφεί ότι η pp32 και η APRIL μετακινούνται παλίνδρομα μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα πυρηνικής εξόδου CRM1 (Brennan et al, 2000). Επιπρόσθετα, στη διαδικασία εξόδου της HuR από τον πυρήνα συμβάλλει και ο υποδοχέας πυρηνικής μεταφοράς τρανσπορτίνη 2, ο οποίος αλληλεπιδρά με τη HuR μέσω της αλληλουχίας HNS, ενώ την είσοδο της στον πυρήνα φαίνεται να διευκολύνουν οι τρανσπορτίνες 1 (Tpn1) και 2 (Tpn2a και Tpn2b) και η ιμπορτίνη α1 (Gallouzi et al, 2001; Guttinger et al, 2004; Rebane et al, 2004; Wang et al, 2004).

Επομένως, ικανότητα της HuR να μετακινείται παλίνδρομα μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, επηρεάζει τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNAs με τα οποία αλληλεπιδρά. Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η HuR καθορίζει την τύχη των mRNA-στόχων της στο κυτταρόπλασμα δεν είναι ακόμα



γνωστός. Παρόλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες καθώς και οι δυναμικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης HuR παρέχουν ένα τρόπο εξήγησης για τη δράση της HuR.

1.4.3 Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη δράση της πρωτεΐνης HuR

Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν έναν ακόμα μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης καθώς είναι απαραίτητες για τη συντονισμένη ενεργοποίηση και τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη HuR υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες έχουν άμεσο αντίκτυπο στη δραστηριότητά της. Όπως έχει προαναφερθεί, τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής HuR αυξάνουν δραματικά κατά τη διάρκεια της μυογένεσης (van der Giessen et al, 2003) καθώς και μετά από επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων. Παρόλα αυτά, η μεταφορά της HuR από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να ανασταλεί αποκλειστικά από την πρωτεϊνική κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMPK), ένα ένζυμο το οποίο δρα ως ενδοκυττάριος αισθητήρας του μεταβολικού στρες. Κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση της AMPK εμποδίζει την πρόσδεση της HuR στα mRNAs στόχους της καθώς και την ακόλουθη σταθεροποίηση του mRNA τους και την αύξηση της έκφρασης τους. Στην αντίθετη περίπτωση κατά την οποία αναστέλλεται η δράση της AMPK, αυξάνονται τα επίπεδα της HuR στο κυτταρόπλασμα και ενισχύεται η πρόσδεσή της στα mRNAs της p21, της κυκλίνης B1 και A (Wang et al, 2002). Κατά αυτόν το τρόπο, η πρωτεϊνική κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης ρυθμίζει το λειτουργικό ρόλο της HuR. Επιπλέον, η AMPK τροποποιεί μεταμεταφραστικά και την ιμφορτίνη α1, η οποία βοηθά την είσοδο της HuR στον πυρήνα. Αυτή η επεξεργασία της ιμφορτίνης α1 είναι απαραίτητη για τη δράση της και κατ' επέκταση για την είσοδο της HuR στον πυρήνα (Wang et al, 2004), ιδιαίτερα σε καταστάσεις στρες. Για παράδειγμα κατά τη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου ή όταν υπάρχει έλλειψη ATP με τη δράση της AMPK στην ιμφορτίνη α1 καθώς και τη φωσφορυλίωση της HuR στην S202 από την Cdk1, η HuR κατακρατείται στον πυρήνα και το κύτταρο μειώνει το δυναμικό πολλαπλασιασμού του (Kim et al, 2008; Zou et al, 2008). Όταν τα επίπεδα του ATP επανέλθουν στο φυσιολογικό, η HuR φωσφορυλιώνεται στη S221 από την πρωτεΐνη PKC και αναστέλλεται η δράση της AMPK στην ιμφορτίνη α1 με αποτέλεσμα η HuR να βγαίνει στο κυτταρόπλασμα (Amadio et al, 2008). Επίσης, πρόσφατη έρευνα



έδειξε ότι η επιλεκτική πρόσδεση της HuR στο mRNA της SIRT1, καθορίζεται από τη φωσφορυλίωση της HuR στη θέση S100 από την κινάση του κυτταρικού κύκλου Chk2 (Abdelmohsen et al, 2007). Συγκεκριμένα, η επαγωγή οξειδωτικού στρες (H₂O₂) οδηγεί στην αποδιάταξη του συμπλόκου HuR- SIRT1, με αποτέλεσμα την αποδόμηση του mRNA της SIRT1, τη μειωμένη έκφρασή της στο κυτταρόπλασμα αλλά και τη μειωμένη επιβίωση του κυττάρου. Επιπλέον, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση στη συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης (S100), είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της πρόσδεσης της HuR στο SIRT1 mRNA, αποδεικνύοντας ότι η κινάση Chk2 ρυθμίζει αρνητικά τη δημιουργία του συγκεκριμένου συμπλόκου (Abdelmohsen et al, 2007).

Επιπρόσθετα, εκτός από τις δυναμικές φωσφωλυλίωσεις που καθορίζουν τη δραστικότητα της HuR, μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη HuR μεθυλιώνεται από την μεθυλτρανσφεράση CARM1 (Co-activator Associated Arginine Methyltransferase 1). Συγκεκριμένα, η διέγερση μακροφάγων με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), είχε σαν αποτέλεσμα και την αυξημένη μεθυλίωση της πρωτεΐνης HuR από την CARM1. Η κύρια θέση μεθυλίωσης της HuR βρίσκεται στην αργινίνη 217 (Arg²¹⁷), η οποία εντοπίζεται στη συνδετική περιοχή της πρωτεΐνης HuR μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου RRM (Li et al, 2002). Αν και ο μοριακός ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν είναι γνωστός, πιθανόν η μεθυλίωση της HuR επηρεάζει τη σταθεροποίηση του mRNA του TNFα η οποία αυξάνεται μετά από έκθεση σε LPS.

Επίσης, μια ενδιαφέρουσα μεταμεταφραστική τροποποίηση στην οποία υπόκειται η πρωτεΐνη της HuR, είναι η πρωτεολυτική διάσπαση του μορίου της στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες αποπτωτικού στρες, η HuR μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή της με τον ενεργοποιητή του συμπλόκου απόπτωσης, pp32/PHAP-I. Στο κυτταρόπλασμα η HuR υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση Asp226, η οποία διαμεσολαβείται από την κασπάση-3. Απουσία του ενεργοποιητή pp32/PHAP-I ή αντικατάσταση της Asp226 με άλλο αμινοξύ έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση αυτής της διάσπασης. Συνεπώς, η ειδική αλληλεπίδραση της HuR με τον pp32/PHAP-I και η επακόλουθη διάσπαση στο κυτταρόπλασμα, αποτελεί ένα ρυθμιστικό στάδιο στην απόκριση έναντι αποπτωτικού ερεθίσματος (Mazroui et al, 2008).

Εν τέλει, οι μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις της HuR, αναδεικνύουν τον πλειοτροπισμό του μορίου της καθώς και τον κεντρικό ρόλο που αυτή παίζει στη



ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

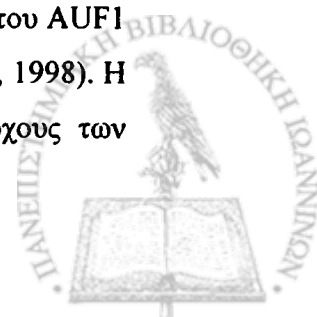
1.5 Η ARE-BP AUF1/hnRNP

Το γονίδιο του AUF1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 στο γονιδιακό τόπο q21, και το προϊόν που κωδικοποιεί ανήκει στο σύμπλοκο των ετερογενών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNPs) και έχει καθολική έκφραση. Επιπρόσθετα, ο AUF1 συμμετέχει σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η διατήρηση των τελομερικών αλληλουχιών στο DNA (Eversole & Maizels, 2000), η έναρξη της μεταγραφής (Fuentes-Panana et al, 2000) και της μετάφρασης (Lu et al, 2006a). Αναγνωρίστηκε ως ARE-BP, λόγω της ιδιότητας του να προσδέεται στο 3' UTR των mRNAs c-myc και GM-CSF και να προκαλεί την ταχεία αποδόμηση *in vitro*, σε κύτταρα της σειράς K562 (ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας) (Brewer, 1991; Zhang et al, 1993). Παρόλα αυτά όπως έδειξαν *in vitro* μελέτες ο AUF1 έχει και σταθεροποιητική δράση όταν υπερεκφράζεται με επιμόλυνση σε κυτταρικές σειρές (Chen et al, 2001).

Εκτοτε, ο AUF1 μελετήθηκε περισσότερο και αναδείχθηκε ο σημαντικός του ρόλος στον μετά-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής ρύθμισης σε παθολογικές καταστάσεις. Μάλιστα όπως προαναφέρθηκε, διαγονιδιακοί ποντικοί οι οποίοι είναι καθολικά υπομορφικοί (*knock in* μετάλλαξη στο RRM όλων των ισομορφών) ως προς τη λειτουργική πρωτεΐνη του AUF1, εμφανίζουν ευαισθησία σε ερέθισμα ενδοτοξικού σοκ, λόγω της υπερ-έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών ιντερλευκίνης-1β και TNFα απουσία της ελεγχόμενης αποδόμησης των mRNA τους (Lu et al, 2006b). Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα τα μοριακά χαρακτηριστικά του AUF1, στα οποία αποδίδεται ο πλειοτροπισμός που εμφανίζει ως μόριο.

1.5.1 Δομή, χαρακτηριστικά και μεταφραστικές τροποποιήσεις του AUF1

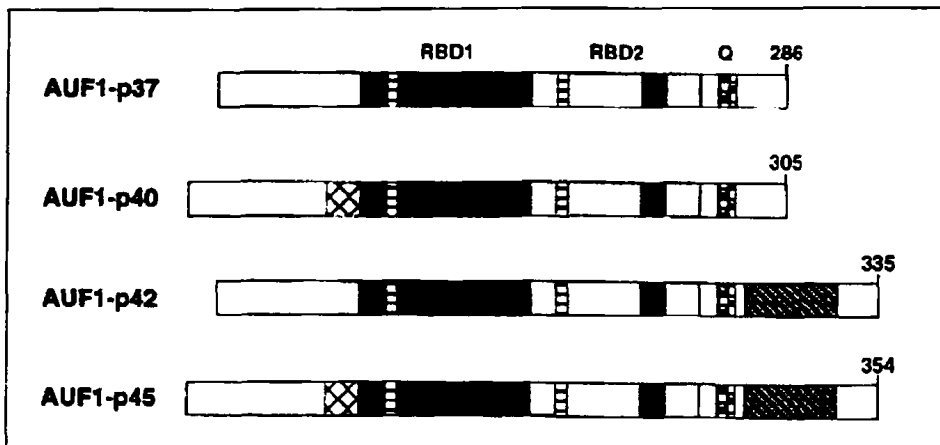
Ο AUF1 είναι ένα πλειοτροπικό μόριο, γεγονός που απεικονίζεται και στην ιδιαίτερη δομή του. Η πρωτεΐνη του AUF1 απαντάται σε τέσσερις ισομορφές μεγέθους 37 (p37), 40 (p40), 42 (p42), και 45 (p45) kDa, οι οποίες παράγονται λόγω της προσθήκης ή όχι δυο πεπτιδικών ενθεμάτων 19 και 49 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 2 και 7 αντίστοιχα. Οι τέσσερις ισομορφές του AUF1 προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα ενός μόνο mRNA (Wagner et al, 1998). Η ικανότητα πρόσδεσης καθώς και η επιλεκτική συγγένεια σε RNA στόχους των



ισομορφών του AUF1, επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία ή όχι των πεπτιδικών ενθεμάτων που προαναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα οι ισομορφές p37 και p40 που δεν φέρουν το πεπτιδίο των 19 αμινοξέων και το οποίο βρίσκεται εντός του RRM, έχουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης σε ARE αλληλουχίες σε σχέση με τις ισομορφές p42 και p45 που το φέρουν στο μόριο τους. Αντίστοιχα, το πεπτιδίο 49 το οποίο βρίσκεται εκτός RRM αλλά κοντά σε μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη στο καρβοξυτελικό άκρο (Q domain) επηρεάζει αρνητικά (απουσία του πεπτιδίου 19) ή θετικά (παρουσία του πεπτιδίου 19) την ικανότητα πρόσδεσης των ισομορφών που το φέρουν (Wagner et al, 1998).

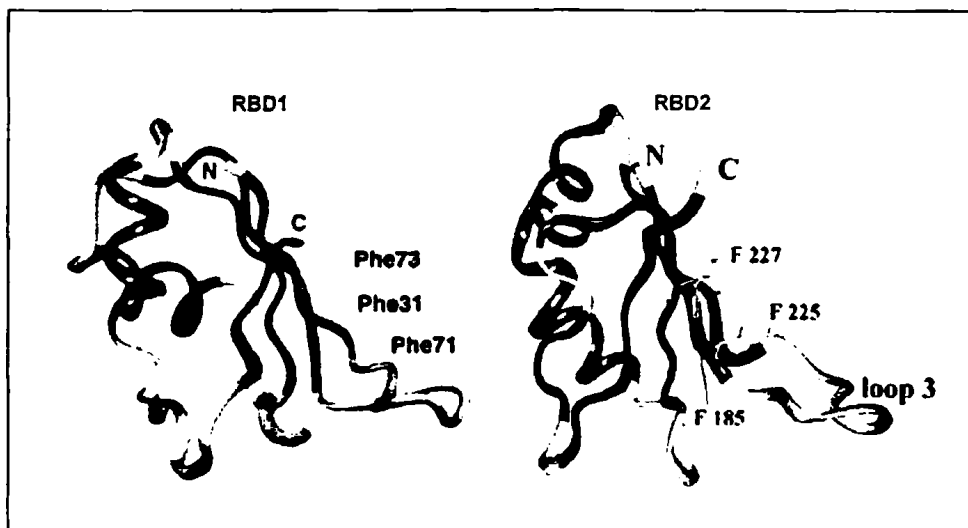
Σε όλες τις ισομορφές του AUF1 υπάρχουν συγκεκριμένα στοιχεία τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργική του δράση ως ARE-BP. Κατ' αρχάς όλες οι ισομορφές του φέρουν δύο στοιχεία RRM μέσω των οποίων γίνεται η πρόσδεση στα mRNA στόχους. Μάλιστα, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι τα δύο αυτά λειτουργικά στοιχεία του AUF1 εκτός από το γνωστό μοτίβο αναγνώρισης των AREs (εικόνες 12 & 13), αναγνωρίζουν επίσης και μονόκλωνες αλληλουχίες τελομερικού DNA στις οποίες και προσδένεται (Enokizono et al, 2005; Katahira et al, 2001). Παρόλα αυτά, *in vitro* μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα μόρια του AUF1 με τροποποιημένα καρβοξυτελικά ή/και αμινοτελικά άκρα, έδειξαν ότι και τα δύο στοιχεία RRM είναι απαραίτητα για την ικανότητα πρόσδεσης του AUF1 αλλά δεν επαρκούν. Συγκεκριμένα η παρουσία δύο στοιχείων εκατέρωθεν των RRM καθορίζει και επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα πρόσδεσης. Προς το αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται μια περιοχή 28 αμινοξέων πλούσια σε αλανίνη. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες και κυρίως για το διμερισμό (ομοδιμερισμό στην περίπτωση ίδιων ισομορφών – ετεροδιμερισμό σε αντίθετη περίπτωση) των μορίων του AUF1. Καθότι ο AUF1 προσδένεται στα mRNA στόχους με τη μορφή εξαμερών πρωτεϊνικών συμπλόκων, απαλοιφή της περιοχής αυτής, μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης κατά 10 φορές. Αντίστοιχα, στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει μία περιοχή 26 αμινοξέων πλούσια σε γλουταμίνη γνωστή και ως περιοχή Q, η οποία δεν συμμετέχει στο διμερισμό, αλλά επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα πρόσδεσης των RRM του AUF1. Μάλιστα, απαλοιφή αυτής της περιοχής μειώνει τη συγγένεια πρόσδεσης του AUF1 σε mRNA στόχους κατά 26 φορές (DeMaria et al, 1997)





Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής των ισομορφών του AUF1.

Ο AUF1 ανήκει στην οικογένεια των hnRNPs. Φέρει δύο ταυτόσημα μοτίβα αναγνώρισης RNA (RBD). Προς το C-τελικό άκρο περιλαμβάνει μία περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη (Q domain), η οποία επηρεάζει την ικανότητα δέσμωσης του RNA. Από εναλλακτικό μάτισμα του pre mRNA προκύπτουν 4 ισομορφές (p37, p40, p42, p45) της πρωτεΐνης AUF-1 (Wagner et al, 1998)



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της στεροδιαμόρφωσης των RBD περιοχών του AUF1

Οι δύο λειτουργικές περιοχές του AUF1 προσδένουν RNA καθώς και DNA αλληλουχίες. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται δομές α-έλικας και με κόκκινο απεικονίζονται οι β-αλυσίδες (Nagata et al., 1999, Katahira et al., 2001).

Επιπρόσθετα, και οι τέσσερις ισομορφές του AUF1 εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά ταυτόχρονα παρουσιάζουν ταχύτατη πυρηνικό-κυτταροπλασματική μεταφορά καθώς η υποκυτταρική τους κατανομή τους μπορεί να μεταβάλλεται ως απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα ή κατά τη διαφοροποίηση (Lagoia et al, 1999; Loflin et al, 1999). Συγκριμένα, η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πυρηνό-

κυτταροπλασματική μεταφορά του AUF1 (DNS) κωδικοποιείται από το εξόνιο 8, βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και αποτελείται από 19 αμινοξέα (SGYGKVSRRGGHQNSYKPY) στις θέσεις 288-306. Το αμινοτελικό τμήμα αυτής της περιοχής (SGYG) θεωρείται υπεύθυνο για την έξοδο του AUF1 στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα τελευταία αμινοξέα αυτής της περιοχής (KPY) είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση του AUF1 με την *τρανσπορτίνη 1* και την εισαγωγή του στον πυρήνα (Suzuki et al, 2005). Παρόλα αυτά, θεωρείται ότι η αλληλεπίδραση των ισομορφών του AUF1 συναρτίζει της στοιχειομετρία τους, καθορίζει σημαντικά τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (Sarkar et al, 2003).

Όπως και την περίπτωση της HuR οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του AUF1 αποτελούν ένα μηχανισμό ρύθμισης της δράσης του. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει, ότι η ισομορφή p40 του AUF1 φωσφορυλιώνεται αναστρέψιμα στις θέσεις Ser⁸³ και Ser⁸⁷ και η φωσφορυλίωση αυτή τροποποιεί τη στερεοδιαμόρφωση των RNPs, στα οποία προσδένεται το σύμπλοκο των ισομορφών του AUF1 και προάγει έτσι την αποδόμηση των mRNAs (Wilson et al, 2003a). Αντίστροφα, σε κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας (THP1), η χορήγηση μυριστικού εστέρα φορβόλης (TPA) προκαλεί αύξηση της σταθεροποίησης των ARE-mRNAs της ιντερελευκίνης 1β και του TNFα, η οποία συσχετίζεται με την αποφωσφορυλίωση της p40 (Wilson et al, 2003b).

Συνοψίζοντας, ο AUF1 αποτελεί έναν ακόμα δυναμικό παράγοντα στη μεταμεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων που καθορίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Οι εναλλακτικές του ισομορφές, οι δυναμικές φωσφορυλιώσεις, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του με άλλους παράγοντες, αποδίδουν μια εναρμονισμένη πολυπλοκότητα στον τρόπο δράσης του στα RNP σύμπλοκα τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες.

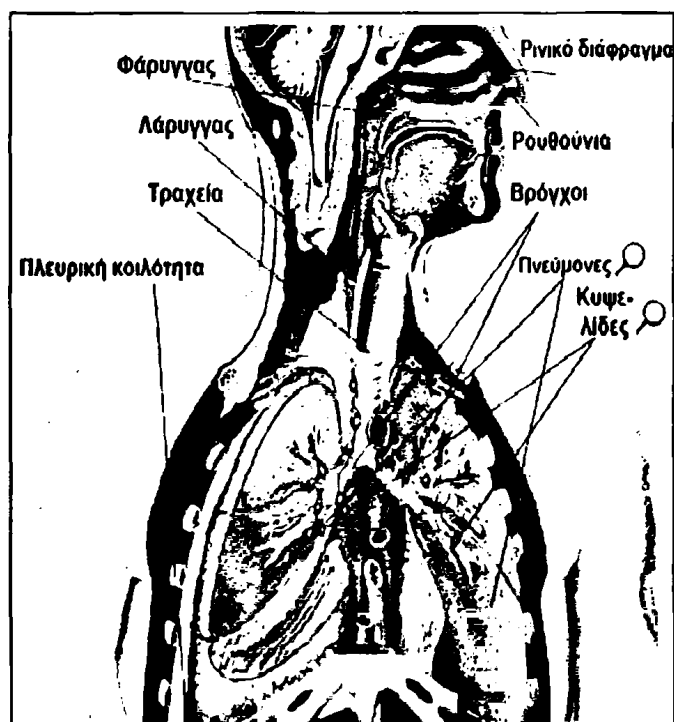
Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήσαμε το αναπνευστικό σύστημα του ποντικού ως μοντέλο για τη διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζουν οι ARE-BPs HuR και AUF1. Στο επόμενο κεφάλαιο περιγράφεται η εμβρυολογία, η δομή καθώς και τα κύρια μοριακά δίκτυα της μορφογένεσης του αναπνευστικού συστήματος στον ποντικό.



1.6 Αναπνευστικό σύστημα

1.6.1 Γενικά

Το αναπνευστικό σύστημα εξυπηρετεί την ανταλλαγή των αερίων, που ονομάζεται αναπνοή, δηλαδή την παραλαβή του οξυγόνου από την ατμόσφαιρα και την αποβολή σ' αυτήν του διοξειδίου του άνθρακα. Περιλαμβάνει ένα δίκτυο αγωγών και κοιλοτήτων διαιρούμενο ανατομικά και λειτουργικά στην άνω και στην κάτω αεροφόρο οδό (εικόνα 14). Σε γενικές γραμμές η άνω αεροφόρος οδός αποτελείται από τη ρινική και τη στοματική κοιλότητα, τα τοιχώματα του φάρυγγα και του λάρυγγα. Η κάτω αεροφόρος οδός που ουσιαστικά αποτελεί το αναπνευστικό σύστημα, διακρίνεται στην τραχεία, η οποία διαιρείται στη συνέχεια της στο δεξιό και αριστερό βρόγχο και στους πνεύμονες (δεξιός και αριστερός). Ο δομικός και λειτουργικός πυρήνας του αναπνευστικού συστήματος είναι οι πνεύμονες οι οποίοι προστατεύονται από το θωρακικό κλωβό και περιβάλλονται από το περισπλάχνιο πέταλο του υπεζωκότα. Ο πνεύμονας αποτελεί ένα δυναμικό όργανο ο βασικός ρόλος του οποίου είναι η ανταλλαγή των αερίων μεταξύ του πνευμονικού αναπνευστικού επιθηλίου και των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων που το πλαισιώνουν.

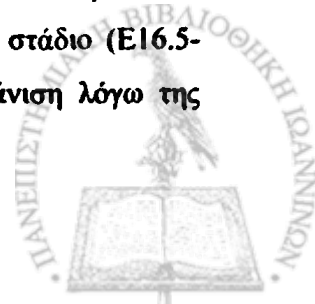


Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας του αναπνευστικού συστήματος στον άνθρωπο

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο αγωγών που διαιρείται στην άνω αεροφόρο οδό και στην κάτω αεροφόρο οδό (βλ. κείμενο).

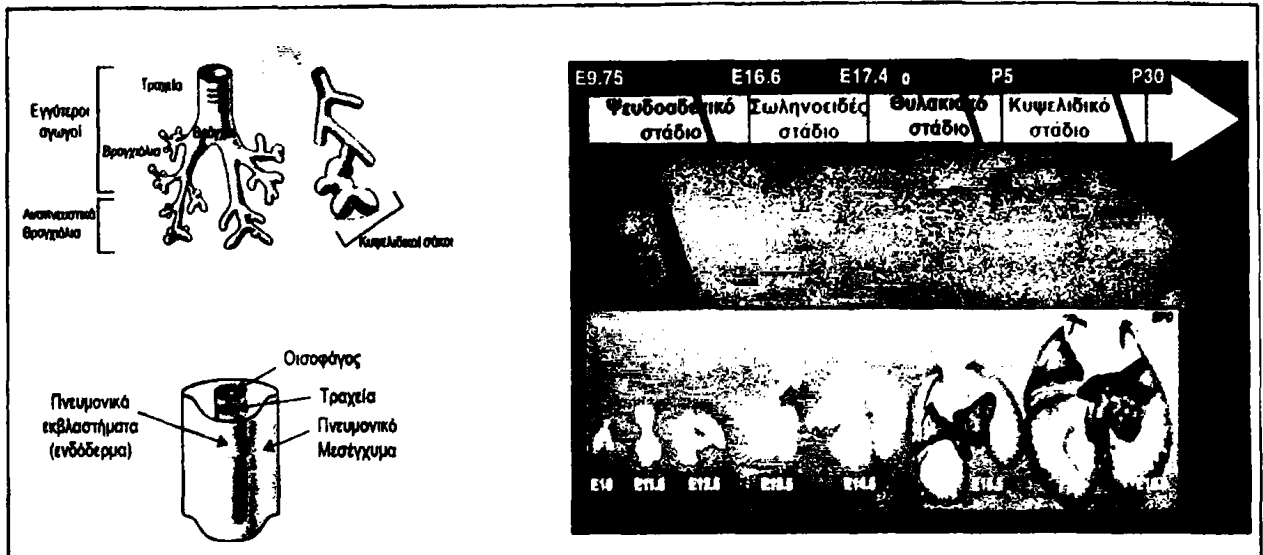
1.6.2 Εμβρυϊκή ανάπτυξη κατώτερου αναπνευστικού στον ποντικό

Ο αγωγός του κατώτερου αναπνευστικού είναι ενδοδερμικής προελεύσεως και αναπτύσσεται αρχικά από ένα πρόσθια κατευθυνόμενο εκκόλπωμα στη βάση της φαρυγγικής περιοχής του κεφαλικού εντέρου (*foregut*). Η πρώτη ένδειξη για την οντογένεση του αναπνευστικού παρατηρείται κατά την 9^η εμβρυϊκή μέρα (E9-E9.5) με την εμφάνιση της λεγόμενης λαρυγγό-τραχειακής αύλακας (*laryngo-tracheal groove*), η οποία εντοπίζεται στο άμεσα εγγύτερο σημείο του τέταρτου φαρυγγικού τόξου. Η λαρυγγό-τραχειακή αύλακα βαθιάει και δημιουργεί το τραχειακό εκκόλπωμα (*tracheal diverticulum*), στο εγγύτερο τμήμα του οποίου θα σχηματιστεί η τραχεία, ενώ το απώτερο τμήμα θα διχαστεί για να σχηματιστούν οι δύο βασικοί βρόγχοι. Λίγο αργότερα κατά την ανάπτυξη (E9.5-10), μεσεγγυματικός ιστός εμφανίζεται και περιβάλλει τα ακραία τμήματα των βρόγχων δημιουργώντας δύο ετερόπλευρες διογκώσεις, οι οποίες αποτελούν την πρώτη ένδειξη σχηματισμού των δύο πνευμονικών εκβλαστημάτων (*lung buds*). Το μεσέγγυμα που περιβάλλει την αναπτυσσόμενη τραχεία και τους βρόγχους θα σχηματίσει κατά την ανάπτυξη το βρογχικό μυϊκό ιστό, τους χόνδρινους δακτυλίους και το πνευμονικό συνδετικό ιστό. Κατά τη 10^η εμβρυϊκή μέρα τα πνευμονικά εκβλαστήματα βρίσκονται κατώτερα του κοινού κοιλιακού θαλάμου της εμβρυϊκής καρδιάς, αλλά σταδιακά κατευθύνονται ανοδικά ώστε να βρεθούν στο ίδιο θωρακικό επίπεδο με την καρδιά. Σε αυτό το στάδιο επίσης αναπτύσσονται και οι πνευμονικές αρτηρίες (ως κλάδοι του έκτου φαρυγγικού αρτηριακού τόξου), κατευθύνονται στα πνευμονικά εκβλαστήματα και εισέρχονται σε αυτά κατά το τέλος της 10^{ης} εμβρυϊκής μέρας (E10.5-11). Σε αυτό το σημείο το αναπτυξιακό πρόγραμμα του κατώτερου αναπνευστικού μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα αναπτυξιακά στάδια, στο Ψευδοαδενικό στάδιο (*Pseudoglandular stage*), στο Σωληνοειδές στάδιο (*Canalicular stage*), στο Θυλακιακό στάδιο (*Saccular stage*) και στο Κυψελιδικό στάδιο (*Alveolar stage*) (εικόνα 15). Κατά το ψευδοαδενικό στάδιο (E10.5-16.5) συντελούνται οι βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες που θα οδηγήσουν στη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου (*branching morphogenesis*). Αρχικά στο στάδιο αυτό, τα δύο πνευμονικά εκβλαστήματα (αριστερό και δεξιό) και οι αντίστοιχοι βρόγχοι, αποκτούν μια ασύμμετρη οργάνωση καθώς το πνευμονικό επιθήλιο υπόκειται σε μια διαδικασία διαδοχικών, διχοτομικών υποδιαίρέσεων, οι οποίες εγκλείονται στον υποκείμενο και έντονα αναπτυσσόμενο μεσεγγυματικό ιστό. Κατά το σωληνοειδές στάδιο (E16.5-17.5), οι αναπτυσσόμενοι πνεύμονες αποκτούν πιο αγγειώδη εμφάνιση λόγω της



εκτενούς αγγείωσης που πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο. Παράλληλα, σε αυτό το στάδιο σχηματίζονται τα αναπνευστικά βρογχιόλια, η διάμετρος των αεραγωγών αυξάνεται με επακόλουθη λέπτυνση του επιθηλίου και το μεσέγγυμα διαφοροποιείται, ακολουθώντας την ανάπτυξη του βρογχικού δένδρου, σε χονδροκύτταρα, ινοβλάστες και μυοβλάστες. Κατά το θυλακιακό στάδιο, το οποίο συνεχίζεται και μετά τη γέννηση του εμβρύου (E17.5-P5), πραγματοποιείται η διακλάδωση των τελικών βρογχιολίων και των κυψελιδικών αγωγών. Σε αυτό το στάδιο το επιθήλιο των κυψελίδων γίνεται ιδιαίτερα πλακώδες, το ενδιάμεσο στρώμα που περιβάλλει το μελλοντικό αναπνευστικό επιθήλιο λεπταίνει και το φέρνει σε επαφή με το εκτενές δίκτυο των τριχοειδών και ταυτόχρονα ολοκληρώνονται οι διαδικασίες διαφοροποίησης του πνευμονικού επιθηλίου στους διάφορους κυτταρικούς τύπους (Αναπνευστικά κύτταρα Τύπου I και II, Κυψελιδικά κύτταρα κλπ.). Η ανάπτυξη του πνεύμονα συνεχίζεται και μετά τη γέννηση για 30 ακόμα μέρες (Κυψελιδικό στάδιο), όπου ολοκληρώνονται οι διαδικασίες διαφραγματοποίησης (*septation*) και επέκτασης των τελικών αναπνευστικών θυλακίων (*terminal alveolar sacs*) που οδηγούν στην αύξηση της αναπνευστικής επιφάνειας για την ανταλλαγή των αερίων. Πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι την 17^η – 18^η εμβρυική μέρα, (λίγο πριν την πρώτη αναπνοή του εμβρύου δηλαδή) οι πνεύμονες και όλοι οι αγωγοί του αναπνευστικού είναι γεμάτοι με αμνιακό υγρό. Με την πρώτη αναπνοή το αμνιακό υγρό απομακρύνεται από το βρογχικό δένδρο και τις κυψελίδες και κατά συνέπεια η περιφερειακή πίεση μεταξύ του πνεύμονα και της ροής του αίματος στα πνευμονικά αγγεία μειώνεται δραματικά. Η διαδικασία αυτή παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια των αλλαγών που συμβαίνουν στην αιμοδυναμική του κυκλοφορικού συστήματος του νεογνού. (M.H. Kaufman & J.B.L. Bard, R. Maronpot, (Cardoso, 2000).



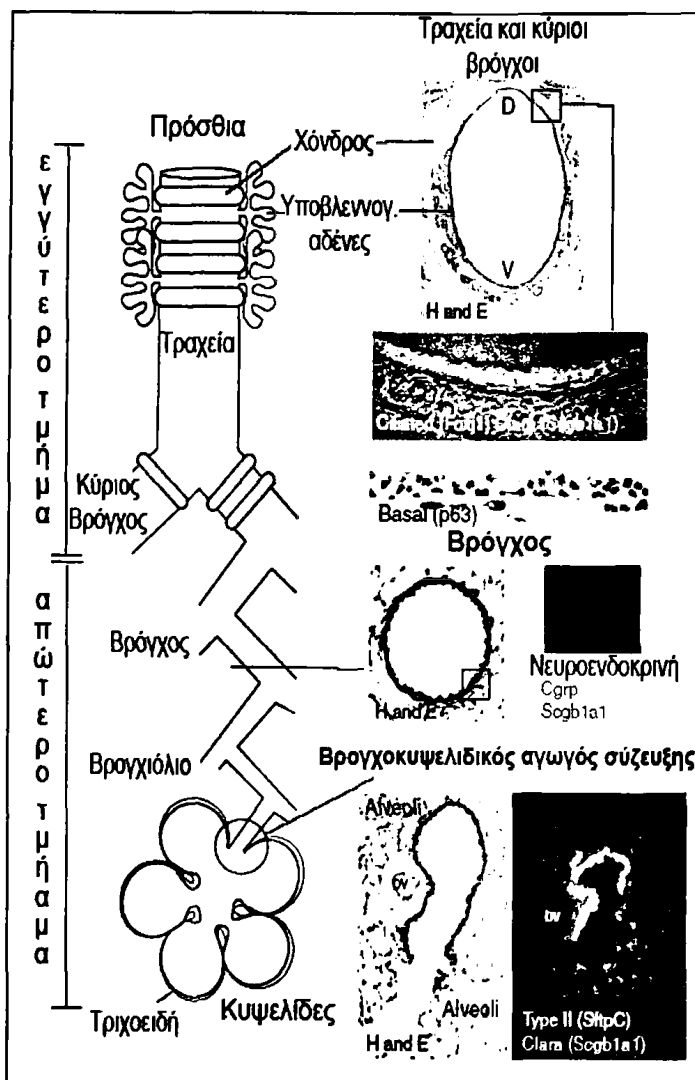


Εικόνα 15. Τα αναπτυξιακά στάδια του πνεύμονα ποντικού.

Από τη στιγμή που θα εμφανιστούν τα πνευμονικά εκβλαστήματα στο αρχέντερο, το αναπτυξιακό πρόγραμμα του κατώτερου αναπνευστικού μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα αναπτυξιακά στάδια, στο Ψευδοαδενικό στάδιο (*Pseudoglandular stage*), στο Σωληνοειδές στάδιο (*Canalicular stage*), στο Θυλακικό στάδιο (*Saccular stage*) και στο Κυψελιδικό στάδιο (*Alveolar stage*).

1.6.3 Ανατομία – Ιστολογία αγωγών κατώτερου αναπνευστικού

Το αγωγό σύστημα του κατώτερου αναπνευστικού εμφανίζει μια τρισδιάστατη δομή και παρουσιάζει σημαντικές διαφορές κατά μήκος του προσθοπίσθιου (εγγύτερου-απώτερου) άξονα, στη σύσταση ή/και στη δομή των επιθηλιακών κυττάρων που τον αποτελούν (εικόνα 16). Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο γεγονός ότι η τραχεία και οι πνεύμονες προκύπτουν από διαφορετικές μορφογενετικές διαδικασίες που συμβαίνουν στο πρωτογενές κεφαλικό έντερο (*foregut*). Παρακάτω περιγράφεται η δομή και η κυτταρική σύσταση των βασικών τμημάτων του κατώτερου αναπνευστικού.



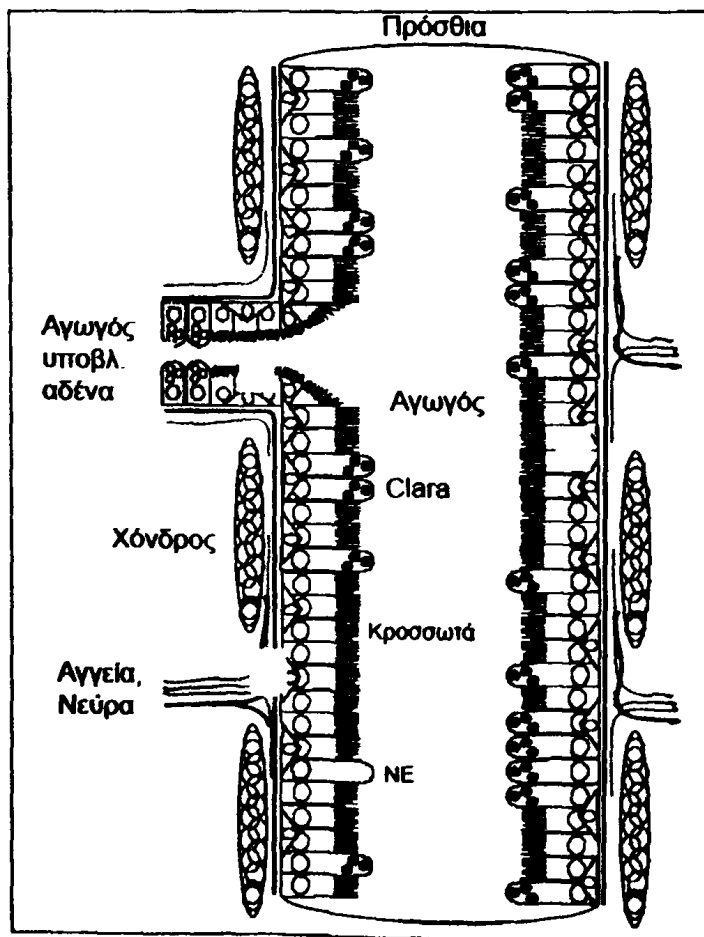
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση του συνόλου των βασικών κυτταρικών τύπων κατά μήκος του αναπνευστικού άξονα.

Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που απαρτίζουν τα διάφορα μέρη των αγωγών του κατώτερου αναπνευστικού ποικίλουν κατά μήκος του προσθοπίσθιου ή αλλιώς εγγύτερου/απώτερου άξονα. Οι κύριοι επιθηλιακοί κυτταρικοί πληθυσμοί στον πνεύμονα αποτελούνται από τα βασικά κύτταρα (*basal cells*) τα κύτταρα Clara και τα τύπου I και II κυψελιδικά κύτταρα. (Rawlins & Hogan, 2006)

Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι σε κάθε επίπεδο του πνευμονικού επιθηλίου μπορούν να προσδιοριστούν ανοσοϊστοχημικά, όπως περιγράφεται παρακάτω (βλ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ), από συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες που εκφράζονται αποκλειστικά σε κάθε τύπο κυττάρου.

1.6.3.1 Τραχεία - Βρόγχοι

Η τραχεία είναι ένας ελαστικός σωλήνας που εκτείνεται από το λάρυγγα μέχρι το θώρακα. Η τραχεία λειτουργεί ως αγωγός για τον αέρα, ενώ παράλληλα συμμετέχει στον έλεγχο της κατάστασης του εισπνεόμενου αέρα. Αποτελείται από τέσσερα στρώματα τα οποία από μέσα προς τα έξω είναι: ο βλεννογόνος (επιθήλιο και βασική μεμβράνη), ο υποβλεννογόνος (χαλαρός συνδετικός ιστός και βλεννογόνοι-ορογόνοι αδένες), το ινοχόνδρινο τμήμα (πυκνός συνδετικός ιστός) με τη μορφή ημικρικών και ο ινώδης χιτώνας (εικόνα 17). Ο βλεννογόνος χιτώνας αποτελείται από ψευδοπολύστοιβο κροσσωτό επιθήλιο το οποίο συνίσταται κυρίως από τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς. Ο πιο πολυπληθής κυτταρικός τύπος είναι τα κροσσωτά κύτταρα (*ciliated cells*) με τις κινήσεις των οποίων απομακρύνονται βλαβερά στοιχεία. Ο αμέσως επόμενος πληθυσμιακά κυτταρικός τύπος είναι τα κύτταρα Goblet τα οποία εκκρίνουν βλέννα. Και ο τρίτος βασικός πληθυσμός είναι τα βασικά κύτταρα (*basal cells*) τα οποία λειτουργούν ως αποθεματικά κύτταρα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλους κυτταρικούς τύπους και να τους αναπληρώσουν. Επιπρόσθετα, στο επιθήλιο της τραχείας παρατηρούνται και λιγοστά νευροενδοκρινικά κύτταρα.



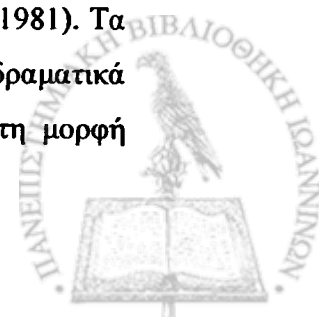
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της τραχείας και των κύριων βρόγχων.

Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα κύτταρα Clara, με πράσινο τα κροσσωτά κύτταρα, με ροζ τα νευροενδοκρινικά, με πορτοκαλί τα βασικά κύτταρα, και με μαύρη γραμμή αντιστοιχεί τη βασική μεμβράνη. Στην εικόνα φαίνονται επίσης χόνδρινα στοιχεία, αγγεία και νεύρα (Rawlins & Hogan, 2006).

Η κατάληξη της τραχείας διαιρείται στους δύο βασικούς βρόγχους, οι οποίοι εισέρχονται στους πνεύμονες. Ιστολογικά, η τραχεία και οι βασικοί βρόγχοι δεν διαφέρουν σημαντικά. Μέσα στον πνεύμονα, οι βασικοί βρόγχοι διαιρούνται σε δευτεροταγείς βρόγχους, στη συνέχεια αυτοί διαιρούνται σε τριτοταγείς οι οποίοι συνεχίζουν να διακλαδίζονται σε ακόμα μικρότερους βρόγχους (βρογχιόλια). Στους βρόγχους τα χόνδρινα ημικρίκια που παρατηρούνται στην τραχεία, αντικαθίστανται από μικρά τμήματα συνδετικού ιστού. Κατά τη μετάβαση των βρόγχων σε βρογχιόλια ο συνδετικός ιστός σταδιακά εξαφανίζεται και ταυτόχρονα η βασική μεμβράνη αρχίζει να περιβάλλεται από λείες μυϊκές ίνες. Όπως προαναφέρθηκε το επιθήλιο των βρόγχων είναι παρόμοιο με αυτό της τραχείας (ψευδοπολύστοιβο), αλλά σταδιακά λεπταίνει και τα κύτταρα goblet είναι λιγότερα. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που συνιστούν το επιθήλιο των βρόγχων είναι τα κροσσωτά κύτταρα και τα κύτταρα Clara. Τα τελευταία εκκρίνουν τον παράγοντα Scgb1a1, γνωστό και ως CC-10/CCSP. Ο παράγοντας CC-10 ανήκει στην οικογένεια των εκκρινόμενων σφαιρινών. Η ακριβής λειτουργία του CC-10 δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως αλλά εκτιμάται ότι έχει αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικό ρόλο (Lesur et al, 1995). Η έκφραση του CC-10 διεγείρεται από κυτοκίνες όπως ο TNF α (Yao et al, 1998b) και η ιντερφερόνη γ (Yao et al, 1998a), και η συγκέντρωσή του στο πλάσμα χρησιμοποιείται ως δείκτης φλεγμονωδών και νεοπλαστικών ασθενειών στον πνεύμονα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι συγκέντρωση του CC-10 στον ορό, είναι αυξημένη σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονία (ΙΠ), ενώ σε ασθενείς με χρόνια βρογχικό άσθμα και χρόνια ιωσινοφιλική πνευμονία η συγκέντρωση του CC-10 είναι μειωμένη (Ye et al, 2004)

1.6.3.2 Απώτεροι βρόγχοι (δευτεροταγείς και τριτοταγείς) – Βρογχιόλια

Καθώς οι βρόγχοι διακλαδίζονται σε μικρότερους βρόγχους, η διάμετρος ελαττώνεται, τα χόνδρινα ερείσματα και οι μικτοί αδένες λιγοστεύουν όλο και περισσότερο. Στο σημείο όπου ο πυκνός συνδετικός ιστός και οι μικτοί αδένες έχουν εξαφανιστεί, αρχίζουν τα όρια των βρογχολίων. Το επιθήλιο σε αυτό το σημείο και μετά μεταβαίνει από ψευδοπολύστοιβο σε μονόστιβο κυλινδρικό κροσσωτό (*ciliated columnar*). Στο επιθήλιο των βρογχολίων υπερισχύουν τα κύτταρα Clara έναντι των κροσσωτών κυττάρων, η παρουσία των νευροενδοκρινικών (NE) κυττάρων γίνεται εντονότερη ενώ τα βασικά κύτταρα (*basal cells*) απουσιάζουν (Pack et al, 1981). Τα κύτταρα goblet λιγοστεύουν σταδιακά και η βασική μεμβράνη λεπταίνει δραματικά ερχόμενη σε επαφή με το επιθήλιο. Η μυϊκή στιβάδα, εμφανίζεται με τη μορφή

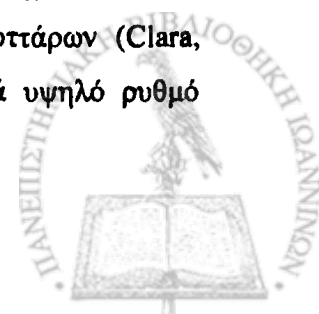


ασυνεχών και πυκνών δεσμίδων λείων μυών, οι οποίες περιβάλλουν τους βρόγχους και τα βρογχιόλια και συνιστούν το βρογχικό μυϊκό σύστημα. Η παρασυμπαθητική διέγερση των βρογχικών μυών μειώνει τη διάμετρο των βρογχιολίων ενώ η συμπαθητική διέγερση την αυξάνει, ρυθμίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την αντίσταση του αέρα και τη ροή του στους αγωγούς των πνευμόνων.

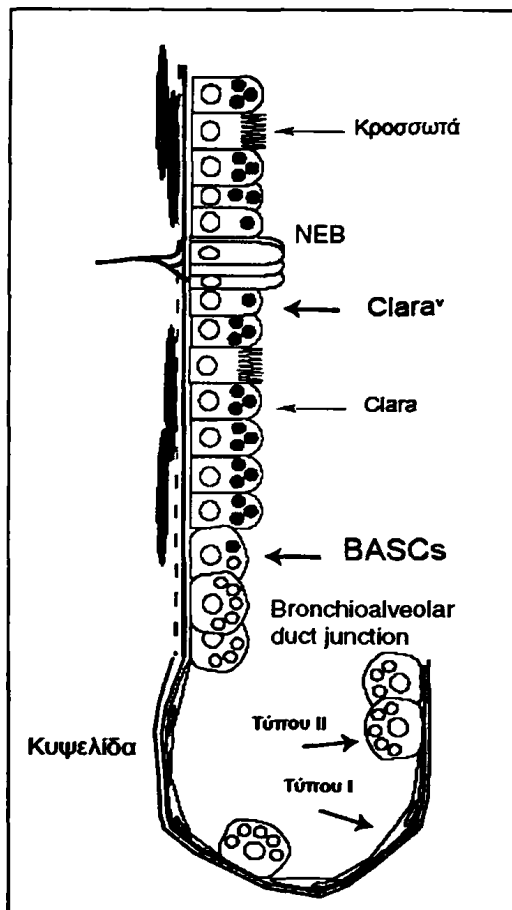
1.6.3.3 Τελικά και αναπνευστικά βρογχιόλια

Οι συνεχείς διακλαδώσεις των βρογχιολίων καταλήγουν στα τελικά βρογχιόλια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το τελευταίο τμήμα του αγωγού συστήματος. Στα τελικά βρογχιόλια το επιθήλιο μεταβαίνει σε μονόστιβο πλακώδες αποτελούμενο σχεδόν αποκλειστικά από κύτταρα Clara. Η λεία μυϊκή στιβάδα στα τελικά βρογχιόλια μικραίνει σταδιακά κατά τη μετάβαση τους σε αναπνευστικά βρογχιόλια. Το αναπνευστικό βρογχιόλιο ουσιαστικά προσδιορίζεται από την παρουσία της πρώτης κυψελίδας η οποία συνιστά το αναπνευστικό επιθήλιο και σηματοδοτεί την απαρχή του αναπνευστικού δέντρου (*respiratory tree*). Η περιοχή ανάμεσα στο ακραίο τμήμα του τελικού βρογχιολίου και στο αρχικό τμήμα του αναπνευστικού επιθηλίου ονομάζεται βρόγχο-κυψελιδικός αγωγός σύζευξης ή αλλιώς BADJ (Bronchial Alveolar Duct Junction) (εικόνες 16 και 18).

Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας λόγω των κυτταρικών πληθυσμών που εντοπίζονται εκεί. Σε αυτή την περιοχή υπάρχουν δύο διακριτοί κυτταρικοί πληθυσμοί με ικανότητα αναγέννησης και αναπλήρωσης άλλων κυτταρικών πληθυσμών. Έχει δειχθεί ότι, στην περιοχή BADJ ένας υποπληθυσμός των κυττάρων Clara, γνωστός ως Clara^V, ο οποίος γειτνιάζει στα νευροενδοκρινικά σωμάτια, είναι ανθεκτικός στον τραυματισμό που προκαλεί η έκθεση σε ναφθαλίνη, ενώ παράλληλα ο υποπληθυσμός αυτός αναγεννάται σχετικά γρήγορα και αναπληρώνει κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς (κυρίως Clara και κροσσωτά κύτταρα) του τραυματισμένου επιθηλίου (Giangureco et al, 2002; Hong et al, 2001; Rawlins & Hogan, 2006; Reynolds et al, 2000a; Reynolds et al, 2000b). Επίσης, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν προσδιορίσει ένα άλλον κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος αποτελεί τα βλαστικά κύτταρα του πνεύμονα και είναι γνωστός ως βρόγχο-κυψελιδικά βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς BASCs (Bronchiolar-Alveolar Stem Cells). Ο πληθυσμός αυτός εντοπίζεται στο ακραίο τμήμα της BADJ περιοχής (βλ. παρακάτω), έχει ικανότητα αναγέννησης και αναπλήρωσης των πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων (Clara, τύπου I και II) *in vivo* και *in vitro* και παρουσιάζει ένα σχετικά υψηλό ρυθμό



κυτταρικού κύκλου, ιδιαίτερα μετά από έκθεση σε παθογόνους παράγοντες (Kim et al, 2005). Μάλιστα, θεωρείται ότι κατά την καρκινογένεση ενέχεται αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός και ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών, καθώς και η εξάπλωση τους στο πνευμονικό επιθήλιο απουσία ερεθίσματος, σηματοδοτεί τις διαδικασίες της καρκινογένεσης στον πνεύμονα (Kim et al, 2005; Ventura et al, 2007; Yanagi et al, 2007).



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της δομής των τελικών βρογχιολίων.

Η περιοχή ανάμεσα στο ακραίο τμήμα του τελικού βρογχιολίου και στο αρχικό τμήμα του αναπνευστικού επιθηλίου ονομάζεται βρόγχο-κυψελιδικός αγωγός σύζευξης ή αλλιώς BADI (Bronchial Alveolar Duct Junction). Η περιοχή αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί εκεί εντοπίζονται τα βρόγχο-κυψελιδικά βλαστικά κύτταρα του πνεύμονα ή αλλιώς BASCs (Bronchiolar-Alveolar Stem Cells) (Rawlins & Hogan, 2006).

1.6.3.4 Αναπνευστικές κυψελίδες – Αναπνευστικοί αγωγοί

Το αναπνευστικό δένδρο έχει τις απαρχές του στα αναπνευστικά βρογχιόλια στις άκρες των οποίων πρωτοεμφανίζονται επιθηλιακές προεκβολές, οι κυψελίδες. Καθώς τα αναπνευστικά βρογχιόλια συνεχίζουν να διακλαδίζονται οι κυψελιδικές αυτές προεκβολές σταδιακά πληθαίνουν και συγκλίνουν μεταξύ τους. Στο σημείο όπου οι κυψελίδες έχουν πληθύνει τόσο ώστε να στοιχειοθετούνται η μια δίπλα στην άλλη χωριζόμενες από τα τοιχώματά τους (alveolar septa), τότε σηματοδοτείται ο αναπνευστικός αγωγός. Οι αναπνευστικοί αγωγοί διακλαδίζονται έως ότου

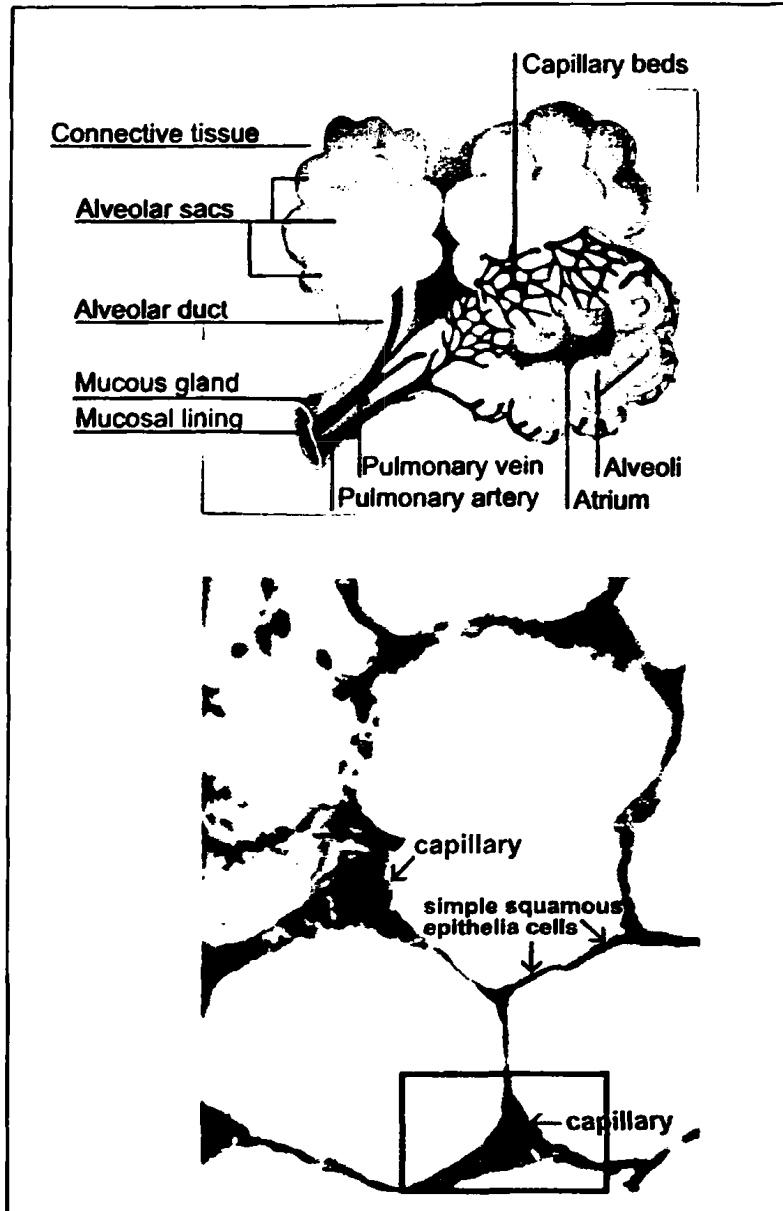


καταλήξουν σε κυψελιδικούς σάκους με τυφλά άκρα. Οι κυψελιδικοί σάκοι συνίστανται από χώρους (γνωστοί και ως κόλποι – atria) οι οποίοι περιβάλλονται από κυψελίδες. Στους χώρους αυτούς εγκλωβίζεται ο εισπνεόμενος αέρας.

Τα τοιχώματα των κυψελίδων είναι εξειδικευμένα για τη διάχυση αερίων. Ανάμεσα στα τοιχώματα των κυψελίδων παρεμβάλλεται ένα πλούσιο δίκτυο αιμοφόρων τριχοειδών, ελαστικές και κολλαγόνες ίνες, ινοβλάστες και μακροφάγα. Η επιφάνεια των τοιχωμάτων που έρχεται σε επαφή με τον αέρα αποτελείται από μονόστοιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο συνίσταται από δύο τύπους κυττάρων, τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I και τύπου II. Το 95% της επιφάνειας του τοιχώματος των κυψελίδων καλύπτεται από τα τύπου I, τα οποία είναι ιδιαίτερα πλακώδη και η κυτταρική τους μεμβράνη έχει συντηχθεί με αυτήν των ενδοθηλιακών κυττάρων που δομούν το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων. Η ανταλλαγή – διάχυση των αερίων (μεταξύ εισπνεόμενου αέρα και τριχοειδών) πραγματοποιείται αποκλειστικά στα λεπτά τμήματα των κυψελιδικών τοιχωμάτων και περιλαμβάνει τρία στοιχεία: το κυτταρόπλασμα των κυττάρων τύπου I, την κοινή κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων τύπου I και των ενδοθηλιακών κυττάρων του τριχοειδούς και τέλος το κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, είναι διασκορπισμένα στο αναπνευστικό επιθήλιο και παρεμβάλλονται ανάμεσα στα κύτταρα τύπου I, είτε μεμονωμένα είτε κατά ομάδες (εικόνες 18 και 29). Τα τύπου II κύτταρα είναι σχετικά μεγάλα, κυβοειδή κύτταρα μεγάλο πυρήνα και πλούσιο σε κυστίδια κυτταρόπλασμα. Παρόλο που καλύπτουν το 5% της επιφάνειας των κυψελίδων είναι σχεδόν το ίδιο άφθονα όσο και τα κύτταρα τύπου I. Βασική λειτουργία των κυττάρων αυτών είναι να εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα (SP – Surfactant Protein) ο οποίος αποτελείται από πρωτεΐνες 10% (SP-A, SP-B, SP-C και SP-D) και φωσφολιπίδια 90%. Καθώς εκκρίνεται από τα τύπου II κύτταρα, διαχέεται επί της κυψελιδικής επιφάνειας για να μειώσει την επιφανειακή τάση. Κατά αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η κατάρρευση των κυψελίδων κατά την εκπνοή. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση της έμφυτης ανοσίας (Coalson et al, 1995; Johansson & Curstedt, 1997; Kuroki et al, 1994) και στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων του πνεύμονα (Borron et al, 1996) καθώς και στην ομοίωση των λιπιδίων (Piedboeuf et al, 1997).





Εικόνα 19. Σχηματική (πάνω) και ιστολογική (κάτω) απεικόνιση των κυψελίδων.

Οι κυψελίδες συνίστανται από επιθηλιακά κύτταρα τύπου I και II, και περιβάλλονται από ένα πλούσιο δίκτυο τριχοειδών. Η ανταλλαγή των αερίων επιτελείται μεταξύ των τριχοειδών και των κυψελιδικών κυττάρων τύπου I.

1.7 Μοριακά μονοπάτια κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα

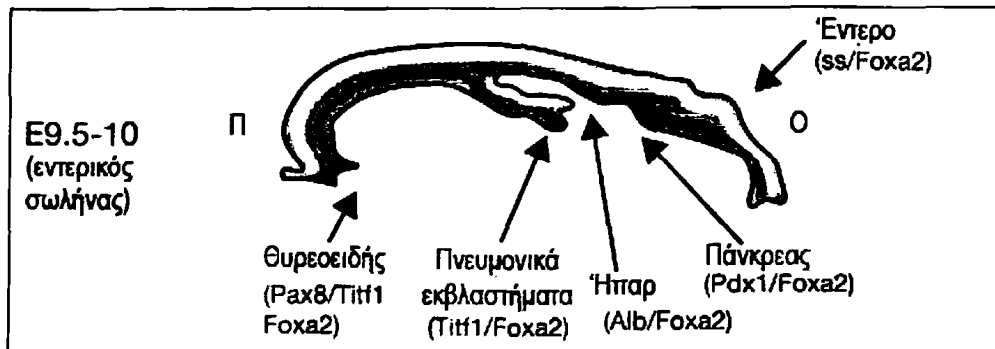
Η οργανογένεση του πνεύμονα, όπως συμβαίνει σε όλους τους ιστούς, εξαρτάται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μοριακών αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν κυτταρικές διαδικασίες όπως τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση, την πολικότητα, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργικότητα. Οι μοριακές αυτές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, εκκρινόμενα μόρια και τους αντίστοιχους υποδοχείς. Η έκφραση, ο εντοπισμός και η δράση των οποίων μεταβάλλεται σε ακριβή χώρο-χρονικά πλαίσια κατά τα προαναφερθέντα αναπτυξιακά στάδια του πνεύμονα. Η μορφογένεση του κατώτερου αναπνευστικού συνίσταται σε δύο διαδοχικές και ανεξάρτητες διαδικασίες, την εγκαθίδρυση του αρχέγονου πνευμονικού ιστού με την εμφάνιση των πνευμονικών εκβλαστημάτων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, και τη δημιουργία στερεοτυπικών διαδοχικών διακλαδώσεων (*branching morphogenesis*) του πνευμονικού επιθηλίου στα μετέπειτα στάδια.

1.7.1 Εγκαθίδρυση κατώτερου αναπνευστικού συστήματος

Κατά μήκος του προσθοπίσθιου άξονα του αρχεντερικού σωλήνα παρατηρείται η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων ή μοριακών δεικτών χαρακτηριστικών για συγκεκριμένα όργανα πολύ πριν το σχηματισμό τους. Ο *TTF-1* ή αλλιώς *Nkx2* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που χαρακτηρίζει ή οριοθετεί την περιοχή από την οποία θα προβάλλουν τα πνευμονικά εκβλαστήματα (Lazzaro et al, 1991) (εικόνα 20). Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας είναι ο πιο πρώιμος δείκτης που σχετίζεται με τον καθορισμό των ενδοδερμικών κυττάρων σε κύτταρα του πνεύμονα και του θυροειδούς. Ο κοινός εντοπισμός του *TTF-1* και του μεταγραφικού παράγοντα *FOXA2* (ή αλλιώς *Hnf3β*) οριοθετεί αποκλειστικά την περιοχή όπου θα σχηματιστούν οι πνεύμονες (Bohinski et al, 1994). Αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν και στα μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης του πνεύμονα επηρεάζοντας άμεσα την έκφραση ομάδων γονιδίων που ρυθμίζουν την ομοίωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (*surfactant homeostasis*), την αγγειογένεση, τη διαφοροποίηση και τη φλεγμονή. Συγκεκριμένα, ο *TTF-1* προσδένεται άμεσα στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων χαρακτηριστικών για τα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα όπως *Sfira*, *Sfirh*, *Sfirp* και *Sfirp1*. Αντίστοιχα, ο *FOXA2* ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό ή/και τη λειτουργία του



πνεύμονα, όπως τα γονίδια *Sftpa*, *Sftpc*, *Sftpd*, *Muc5A/C*, *Wnt7b*, *E-cadherin* και *Vegfa* (Maeda et al, 2007).



Εικόνα 20. Εγκαθίδρυση κατώτερου αναπνευστικού συστήματος

Ο κοινός εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων TTF1 και Foxa2 οριοθετεί την περιοχή από την οποία θα προκύψουν οι δομές του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (Maeda & Whitsett, 2007)

Παρόλο που TTF1 είναι ο νωρίτερος μοριακός δείκτης της μελλοντικής αναπνευστικής περιοχής, η καθολική απαιολογή του στον ποντικό δεν προκαλεί αγένεση των πνευμόνων. Όμως, οι πνεύμονες στους μεταλλαγμένους ποντικούς παρουσιάζουν μια ιδιαίτερα ανώμαλη εμφάνιση, η οποία συνίσταται από δύο κύριους βρόγχους που καταλήγουν διογκωμένες κυστικές δομές, περιβαλλόμενες από κυλινδρικό επιθήλιο, ενώ παράλληλα απουσιάζουν δομές του απώτερου αγωγού συστήματος (Minoo et al. 1999). Συνεπώς η παρουσία του TTF1 δεν είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των εγγύτερων δομών του αναπνευστικού, αλλά φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στο αναπτυξιακό πρόγραμμα των επιθηλιακών κυττάρων των απώτερων δομών που κατά τη διαδικασία των διαδοχικών διακλαδώσεων.

1.7.2 Μορφογένεση του βρογχικού δένδρου – Παράγοντες που καθορίζουν το αναπτυξιακό πρόγραμμα των διαδοχικών διακλαδώσεων

Οι αναπτυξιακές διαδικασίες που κατευθύνουν την εμφάνιση των πρωτογενών πνευμονικών εκβλαστημάτων, καθώς και τις μετέπειτα διαδοχικές διακλαδώσεις τους κατά τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου, καθορίζονται από την αμοιβαία αλληλεπίδραση του αναπτυσσόμενου πνευμονικού μεσεγχύματος και του υπερκείμενου ενδοδέρματος. Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση αυτή συνίσταται σε ένα πολύπλοκο μοριακό δίκτυο, που περιλαμβάνει τη συντονισμένη

χώρο-χρονική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, εκκρινόμενων μορίων και των αντίστοιχων υποδοχέων. Παρακάτω περιγράφεται ο ρόλος των πιο βασικών παραγόντων που μετέχουν σε αυτή τη διαδικασία.

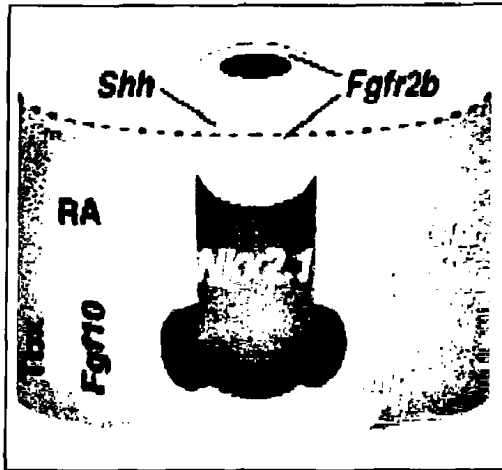
1.7.2.1 Μορφογένεση των πνευμονικών εκβλαστημάτων – οριοθέτηση του FGF10

Προς το τέλος της 9^{ης} εμβρυικής μέρας εμφανίζονται τα πρωτογενή πνευμονικά εκβλαστήματα (εικόνα 21). Στα θηλαστικά, ο αυξητικός παράγοντας FGF10 καθώς και ο κύριος υποδοχέας του FGFR2b, παίζουν ζωτικό ρόλο στη δημιουργία των πνευμονικών εκβλαστημάτων. Η πλήρης απαλοιφή του FGF10 ή του υποδοχέα του από το γονιδίωμα του ποντικού, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια πνευμονικών δομών (De Moerlooze et al, 2000; Min et al, 1998; Sekine et al, 1999). Η οριοθέτηση της έκφρασης του FGF10 στον αρχεντερικό σωλήνα δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, αλλά υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η έκφραση του FGF10 στο επίπεδο σχηματισμού των πρώιμων πνευμονικών δομών, εξαρτάται ιδιαίτερα από το ρετινοϊκό οξύ (RA) (Desai et al, 2004). Η σύνθεση και η δράση του RA κυριαρχεί μεταξύ 8ης και 9ης εμβρυικής μέρας (Maipel et al, 2000) στο foregut του ποντικού. Η αποσιώπηση της δράσης του RA επηρεάζει δραματικά τον πνεύμονα με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη απουσία του (Mollard et al, 2000).

Επίσης οι T-box μεταγραφικοί παράγοντες (Tbx2, Tbx3, Tbx4, Tbx5) εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του FGF10. Σε έμβρυα όρνιθας ο TBX4 και ο FGF10, συνεκφράζονται στο μεσόδερμα του κεφαλικού εντέρου στο επίπεδο σχηματισμού του μελλοντικού πνεύμονα. *In ovo* μελέτες έδειξαν, ότι η εκτοπική έκφραση του TBX4, επάγει την έκφραση του FGF10 στην αντίστοιχη θέση (Sakiyama et al, 2003). Παρόλα αυτά, η απενεργοποίηση του TBX4 στον ποντικό δεν εμποδίζει τη σχηματισμό πνευμονικών εκβλαστημάτων (Naiche & Papaioannou, 2003), επειδή ενδέχεται οι υπόλοιποι T-box μεταγραφικοί παράγοντες να επαρκούν κατά τη μορφογένεση του πνεύμονα (Charman et al, 1996).

Αφού δημιουργηθούν τα πρωτογενή πνευμονικά εκβλαστήματα, ο FGF10 προωθεί τις διαδικασίες μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου, όπου και σε αυτές τις διαδικασίες η δράση και η οριοθέτηση του FGF10 είναι καθοριστικής σημασίας.





Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων που καθοδηγούν τη δημιουργία των πρωτογενών πνευμονικών εκβλαστημάτων

Ρύθμιση της ανάπτυξης των πρωτογενών πνευμονικών εκβλαστημάτων (βλ. κείμενο). Με γκρι χρώμα απεικονίζεται το μεσόδερμα, με μπλε το ενδόδερμα και με κόκκινο το ενδόδερμα από το οποίο θα προκύψει η τραχεία και π πνεύμονας (Cardoso & Lu, 2006).

1.7.2.2 Η μορφογένεση του βρογχικού δένδρου – ρύθμιση του FGF10 μονοπατιού

Ο FGF10 είναι ένας χημειοτακτικός παράγοντας για το ενδόδερμα, και προάγει τον πολλαπλασιασμό. Καθώς εκκρίνεται από το πνευμονικό μεσόδερμα, διαχέεται στο υπερκείμενο ενδοδερμικό επιθήλιο και πυροδοτεί μέσω του FGFR μονοπατιού τη διαδοχική δημιουργία επιθηλιακών δευτερογενών προεκβολών (εικόνα 22Α). Αντίστοιχα, το ενδοδερμικό επιθήλιο αποκρίνεται με αναδραστικό τρόπο εκκρίνοντας μόρια που ασκούν έλεγχο στο μέγεθος και το σχήμα των αναπτυσσόμενων προεκβολών. Στην εικόνα 23 περιγράφεται ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η δράση του FGFR μονοπατιού ή η έκφραση του FGF10 κατά τα πρώτα στάδια της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση αυτοκρινικών και παρακρινικών μοριακών μονοπατιών, από παράγοντες που εκκρίνονται από το επιθήλιο εξαρτώμενα ή ανεξάρτητα της δράσης του FGF10.

1.7.2.2α Η δράση του Sprouty2 (Spry2) και του Shh μονοπατιού

Η πρωτεΐνη Spry2 είναι το πρώτο μόριο του οποίου η έκφραση στις άκρες του αναπτυσσόμενου πνευμονικού επιθηλίου, επάγεται ως απόκριση στη δράση του FGF10 (Mailleux et al, 2001). Η πρωτεΐνη Spry2 δρα ως FGF10-εξαρτώμενος αναστολέας του FGFR2b μονοπατιού, καθώς δεσμεύει παράγοντες που είναι καθοδικά του FGF10-FGFR2b μονοπατιού και παρεμβάλλεται στον καταρράκτη

φωσφορυλιώσεων Rtk-Ras-Erk/Mapk. (Tefft et al, 2002). Κατά αυτόν τον τρόπο περιορίζει τον πολλαπλασιασμό ή τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων και κατά συνέπεια καταστέλλει τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου (εικόνα 22B).

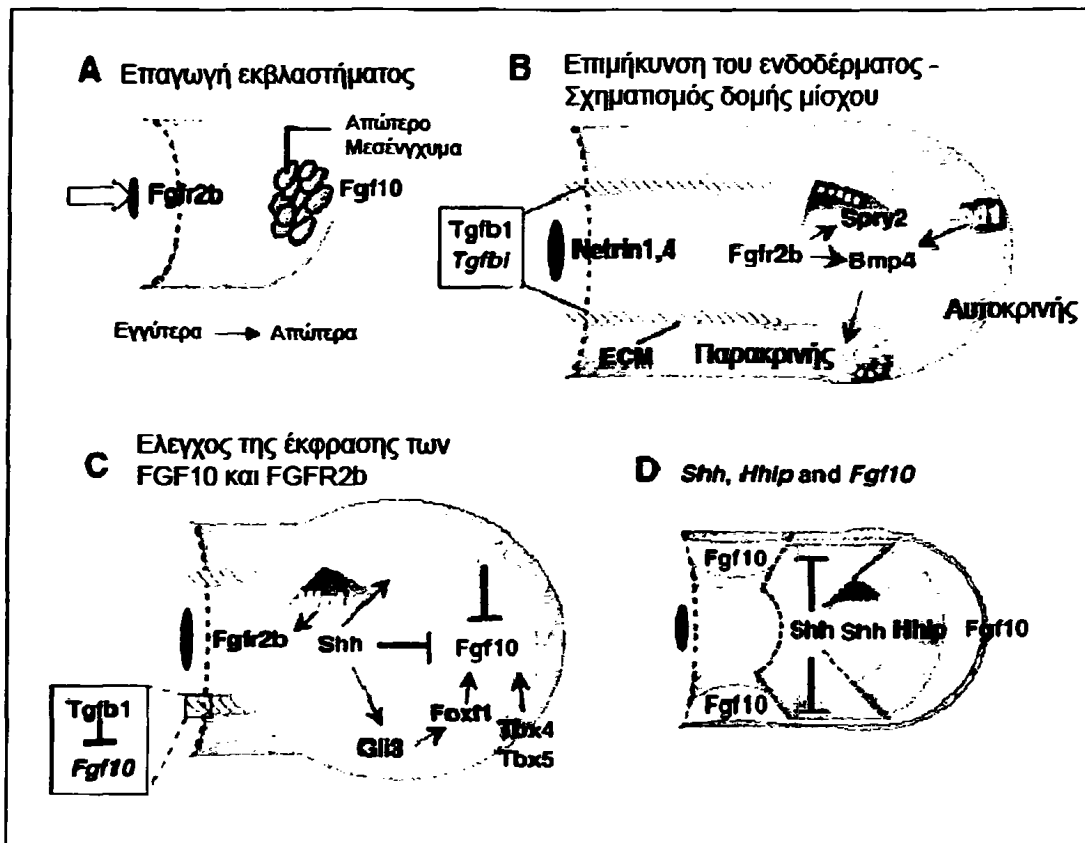
Η διαδικασία των διαδοχικών διακλαδώσεων ρυθμίζεται επίσης και από διαχεόμενους παράγοντες όπως η πρωτεΐνη Sonic hedgehog (Shh). Η Shh πρωτεΐνη εκκρίνεται από τις άκρες του νεοσχηματιζόμενου πνευμονικού εκβλαστήματος και μεταβάλλει αρνητικά την έκφραση του FG10 στο υποκείμενο μεσέγγυμα μέσω του Ptc1-Smo μονοπατιού και των μεταγραφικών τελεστών Gli1, Gli2 και Gli3, επηρεάζοντας έτσι τη δράση του στο επιθήλιο (Bellusci et al, 1997a; Bellusci et al, 1997b). Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται αυτή η ρύθμιση δεν είναι διασαφηνισμένη, αλλά σημαντικό ρόλο παίζει η αλληλεπίδραση του Shh με την πρωτεΐνη Hhip1 (Hedgehog interacting protein 1) η οποία δρα ως ρυθμιστής στη διαβάθμιση του διαχεόμενου Shh στο μεσέγγυμα (Chuang et al, 2003) (εικόνες 22 C και D).

1.7.2.β Το BMP μονοπάτι στη ρύθμιση των διαδοχικών διακλαδώσεων

Ένα από τα πιο καλά μελετημένο μόριο της υπέρ-οικογένειας των BMPs στον αναπτυσσόμενο πνεύμονα είναι ο παράγοντας BMP4, ο οποίος μπορεί να έχει αρνητική ή θετική δράση στη διαδικασία της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου. Αρχικά, ο BMP4 εκφράζεται στο πνευμονικό μεσέγγυμα στα πρώτα στάδια, ενώ η έκφρασή του στο επιθήλιο εμφανίζεται κατά τη διαδικασία των διαδοχικών διακλαδώσεων και επάγεται από τη δράση του FGF10 (Weaver et al, 2003; Weaver et al, 1999). Προς το τέλος της 11ης εμβρυικής μέρας, η έκφραση του BMP4 είναι ιδιαίτερα αυξημένη στις παρυφές του πνευμονικού επιθηλίου, κοντά στα κύτταρα που εκφράζουν FGF10. Όταν το μονοπάτι του BMP4 ενεργοποιείται αυτοκρινικά στις άκρες του πνευμονικού επιθηλίου, καταστέλλεται ο πολλαπλασιασμός του άρα και η επιμήκυνσή του. Συνεπώς η αυτοκρινική δράση του BMP4 είναι ανταγωνιστική έναντι του FGF10 (Lebecche et al, 1999; Weaver et al, 2003). Παράλληλα, ο BMP4 διαχέεται στο υποκείμενο μεσέγγυμα (παρακρινική δράση) όπου επάγει με έναν άγνωστο μηχανισμό τον πολλαπλασιασμό (Bragg et al, 2001). Ενδέχεται η θετική δράση του BMP4 να οφείλεται στην ενεργοποίηση μορίων στο μεσέγγυμα που καταστέλλουν τη δράση του BMP4 στο επιθήλιο, ενισχύοντας έτσι τη δράση του FGF10. Η ρύθμιση της δράσης του BMP4 στο πνευμονικό επιθήλιο είναι πολύπλοκη



και εξαρτάται και από μονοπάτια μεταγωγής σημάτων όπως αυτά των Wnts, του FGF10 και του μεσεγχυματικού μεταγραφικού παράγοντα Pod1 (Quaggin et al, 1999).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ρύθμισης του FGF10-FGFR μονοπατιού κατά τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου.

Το μόριο του FGF10 παίζει πρωταρχικό ρόλο κατά τα πρώτα στάδια της μορφογένεσης του πνεύμονα. Εκκρίνεται από το πνευμονικό μεσόδερμα και επάγει τη δημιουργία πνευμονικών εκβλαστημάτων από το ενδόδερμα. Από το ενδόδερμα εκκρίνονται μόρια που ρυθμίζουν με αναδραστικό τρόπο τη δράση του FGF10 (βλ. κείμενο) (Cardoso & Lu, 2006).

1.7.2.2γ Το δίκτυο Wnt – FGF στη ρύθμιση της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου

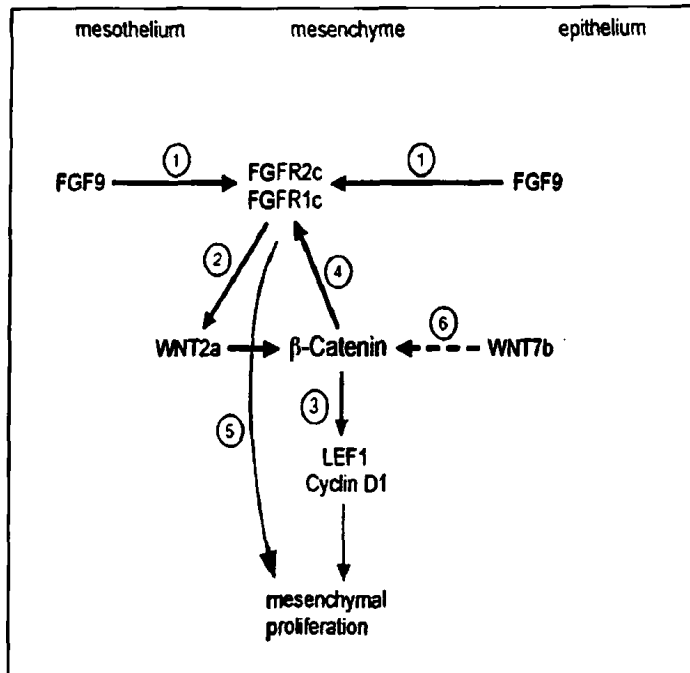
Η παρουσία μορίων Wnts και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, καθώς και η ενεργοποίηση του μονοπατιού της β-κατενίνης παίζουν ιδιαίτερο ρόλο τόσο στο πνευμονικό επιθήλιο όσο και στο υποκείμενο μεσένγχυμα κατά τη διαδικασία των



διαδοχικών διακλαδώσεων. Η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού συνεπάγεται τη πυρηνική μετατόπιση της β-κατενίνης. Κατά τα εμβρυϊκά στάδια E11-13 η β-κατενίνη εκφράζεται σε όλο το μήκος του πνευμονικού επιθηλίου. Παρόλα αυτά η πυρηνική μετατόπιση της β-κατενίνης και του πυρηνικού μεταγραφικού συμπαράγοντα της Tcf1, είναι αυξημένη μόνο στα απώτερα διακλαδιζόμενα τμήματα του πνευμονικού επιθηλίου (De Langhe et al, 2005; Okubo & Hogan, 2004). Η στοχευόμενη απαλοιφή της β-κατενίνης στο πνευμονικό επιθήλιο καταστέλλει τη δημιουργία πνευμονικών εκβλαστημάτων στα απώτερα τμήματα. Η απώλεια του μονοπατιού της β-κατενίνης επηρεάζει αρνητικά τη σωστή έκφραση του υποδοχέα FGFR2b στο επιθήλιο και κατά συνέπεια τη δράση του FGF10 σε αυτό.

Επιπρόσθετα, το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων Wnt – FGF παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των πνευμονικών μεσεγχυματικών κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες, έχουν αναδείξει το ρόλο του FGF9 στον έλεγχο των παραπάνω διαδικασιών στο μεσέγχυμα. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του πνεύμονα (E10-E12), ο FGF9 εκκρίνεται από το μεσοθήλιο (επιθήλιο που περιβάλλει το πνευμονικό μεσέγχυμα – μελλοντικός υπεζωκότας) και από τις πτυχές του πνευμονικού επιθηλίου. Ο FGF9 ενεργοποιεί τους μεσεγχυματικούς υποδοχείς FGFR2c και FGFR1c, οι οποίοι με τη σειρά τους επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού β-κατενίνης (αυξάνοντας την έκφραση του Wnt2a), είτε απευθείας μέσω του FGF-FGFR μονοπατιού (Colvin et al, 2001; White et al, 2006). Παράλληλα, η ενεργοποίηση των FGFRs προκαλεί ένα κύκλο θετικής ανάδρασης μέσω της β-κατενίνης (εικόνα 23). Η απαλοιφή του FGF9 στον ποντικό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεσεγχυματικών κυττάρων και κατά συνέπεια λιγότερη παραγωγή FGF10 στο σύνολο του πνευμονικού μεσεγχύματος επηρεάζοντας έμμεσα την ανάπτυξη του πνευμονικού επιθηλίου.





Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση του δικτύου Wnt - FGF στη ρύθμιση της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου

Το μονοπάτι της ενεργοποίησης των FGFRs επάγει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων άμεσα ή έμμεσα ενεργοποιώντας το μονοπάτι Wnt - β-κατενίνης. Παράλληλα η ενεργοποίηση των FGFRs προκαλεί ένα κύκλο θετικής ανάδρασης μέσω της β-κατενίνης (Yin et al, 2008) (βλ. κείμενο)

Είναι φανερό ότι η ρύθμιση των παραγόντων που καθορίζουν τις διαδικασίες της μορφογένεσης του πνεύμονα απαιτεί το συντονισμένο έλεγχο σε όλα τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης. Μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί μελέτες που να συνδέουν άμεσα την έκφραση των κύριων μορφορυθμιστικών παραγόντων της ανάπτυξης του πνεύμονα με τους ARE-διαμεσολαβούμενους ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Παρόλα αυτά, αρκετοί στόχοι αυτών των παραγόντων σχετίζονται με γονίδια που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό (κυκλίνες), τη διαφοροποίηση (N-myc) και την απόπτωση (Bcl2) και τα οποία μπορεί να φέρουν ARE στοιχεία. Μάλιστα, πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει το δυναμικό ρόλο των microRNAs στη ρύθμιση των αναπτυξιακών διαδικασιών του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων ομάδων miRNAs μεταβάλλονται στα διάφορα στάδια της πνευμονικής ανάπτυξης στον αρουραίο. Επιπρόσθετα, στην ίδια μελέτη, η υπερέκφραση του miR127 με ιική επιμόλυνση σε καλλιέργειες εμβρυικών πνευμόνων προκάλεσε μειωμένο αριθμό διακλαδώσεων και ασύμμετρη ανάπτυξη (Bhaskaran et al, 2009). Η μελέτη αυτή απλά επιβεβαιώνει και επισημαίνει την ιδιαίτερη σημασία του μεταμεταγραφικού ελέγχου στις χώρο-χρονικά δυναμικές μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη.

1.8 Ο ρόλος της HuR και του AUF1 στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση

Όπως έχει προαναφερθεί η HuR και ο AUF1 μετέχουν στις αναπτυξιακές διαδικασίες και τη διαφοροποίηση. Η έκφραση αυτών των ARE-BPs είναι καθολική και η μεταγραφή των mRNAs τους ανιχνεύεται ήδη από την 8^η εμβρυϊκή ημέρα (8-8.5 dpc) (Gouble & Morello, 2000). Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης των AUF1 και HuR, ποικίλλουν τόσο μεταξύ των διαφόρων ιστών όσο και στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η HuR και ο AUF1 ρυθμίζονται ιστοειδικά και χρονικά.

Όσον αφορά στη HuR, πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες από το εργαστήριό μας (Katsanou et al, 2009), ανέδειξαν τη σημαντικότητά της κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, οι ποντικοί με καθολική απαλοιφή της HuR πεθαίνουν στο στάδιο της γαστριδίωσης λόγω της ελλιπούς διαφοροποίησης έξω-εμβρυϊκών /τροφοβλαστικών δομών και της καταστολής στην ανάπτυξη του πλακούντα. Η διαταραχή στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών δομών στον πλακούντα σχετίζεται με το γεγονός ότι η HuR ελέγχει τα mRNAs των Ets2 και Gcm1, τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση της HuR με το mRNA του γονιδίου TBX4, του οποίου η δράση σχετίζεται με την αγγειογένεση της αλλαντοΐδας και τη σύζευξη της με το χόριο, υποδηλώνει ότι η HuR ελέγχει τις αναπτυξιακές διαδικασίες που ακολουθούν την χοριοαλλοντοϊκή σύντηξη.

Επίσης, για να μελετηθεί ο ρόλος της HuR στην οργανογένεση, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί ποντικοί, στους οποίους η απαλοιφή της HuR πραγματοποιείται στα κύτταρα της επιβλάστης και στους προερχόμενους εξ αυτών ιστούς, αλλά όχι σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Οι μεταλλαγμένοι ποντικοί επιβίωναν μετά το πέρας της γαστριδίωσης αλλά εμφάνιζαν σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη διαφόρων οργάνων. Κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγμένων ποντικών, είναι η καθυστέρηση/καταστολή της οστεοποίησης των άκρων και η ελλιπής διακριτή προσθοπίσθια εξειδίκευση των ακροδακτύλων, η απουσία πρωτογενών δομών σπλήνα και η καταστολή της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου στον πνεύμονα. Μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι η HuR δρα ως χώρο-χρονικός οργανωτής των γονιδιακών δικτύων που ελέγχουν τις αναπτυξιακές διαδικασίες των απώτερων άκρων και της οργανογένεσης του σπλήνα.



Στην περίπτωση του AUF1, σε πρόσφατη μελέτη δημοσιεύθηκε η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με καθολική απαλοιφή της λειτουργικής περιοχής όλων των πρωτεϊνικών ισομορφών του AUF1 (Lu et al, 2006). Οι ποντικοί αυτοί φέρουν μία *knock in* (προσθήκη του γονιδίου της νεομυκίνης –Neo με ομόλογο ανασυνδυασμό) μετάλλαξη στο εξόνιο 3 που κωδικοποιεί τα RRM's σε όλες τις ισομορφές. Η μετάλλαξη αυτή αδρανοποιεί την ικανότητα του AUF1 να δεσμεύει mRNAs. Η καθολική αδρανοποίηση του AUF1, σε αντίθεση με τη HuR, δεν είναι θνησιγενής. Παρόλα αυτά, οι μεταλλαγμένοι ποντικοί εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη και ευαισθησία έναντι ερεθίσματος ενδοτοξικού σοκ. Δεν έγιναν περαιτέρω μελέτες σχετικά με την αναπτυξιακή διαταραχή που παρουσιάζουν οι μεταλλαγμένοι ποντικοί. Παρόλα αυτά, πρόσφατες αναφορές, συσχετίζουν τη διαφορική χωροχρονική έκφραση των ισομορφών του AUF1 με την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του εγκεφάλου (Hambardzumyan et al, 2009).

1.9 Καρκινογένεση - Μετασχηματισμός του πνευμονικού επιθηλίου

1.9.1 Γενικά

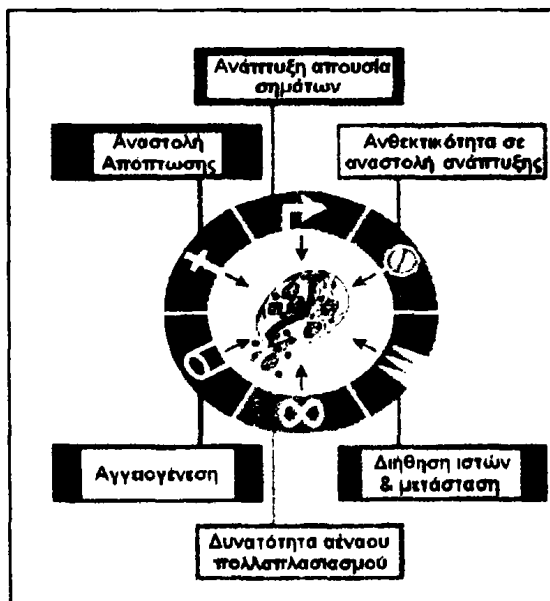
Σχεδόν το 90% των καρκίνων του ανθρώπου είναι καρκινώματα, δηλαδή όγκοι επιθηλιακής προέλευσης. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι καρκίνοι του δέρματος, του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του μαστού και του προστάτη. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στην ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη συχνότητα από την πλειοψηφία των άλλων κυτταρικών τύπων καθώς και το ότι έρχονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε επαφή με φυσικά και χημικά καρκινογόνα. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε το πνευμονικό επιθήλιο ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων *in vivo*.

1.9.2 Καρκίνος

Σε γενικές γραμμές με τον όρο καρκίνο προσδιορίζουμε τις ασθένειες οι οποίες οφείλονται σε διαταραχές στη βιολογία των κυττάρων. Στην περίπτωση του κακοήθους νεοπλάσματος (ιατρικός όρος για τον καρκίνο) τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ένα σύνολο βιολογικών χαρακτηριστικών που τα διαφοροποιεί από τα φυσιολογικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά σύμφωνα με τους Hanahan and Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000) (εικόνα 24) είναι τα εξής :



- Ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός απουσία σημάτων αυξητικών παραγόντων ή παρουσία ανασταλτικών για τον πολλαπλασιασμό σημάτων
- Απώλεια της ικανότητας απόπτωσης
- Απώλεια της ικανότητας γήρανσης (αθανασία)
- Απόκτηση της ικανότητας να επάγουν την τοπική αγγειογένεση που απαιτείται για την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου
- Απόκτηση της ικανότητας να διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και να μπορούν να δημιουργήσουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα.
- Αυξημένος ρυθμός μεταλλακτικότητας λόγω απώλεια της ικανότητας διόρθωσης γενετικών λαθών



Εικόνα 24. Τα χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου (Hanahan και Weinberg)

Οι όγκοι ταξινομούνται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται. Οι καρκίνοι του επιθηλίου ονομάζονται καρκινώματα και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του συνόλου των καρκίνων. Οι καρκίνοι που προέρχονται από το συνδετικό ιστό ή τα μεσεγχυματικά κύτταρα ορίζονται ως σαρκώματα. Οι νεοπλασίες προερχόμενες από τα κύτταρα του αίματος ορίζονται ως λευχαιμίες και λεμφώματα. Τέλος, οι καρκίνοι που προέρχονται από ολοδύναμα κύτταρα αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία και παρατηρούνται σε γεννητικά κύτταρα ή σε εμβρυικούς ιστούς.

Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ένα κύτταρο καθίσταται καρκινικό περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο την αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση (Croce, 2008). Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων που επηρεάζονται από αυτές τις αλλαγές, τα ογκογονίδια και τα όγκο-κατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια συνήθως είναι φυσιολογικά γονίδια που σωστή έκφρασή τους έχει απορυθμιστεί ή μεταλλαγμένα γονίδια που έχουν αποκτήσει καινούργιες ιδιότητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ογκογονίδια κωδικοποιούν παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική αύξηση όπως μεταγραφικούς παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, καθώς και ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές, η υπερλειτουργία των οποίων συνεπάγεται το μετασχηματισμό των κυττάρων. Το πρώτο ογκογονίδιο που χαρακτηρίστηκε ήταν το γονίδιο Ras. Οι μεταλλάξεις στην οικογένεια του Ras γονιδίου (K-Ras, H-Ras, N-Ras) παρατηρούνται σε ποσοστό 20-30% όλων των ανθρώπινων καρκίνων (Bos, 1989). Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, την επιβίωση ή όποια άλλη ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Συνήθως τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι απενεργοποιημένα στα καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοκατασταλτικού γονιδίου είναι το p53, τα οποίο ενεργοποιείται από αρκετούς στρεσογόνους παράγοντες. Αλλαγές στην έκφραση του p53 έχουν παρατηρηθεί σχεδόν σε ποσοστό 50% των καρκίνων. Τυπικά, ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, προϋποθέτει αλλαγές σε αρκετά γονίδια (Knudson, 2001).

1.9.3 Καρκίνος του πνεύμονα

Στις αρχές του 20ου αιώνα ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν σχεδόν άγνωστο. Σήμερα είναι η πρώτη αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο στους άνδρες και δεύτερη (μετά τον καρκίνο του στήθους) στις γυναίκες, παγκοσμίως. Ο καρκίνος του πνεύμονα ευθύνεται για τον θάνατο 1,3 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα, ενώ στην Ελλάδα διαγιγνώσκονται περίπου 5000 περιπτώσεις ετησίως. Το κάπνισμα είναι ο βασικότερος παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα (90% των περιπτώσεων παγκοσμίως). Η πλειονότητα των νεοπλασιών του πνεύμονα είναι καρκινώματα. Στον άνθρωπο ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί διακριθεί ιστολογικά σε δύο κύριες κατηγορίες: στον μη-μικροκυτταρικό (80,4%) και στον μικροκυτταρικό (16,8%).



Ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος (NSLC) μπορεί να διακριθεί σε τρεις υποκατηγορίες: το πλακώδες καρκίνωμα (31,2%) το οποίο ξεκινά συνήθως από κάποιο κεντρικό βρόγχο, το αδenoκαρκίνωμα (29,4%) το οποίο προέρχεται από τον περιφερειακό πνευμονικό ιστό και τέλος το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα.

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος είναι λιγότερο συνήθης μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, αλλά είναι σαφώς πιο επιθετικός. Εμφανίζεται κυρίως από τους μεγαλύτερους αεραγωγούς και αναπτύσσεται πολύ γρήγορα. Στα πρώτα στάδια, αυτός ο τύπος καρκίνου μπορεί να αντιμετωπιστεί με χημειοθεραπεία, αλλά σε προχωρημένα στάδια γίνεται μεταστατικός και σχεδόν μη αντιμετωπίσιμος.

1.9.4 Μεταμεταγραφικός έλεγχος – Καρκίνος του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε, η σταθερότητα και η μετάφραση του mRNA ρυθμίζονται από ένα σύνθετο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ RNA και RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Αλλοιώσεις ή μεταλλάξεις στην αλληλουχία σημαντικών mRNAs ή μεταβολές στην έκφραση, στον εντοπισμό και στην ικανότητα πρόσδεσης των RNA-BPs μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν σε διάφορους τύπους καρκίνου και συχνά σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο καρκίνου. αφού έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου.

Ήδη αναφερθήκαμε σε διαταραχές της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση γενικότερα όπως το c-myc, c-fos, και οι κυκλίνες. Αντίστοιχα η απορρύθμιση του μετά-μεταγραφικού ελέγχου αυτών των γονιδίων, εμπλέκεται σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα. Για παράδειγμα, μελέτες σε 8 διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από NSLC και SCLC, έδειξαν ότι τα mRNAs των c-myc και c-fos παρουσίαζαν αυξημένη σταθερότητα (αυξημένος χρόνος ημιζωής) μετά από την αναστολή της μεταγραφής με ακτινομυκίνη D. Η σταθεροποίηση αυτή ήταν ειδική για αυτά τα mRNAs και δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στην αλληλουχία τους. Η διαταραχή αυτή συσχετίστηκε, χωρίς σαφή απόδειξη όμως, με απορρύθμιση των παραγόντων του ARE-διαμεσολαβούμενου μηχανισμού αποδόμησης (Bernasconi et al, 2000). Οι πιο πρόσφατες έχουν εστιαστεί στο ρόλο που παίζουν τα miRNAs στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Μάλιστα, κάποια miRNAs που ανήκουν στην οικογένεια των let-7, δρουν ως ογκοκατασταλτικά ελέγχοντας την έκφραση ογκογονιδίων όπως το Ras, και αντιστοίχως έχουν ελαττωμένη έκφραση σε



καρκίνους του πνεύμονα. Γενικότερα, πραγματοποιούνται έρευνες ώστε να βρεθούν και άλλα miRNAs με κατασταλτική ή επαγωγική δράση, για να χρησιμοποιηθούν στην πρόγνωση.

1.9.5 Συσχέτιση της HuR και του AUF1 με την καρκινογένεση.

Η πρώτη ένδειξη συσχέτισμού των Hu/Elavl1 πρωτεϊνών με τον καρκίνο του πνεύμονα και γενικότερα με την καρκινογένεση δόθηκε από την ανακάλυψη των πρωτεϊνών Hu ως αυτοαντιγόνα σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που εμφάνιζαν παρανεοπλαστικές νευρολογικές διαταραχές (σύνδρομο Hu) (Dalmau et al, 1990). Οι ασθενείς αυτοί ανέπτυσαν αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Hu, τα οποία διαπερνούσαν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οδηγούσαν σε νευροεκφυλισμό με αποτέλεσμα τον θάνατο του ασθενούς λόγω της νευρικής διαταραχής. Τα χαρακτηριστικά της παρανεοπλαστικής εγκεφαλομυελίτιδας υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες Hu μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι το γονίδιο της HuR στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19p13.2, ένα γονιδιακό τόπο ο οποίος έχει συσχετισθεί με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και άλλες μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε νεοπλασίες του εγκεφάλου (Ma & Furneaux, 1997) οδήγησε στην εκτεταμένη ανάλυση του ρόλου της HuR στην καρκινογένεση. Επίσης, μια εκτενής ανάλυση μικροσυστοιχιών από δείγματα φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με καρκίνο αποκάλυψε ότι η έκφραση της HuR ήταν αυξημένη σε όλους σχεδόν τους καρκινικούς ιστούς που μελετήθηκαν. Ιδιαίτερα, έρευνες που πραγματοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την αποσαφήνιση του ρόλου της πρωτεΐνης HuR στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα και των ωοθηκών, αναφέρουν μία συνεχή συσχέτιση των επιπέδων της έκφρασης της HuR με τα στάδια ανάπτυξης καθώς και την πρόγνωση αυτών των καρκινικών τύπων. (Blaxall et al, 2000; Denkert et al, 2004).

Επιπρόσθετα, η HuR αναγνωρίζει και σταθεροποιεί τα mRNAs ορισμένων παραγόντων που παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση όπως των COX-2 (Dixon et al, 2001), VEGF (Levy et al, 1998; Nabors et al, 2003), IL-8 (Dixon et al., 2001) και β-κατενίνης (Lopez de Silanes et al, 2003), των πρωτοογκογονιδίων c-myc (King, 2000), c-fos (Ma et al, 1996; Peng et al, 1998), c-yes (Sommer et al, 2005) και c-fms (Woo et al, 2009), των μορίων τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως

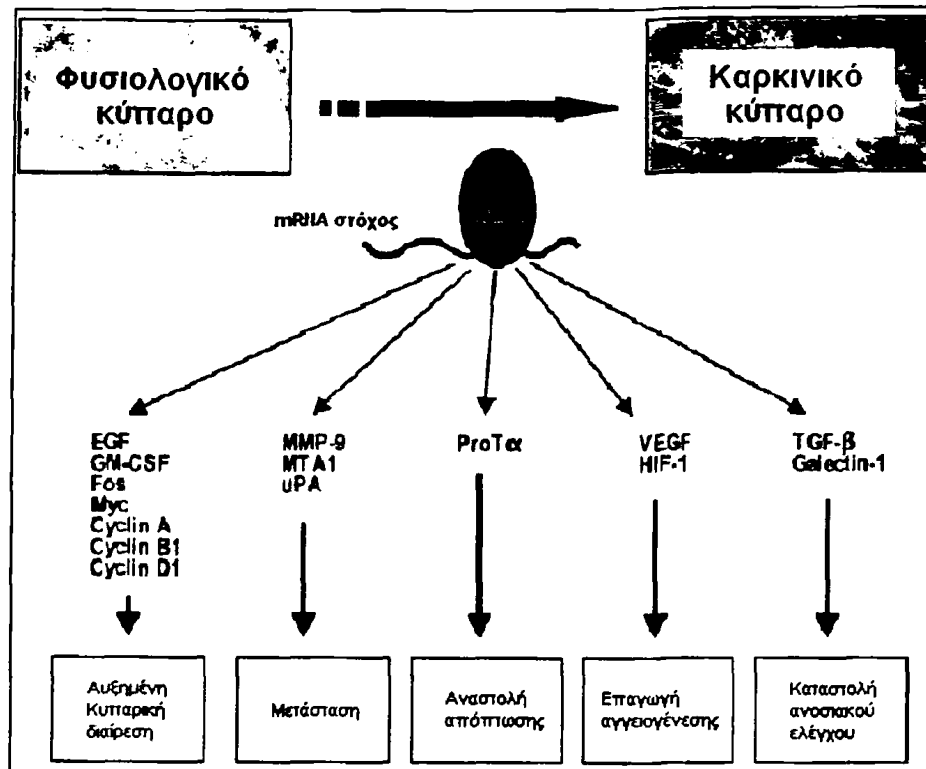


οι κυκλίνες A και B1 (Wang *et al*, 2000) και το p21 WAF1 (Giles *et al*, 2003) και του ογκοκατασταλτικού p53 (Galban *et al*, 2003; Mazan-Mameczarz *et al*, 2003).

Πρόσφατα, έχει περιγραφεί ότι η HuR πιθανώς να διαθέτει αντιαποπτωτικές ιδιότητες καθώς σταθεροποιεί τα mRNAs των αντιαποπτωτικών Bcl-2 και Mcl-1 σε κύτταρα HeLa (Abdelmohsen *et al*, 2007) και προκαλεί σταθεροποίηση του mRNA και αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης προθυμοσύνης A (proTa), η οποία εμπλέκεται στην απόπτωση με την πρωτεΐνη p8 και αναστέλλοντας στη συνέχεια τη δράση της κασπάσης (Malicet *et al*, 2006). Αυτή η ιδιότητα θα επέτρεπε στα καρκινικά κύτταρα να είναι ανθεκτικά σε αποπτωτικούς μηχανισμούς, προσδίδοντάς τους ένα ακόμα πλεονέκτημα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Επιπλέον, η HuR ενδεχομένως να προάγει τη διεσδυτική και τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων με τη σταθεροποίηση mRNAs-στόχων και την αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών όπως η μεταλλοπρωτεάση του εξωκυττάριου στρώματος MMP9 και η σχετιζόμενη με τη μετάσταση πρωτεΐνη 1 (metastasis-associated protein 1) (Lopez de Silanes *et al*, 2004).

Ένα ακόμα κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών όγκων είναι η αυξημένη αγγειογένεση. Η HuR φαίνεται να συμμετέχει και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης καθώς έχει δειχθεί ότι προσδένει τα mRNAs των HIF-1a και VEGF και αυξάνει την πρωτεϊνική τους έκφραση, με αποτέλεσμα να καλύπτονται οι ανάγκες των αναπτυσσόμενων όγκων για οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία (Levy, 1998; Sheflin *et al*, 2004). Τέλος, η HuR προκαλεί την αυξημένη έκφραση της ανοσοκατασταλτικής κυτταροκίνης TGFβ αλλά και του αναστολέα των T λεμφοκυττάρων galectin-1, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται το έργο του ανοσοποιητικού συστήματος στην αναγνώριση και την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, ιδιαίτερα όταν βρίσκονται σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης (Nabors *et al*, 2001). Στην εικόνα 25 απεικονίζονται διαγραμματικά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που αποκτά ένα κύτταρο όταν μετασχηματίζεται σε καρκινικό, καθώς και τα γονίδια που ενεργοποιούνται σε κάθε διαδικασία στα οποία η HuR φαίνεται να δρα ως κεντρικός ρυθμιστής.





Εικόνα 25. Διαγραμματική απεικόνιση των ομάδων των mRNAs τα οποία προσδένει η HuR και σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου. Η αυξημένη έκφραση των συγκεκριμένων μεταγράφων από τη HuR θεωρείται ότι συμμετέχει στο μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, προσδίδοντάς τους τα συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (de Silanes και Gorospe, 2004)

Όπως και στην περίπτωση της HuR, αντίστοιχα έχειδειχθεί ότι ο AUF1 είναι επίσης ένα σημαντικό μόριο που εμπλέκεται στις διαδικασίες της καρκινογένεσης. Άλλωστε αρκετοί στόχοι που σχετίζονται με την καρκινογένεση είναι κοινοί για αυτές τις δύο ARE-BPs. Συνεπώς, η απορρύθμιση του AUF1 επηρεάζει ποικιλοτρόπως την έκφραση ογκογονιδίων ή /και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν την p37 αναπτύσσουν σαρκώματα (Gouble et al, 2002) και οι όγκοι στους ποντικούς αυτούς εκφράζουν έντονα τη διαγονιδιακή πρωτεΐνη καθώς και την κυκλίνη D1. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο AUF1 είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας κλειδί για τη γονιδιακή έκφραση *in vivo* και ότι η απορρύθμισή του οδηγεί σε καρκινογένεση. Από την άλλη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω η προσταγλαδίνη A2 αποσταθεροποιεί την κυκλίνη D1 μέσω της δέσμευσης του AUF1 σε κύτταρα μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Lin et al, 2000). Ο διπλός αυτός ρόλος του AUF1 που είτε ευνοεί είτε εμποδίζει την καρκινογένεση συμφωνεί με αναφορές ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί είτε

να σταθεροποιήσει, είτε να αποσταθεροποιήσει mRNAs (Gouble et al, 2002; Wilson et al, 2003).

Επίσης, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έχει δειχθεί ότι το mRNA του c-Yes, του οποίου η έκφραση σχετίζεται με την επιθετικότητα των καρκίνων του στήθους και του κόλον στον άνθρωπο (Sommer et al, 2005) αποτελεί στόχος του AUF1. Επιπρόσθετα, το προϊόν του ογκογονιδίου MCT-1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη DENR/DRP, μεσολαβώντας στη ρύθμιση του μεταφραστικού προφίλ των mRNAs που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη του AUF1 προσδένεται στο mRNA του DENR/DRP και ότι η αποσιώπηση του γονιδίου του AUF1 σε πειράματα διαμόλυνσης με shRNA φορέων κλωνοποίησης, αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του DENR/DRP (Mazan-Mamczarz & Gartenhaus, 2007). Μάλιστα, όχι μόνο η έκφραση αλλά και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης του AUF1 έχουν συσχετιστεί με καρκινοσυσχετιζόμενα μοριακά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, ότι η πρωτεΐνη AUF1 συνεντοπίζεται κυτταροπλασματικά με την πρωτεΐνη NPM-ALK, η οποία είναι μία κινάση με υψηλά επίπεδα έκφρασης σε μια υποκατηγορία αναπλαστικών μεγαλοκυτταρικών λεμφωμάτων (Fawal et al, 2006). Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε επίσης, ότι η πρωτεΐνη AUF1 υπερφωσφορυλιώνεται από την κινάση NPM-ALK και η υπερφωσφορυλίωση αυτή σχετίστηκε με τη σταθεροποίηση αρκετών mRNA στόχων του AUF1 που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συμπερασματικά, ο συσχετισμός της HuR και του AUF1 με τον καρκίνο είναι εμφανής, συνεπώς εγείρεται το ερώτημα αν η απορρύθμιση αυτών των δύο ARE-BPs θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα για την καρκινική εξαλλαγή και αν ναι πως μεταβάλλεται η έκφρασή τους κατά την καρκινογένεση.



1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες HuR και AUF1 αποτελούν δύο μεταμεταγραφικούς ρυθμιστές γονιδιακής έκφρασης, που σχετίζονται με την ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων και καρκινωμάτων του πνεύμονα. Κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η *in vivo* λειτουργική ανάλυση της ριβονουκλεοπρωτεΐνης HuR, κατά κύριο λόγο, και του AUF1 σε δεύτερη φάση με σκοπό την αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου τους:

- Στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία του πνεύμονα
- Στην παθολογία και στο μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου

Μεθοδολογικά, η μελέτη αυτή συνίσταται : (α) στην ανάπτυξη διαγονιδιακών συστημάτων για την επιλεκτική απαλοιφή των μετά-μεταγραφικών αυτών παραγόντων καθολικά ή/και σε επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, (β) στην κυτταρολογική, μοριακή και βιοχημική ανάλυση της απάντησης του πνευμονικού επιθηλιακού ιστού σε καρκινικά ερεθίσματα *in vivo*, απουσία των παραγόντων αυτών, και (γ) τη μερική ταυτοποίηση των mRNAs και των καρκινοσχετιζόμενων παραγόντων που επηρεάζονται από την απαλοιφή μετα-μεταγραφικών παραγόντων σε φυσιολογικό και καρκινικό πνευμονικό επιθήλιο.



2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Γενικά χημικά και αντιδραστήρια

2.1.1 Ειδικά ένζυμα – Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας.

Περιγραφή	Προμηθευτής
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	New england Biolabs
Ταq πολυμεράση	MBI
MM-LV αντίστροφη μεταγραφάση	Promega
dNTPs	NEB
Πρωτεΐνάση K	Roche
RNase A-RNase T1	Sigma
RNase A	Sigma
Rnase free-DNAse	Promega
DNA Phenol (φαινόλη)	Sigma
DNA Chloroform (χλωροφόρμιο)	Sigma
Αγαρόζη	Invitrogen
SYBR Green	Invitrogen
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Cell death detection kit	Roche
AP-converter	Roche
Fast Blue substrate	Sigma
DAB	Sigma

2.1.2 Θρεπτικά μέσα – Αντιδραστήρια κυτταροκαλλιέργειας.

Περιγραφή	Προμηθευτής
Γλουταμίνη	Invitrogen
Fetal Bovine Serum	Gibco
Trypsin/EDTA	Invitrogen
2-Μερκαπτοαιθανόλη	Sigma
DMSO	Sigma
DMEM	Gibco
DMEM F12	
Recombinant FGF10	Peprotech



Matrigel	BD
----------	----

2.1.3 Ειδικά πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.

Περιγραφή	Προμηθευτής
Τρυβλία Petri	CORNING
Κωνικοί σωλήνες	FALCON/B&D
Πλάκες 96 φρεατίων	CORNING
Πιπέτες	CORNING
Ειδικά ακρορύγχια	EPPENDORF
Σωληνάκια χωρητικότητας 1,5mL	EPPENDORF
Σωληνάκια χωρητικότητας 0,5mL	EPPENDORF

2.1.4 Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

Περιγραφή	Προμηθευτής
Φυγόκεντροι	EPPENDORF
Συσκευές ηλεκτροφόρησης	BIORAD
Επωαστικοί κλίβανοι κυτταροκαλλιέργειας (CO ₂)	NAPCO
UV transilluminator. Gel documentation system.	GDS 8000-UVP-UK
Θερμικός κυκλοποιητής	BIORAD
Συσκευή στυπώματος (Western)	BIORAD
Φωτόμετρο πλακών 96 φρεατίων	MRX. DYNATECH
Μικροσκόπια	NIKON
Semi-dry blotter	BIORAD
Phosphoimager STORM860	Molecular Dynamics
Coulter	NIKON
FACS Canto II™	BD biosciences
FACS Vantage SE™	BD biosciences
Rotor Gene 6000	Corbett



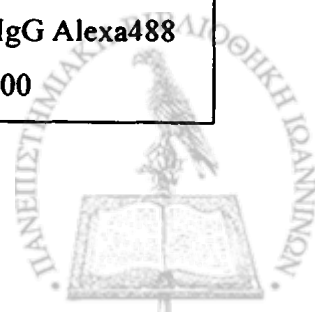
2.1.5 Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοστύπωση Western και οι αραιώσεις τους

Πρωτεΐνες	1 ^ο αντίσωμα	2 ^ο αντίσωμα
HuR	Mouse IgG1 (Santa Cruz - 3A2), 1:1000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-mouse IgG1 (Southern Biot.), HRP conjugated σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
pP38	Rabbit IgG (Cell Signaling – Thr180/182), αραιώση 1:1000 σε διάλυμα TBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-rabbit IgG (Santa Cruz), HRP conjugated σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
P38	Rabbit IgG (Santa Cruz – H147), σε αραιώση 1:500 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-rabbit IgG (Santa Cruz), HRP conjugated σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
pERK	Mouse IgG2a (Santa Cruz), σε αραιώση 1:500 σε διάλυμα TBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-mouse IgG (Southern Biot.), HRP conjugated σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
ERK	Goat IgG (Santa Cruz), 1:500 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Horse, anti-goat IgG (Vector), HRP conjugated σε αραιώση 1:1000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
Actin	Goat IgG (Santa Cruz), σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Horse, anti-goat IgG (Vector), HRP conjugated σε αραιώση 1:1000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
AUF1	Rabbit IgG anti-human (Upstate) αραιώση 1:1000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-rabbit IgG (Santa Cruz), HRP conjugated σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA



2.1.6 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημία:

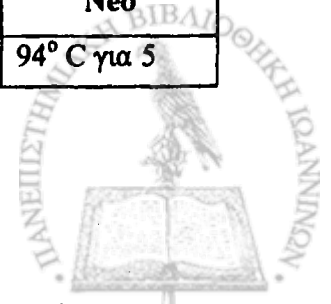
Πρωτεΐνες	1 ^ο αντίσωμα	2 ^ο αντίσωμα
HuR	Mouse anti-human IgG1 (Santa Cruz - 3A2) αραιώση 1:100	a) Goat, anti-mouse IgG1 (Southern Biot.), HRP conjugated σε αραιώση 1:1000 b) Goat, anti-mouse IgG (Southern Biot.) Alexa555 σε αραιώση 1:1000
HuR	Mouse anti-human IgG1 (Santa Cruz - 3A2) biotin conjugated αραιώση 1:100	Streptavidin Vecta stain ABC kit
b-catenin	Goat anti-human IgG (Santa Cruz) αραιώση: 1:100	Rabbit anti- goat IgG (Southern Bio.) HRP conjugated σε αραιώση 1:1000
CC10	Goat anti-mouse IgG (Santa Cruz) αραιώση: 1:100	Rabbit anti- goat IgG (Southern Bio.) HRP conjugated σε αραιώση 1:1000
pERK	Mouse anti-human IgG2a (Santa Cruz), σε αραιώση 1:100	Goat, anti-mouse IgG (Southern Bio.) FITC conjugated σε αραιώση 1:1000
pSMAD1/5/8	Rabbit IgG anti-human (Santa Cruz), σε αραιώση 1:100	Goat anti-rabbit (Southern Bio.) IgG biotin conjugated σε αραιώση 1:1000 και στη συνέχεια Streptavidin Vecta stain ABC kit
p-histoneH3	Rabbit IgG anti-human (Santa Cruz), σε αραιώση 1:100	Goat anti-rabbit (Southern Bio.) FITC conjugated σε αραιώση 1:1000
SpC	Rabbit IgG anti-mouse (Upstate) σε αραιώση 1:500	a) Goat anti-rabbit (Southern Bio.) IgG HRPconjugated σε αραιώση 1:1000 b) Goat anti-rabbit IgG Alexa488 σε αραιώση 1:1000



		c) Goat anti-rabbit IgG Alexa555 σε αραιώση 1:1000
T1a	Syrian hamster IgG anti-mouse (Hybridoma Bank) σε αραιώση 1:100	anti-hamster HRP
Sma	Mouse IgG2a anti-human (Sigma) σε αραιώση 1:500	Goat, anti-mouse IgG (Southern Bio.) FITC conjugated σε αραιώση 1:1000
BrdU	Mouse IgG1, universal (Dako- Cytomation) σε αραιώση 1:100	c) Goat, anti-mouse IgG1 (Southern Biot.), HRP conjugated σε αραιώση 1:1000

2.1.7 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-PCR:

Υλικά	1x PCR buffer 1 mM MgCl 2.5 mM dNTPs mixture 0.5-2 μM primer set ddH ₂ O 1-5 units Taq polymerase			
	I) Ανίχνευση της ύπαρξης TRE Cre αλληλίου	II) Ανίχνευση της ύπαρξης SPCrTA αλληλίου	III) Ανίχνευση της ύπαρξης SftrcCre αλληλίου	IV) Ανίχνευση όλων των γεγονότων ανασυνδιασμού
Εκκινητές	sense: 5'- ATTACCGGTC GATGCAACGA GT-3' antis: 5'- CAGGTATCTC TGACCAGAGT CA-3'	sense: 5' - GACACATATA AGACCCTGGT CA-3' antis: 5'- AAAATCTTGC CAGCTTCCC C-3'	sense: 5'- TTCGGCTATA CGTAACAGGG - 3' antis:5'- TCGATGCAAC GAGTGATGAG -3'	sense:5'- GTTCATGG CTCCCCATA TC-3' antis:5'- TGTCCATCT GCACGAGAC TA-3' antis:5'- TGGCACTCA CTGAACTGG AA-3'
Πρόγραμμα	Neo	rTA	SCRE	Neo
	94° C για 5	94° C για 2	96° C για 5	94° C για 5



	λεπτά 94° C για 1 λεπτό 57° C για 1 λεπτό 72° C για 1 λεπτό 5 επαναλήψεις 94° C για 10 δεύτερα 55° C για 40 δεύτερα 72° C για 1 λεπτό και 30 δεύτερα 25 επαναλήψεις 72° C για 10 λεπτά 16° C για 5 λεπτά Τέλος	λεπτά 94° C για 0,5 λεπτό 58° C για 0,5 λεπτό 72° C για 0,5 λεπτό 29 επαναλήψεις 72° C για 2 λεπτά 16° C για 10 λεπτά Τέλος	λεπτά 94° C για 1 λεπτό 55° C για 0,5 λεπτό 72° C για 1 λεπτό 30 επαναλήψεις 72° C για 4 λεπτά 16° C για 10 λεπτά Τέλος	λεπτά 94° C για 1 λεπτό 57° C για 1 λεπτό 72° C για 1 λεπτό 5 επαναλήψεις 94° C για 10 δεύτερα 55° C για 40 δεύτερα 72° C για 1 λεπτό και 30 δεύτερα 25 επαναλήψεις 72° C για 10 λεπτά 16° C για 5 λεπτά Τέλος
Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων	550 bps	800 bps	500 bps	Φυσικού τύπου: 1122 bps flox: 1234 bps Πλήρους απαλοιφής (-) : 459 bps <u>Παρουσία neo:</u> flox: 549 bps Πλήρους απαλοιφής (-): 485 bps
Διαχωρισμός προϊόντων	Σε πηκτή αγαρόζης 1,5% *	Σε πηκτή αγαρόζης 1,5% *	Σε πηκτή αγαρόζης 1,5% *	Σε πηκτή αγαρόζης 4% *



2.1.8 Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική ανάλυση των μεταγραφμάτων με Real-Time PCR

Γονίδια	Αλληλουχία Εκκινήτη (5'-3')	*Συνθήκη Υβριδισμού (°C)	Μήκος (bp)
<i>FGF10</i>	S: GGAAGGCATGTGCGGAGCTA	58	195
	AS: GCTGTTGATGGCTTTGACGG		
<i>TBX4</i>	S: TGCCCCCTCAACACCTTCCCA-3	59	210
	AS: TGGGGGTACCTCACTGCAA		
<i>Shh</i>	S: TCAGAGGTGCAAAGACAAGT		
	AS:GTGGATGTGAGCTTTGGATT		
<i>Pitch1</i>	S: ATCTCGAGACCAACGTGGAG	59	145
	AS: TTAGCGCCTTCTTCTTTTGG		
<i>TTF1</i>	S: CTGAAGCCGAAGTATCCAGG	59	149
	AS: CTCCATGCCCACTTTCTTGT		
<i>Myc</i>	S: CTCCATGCCCACTTTCTTGT	59	125
	AS: ACGGAGTCGTAGTCGAGGTC		
<i>B2M</i>	S: TTXTGGTGCTTGTCTCACTGA	58	150
	AS:CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC		
<i>L32</i>	S: TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC	60	135
	AS:TTGTTGCTCCCATTAACCGATG		

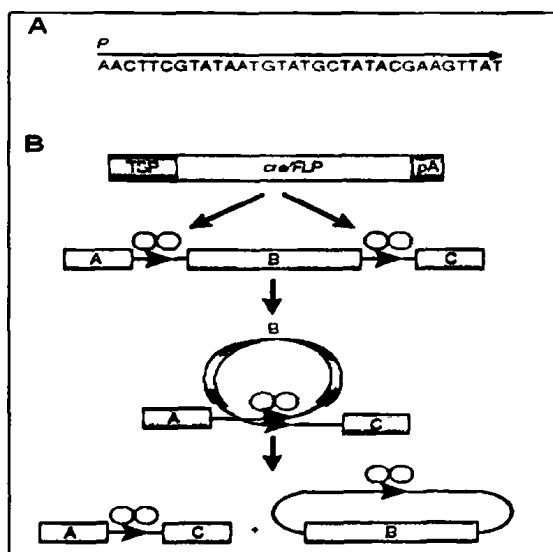
2.2 Καινοτόμες διαγονιδιακές τεχνολογίες και πειραματικά πρότυπα για την ανάλυση γονιδίων

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της μοριακής βιολογίας για τη μελέτη διαφόρων πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών αποδεικνύεται η ανάπτυξη διαγονιδιακών συστημάτων 3rd γενιάς, στα οποία επιτρέπεται η γονιδιακή τροποποίηση σε ιστοειδικό ή/και χρονικά καθορισμένο πλαίσιο (συστήματα επιλεκτικής γονιδιακής τροποποίησης-conditional transgenics). Η τεχνολογία της επιλεκτικής γονιδιακής τροποποίησης (conditional gene targeting), χρησιμοποιεί ειδικά ανασυνδυαστικά ένζυμα (recombinases), τα οποία επιτρέπουν τον επιλεκτικό ανασυνδυασμό ενός γενετικού τόπου με σκοπό την απενεργοποίηση ή την ενεργοποίηση ενός γονιδίου σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά



στάδια ενός οργανισμού. Στο πιο επιτυχημένο από τα συστήματα αυτά χρησιμοποιείται το ανασυνδυαστικό ένζυμο *Cre* (*Cre*=Causes recombination) του βακτηριοφάγου P1. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να αφαιρεί από το γονιδίωμα οποιοδήποτε τμήμα του γενετικού υλικού περιέχεται μεταξύ δύο συγκεκριμένων παλίνδρομων αλληλουχιών, μήκους 34 βάσεων, τις οποίες αναγνωρίζει και ονομάζονται σημεία loxP (locus of crossing over-x- from P1). Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες αυτού του μήκους είναι σχεδόν απίθανο να βρεθούν τυχαία στο γονιδίωμα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών και δεδομένου ότι η μόνη προϋπόθεση για την αντίδραση του ανασυνδυασμού είναι η παρουσία της ρεκομβινάσης, το ένζυμο αυτό αποτελεί το πιο κατάλληλο σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού για εφαρμογή σε οποιοδήποτε ανώτερο ευκαρυωτικό είδος (Εικόνα 1)

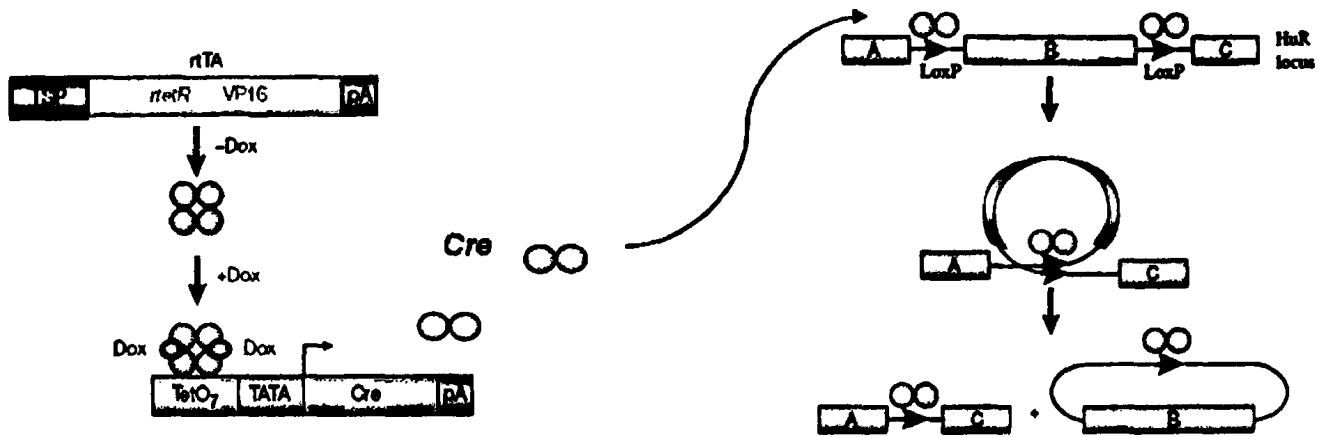
Εναλλακτικά, και στις περιπτώσεις όπου απαιτείται ο χρονικός καθορισμός του ανασυνδυασμού, το σύστημα *Cre/loxP* μπορεί να συνδυαστεί με συστήματα διενεργοποιητών Τετρακυκλίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο υποκινητής έκφρασης της *Cre* μπορεί να είναι καθολικός και πρέπει να περιλαμβάνει αλληλουχίες χειρισμού του διενεργοποιητή (Tet operator sequences/Tet responsive element, TRE). Η ιστοειδικότητα της έκφρασης προκύπτει από την έκφραση ενός διαγονιδίου διενεργοποιητή reverse Tetracycline transactivator (rtTA) υπό τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή.



Εικόνα 1 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης του ευκαρυωτικού γονιδιώματος με τοποειδικό ανασυνδυασμό-*Cre/loxP* σύστημα. (A) Η αλληλουχία loxP η οποία έχει συνολικό μήκος 34bp και αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13bp η καθεμία (μαύρο), οι οποίες χωρίζονται από μια κεντρική αλληλουχία 8bp (κόκκινο) στην οποία γίνεται το

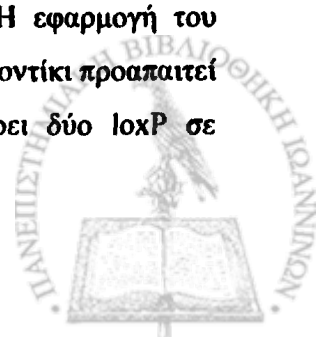


κόψιμο και η ανταλλαγή των αλυσίδων του DNA. (B) Διμερή του μορίου Cre (ροζ) καταλύουν *in cis* τον ανασυνδυασμό του τμήματος που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες loxP (κόκκινες κεφαλές βέλους), δημιουργώντας μια ενδιάμεση δομή Holliday και καταλήγοντας στην αποκοπή της περιοχής B. Εάν η περιοχή αυτή είναι σημαντική για την έκφραση του γονιδίου, τότε ο ανασυνδυασμός θα έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του γονιδίου. (TSP, ιστοειδικός υποκινητής; pA, θέση πολυαδενυλίωσης) (Lewandoski, 2001).

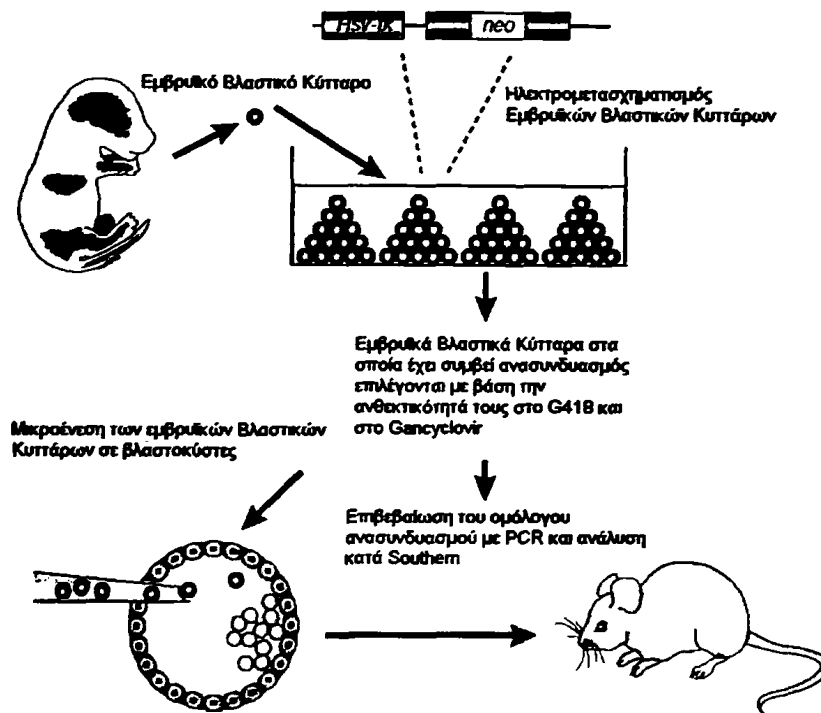


Εικόνα 2. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης του ευκαρυωτικού γονιδιώματος με χρονικό και τοποειδικό ανασυνδυασμό- Παραλλαγή του συστήματος Cre/loxP. Παρουσία αναλόγων τετρακυκλίνης (δοξυκυκλίνη-Dox) το τετραμερές μόριο του διενεργοποιητή pTA (κίτρινο και μωβ χρώμα) αλλάζει στερεοδιαμόρφωση και μπορεί και προσδέεται στις αλληλουχίες του χειριστή T_{et}O₇ που βρίσκεται ανοδικά του Cre διαγονιδίου. Η πρόσδεση αυτή επάγει την έκφραση της Cre και τα διμερή του μορίου Cre (ροζ χρώμα) *in cis* τον ανασυνδυασμό του τμήματος που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες loxP (κόκκινες κεφαλές βέλους) όπως περιγράφεται στην εικόνα 1.

Η τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ES cells), τα οποία διατηρούν την ολοδυναμικότητά τους μετά από εκτεταμένο χειρισμό *in vitro* και μπορούν στη συνέχεια να δώσουν γένεση σε ολόκληρο τον οργανισμό, έχει επιτρέψει τη σύζευξη της *in vitro* και *in vivo* εφαρμογής του συστήματος Cre/loxP. Θεωρητικά, οποιαδήποτε γονιδιακή τροποποίηση μπορεί να επιτευχθεί σε ES κύτταρα *in vitro*, είναι δυνατό να μεταφερθεί και *in vivo*. Η εφαρμογή του συστήματος Cre/loxP στην επιλεκτική γονιδιακή τροποποίηση στο ποντίκι προαπαιτεί τη δημιουργία δύο σειρών ποντικών: μιας σειράς η οποία φέρει δύο loxP σε



προκαθορισμένες θέσεις ενός γονιδίου, και μιας δεύτερης σειράς ποντικών, η οποία εκφράζει την Cre σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια. Το επιλεκτικό σύστημα προκύπτει με τη διασταύρωση των δύο αυτών σειρών ποντικών, έτσι ώστε η τροποποίηση του τμήματος DNA που φέρει τα loxP, να περιορίζεται στους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια, σύμφωνα με την ειδικότητα της έκφρασης της Cre (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η κλασική πειραματική προσέγγιση της γονιδιακής στόχευσης στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Ο πλασμιδιακός φορέας στόχευσης περιλαμβάνει τα γονίδια *neoR* (ακετυλοτρανσφεράσης της νεομυκίνης) και *Hsv-tk* (κινάσης της θυμιδίνης από τον ιό απλού έρπητα) για την εφαρμογή ενός προγράμματος αρνητικής και θετικής επιλογής στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES). Στη συνέχεια καλλιέργειες εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων επιμολύνονται με τον πλασμιδιακό φορέα στόχευσης και εάν έχει συμβεί ομόλογος ανασυνδυασμός μόνο το τμήμα του γονιδίου υπό μελέτη και το γονίδιο *neo* ενσωματώνονται στο χρωμοσωμικό DNA των ES κυττάρων. Επιλογή με το φάρμακο G418, παρόμοιο του αντιβιοτικού νεομυκίνη, θανατώνει τα κύτταρα στα οποία δεν έχει συμβεί ομόλογος ανασυνδυασμός, ενώ επιλογή με *gancyclovir* θανατώνει τα κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί τυχαία ο πλασμιδιακός φορέας. Τα ανασυνδυασμένα ES κύτταρα μεταφέρονται σε βλαστοκύστες οι οποίες εμφυτεύονται σε ψευδοέγκυους θηλυκούς ποντικούς.

2.2.1 Εφαρμογή της τεχνολογίας επιλεκτικής γονιδιακής τροποποίησης στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής

HuR

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και ανάλογα με τον υπό μελέτη ιστό, οι ποντικοί που φέρουν στο γονιδίωμά τους το τροποποιημένο αλληλίο για τη $HuR^{lox/lox}$, διασταυρώνονται με διαφορετικούς ποντικούς που εκφράζουν τη ρεκομβινάση Cre υπό τον έλεγχο του αντίστοιχου υποκινητή. Το τροποποιημένο αλληλίο της HuR, φέρει δύο LoxP αλληλουχίες, εκατέρωθεν του εξωνίου 2, το οποίο περιέχει το κωδικόνιο έναρξης για τη σύνθεση της πρωτεΐνης HuR. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι η απαλοιφή του από το γονιδίωμα εμποδίζει ολοκληρωτικά την παρουσία της HuR.

Για την απαλοιφή της HuR μόνο από τις εμβρυϊκές και όχι τις εξωεμβρυϊκές δομές, διασταυρώθηκαν θηλυκοί ποντικοί με το τροποποιημένο γονίδιο της HuR και αρσενικοί Sox2-Cre ποντικοί, στους οποίους η ρεκομβινάση Cre παράγεται μόνο στα κύτταρα που δίνουν γένεση στο έμβρυο και στα εμβρυϊκά αγγεία του πλακούντα.

Για την απαλοιφή της HuR μόνο από το πνευμονικό επιθήλιο εφαρμόσαμε δύο διαφορετικές στρατηγικές. Στη μία περίπτωση χρησιμοποιήσαμε το σύστημα χρονικού και ιστοειδικού ανασυνδυασμού πTA-TRE-Cre/LoxP. Σύμφωνα με την παραπάνω στρατηγική, χρησιμοποιούμε 3 διαγονιδιακά αλληλόμορφα. Το πρώτο έχει προκύψει από την γονιδιακή στόχευση του γονιδίου *Elavl1/HuR* – αλληλίο *Elavl1^{lox}*. Το δεύτερο διαγονιδιακό σύστημα, προέκυψε από την προσθήκη ιικών διαγονιδίων της CRE υπό τον έλεγχο ενός ελάχιστου ιικού υποκινητή (Cytomegalovirus minimal promoter), ο οποίος περιλαμβάνει στοιχεία απόκρισης του διενεργοποιητή τετρακυκλίνης (διαγονιδιακό αλληλίο *TRECre*). Τέλος, το τρίτο διαγονιδιακό σύστημα περιλαμβάνει τη διαγονιδιακή προσθήκη του βακτηριακού διενεργοποιητή πTA υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης Surfactant Protein C-SPC (διαγονιδιακό αλληλίο *SPC-rtTA*). Το γονίδιο της SPC εκφράζεται αποκλειστικά στο επιθήλιο του πνεύμονα κατά την ανάπτυξη (μέγιστη έκφραση την 9^η εμβρυϊκή μέρα) και η πρωτεΐνη SPC εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II του πνεύμονα. Τα διαγονιδιακά αλληλία συνυπάρχουν, μετά από τις διασταυρώσεις ποντικών με γονότυπους *SPCrtTA⁺*, *TRECre⁺* και *Elavl1/HuR^{lox/lox}* σε μικτό γενετικό υπόστρωμα ποντικών C57Bl/6.129Ola, για την δημιουργία των τριπλών διαγονιδιακών συστημάτων *SPCrtTA⁺TRECre⁺Elavl1/HuR^{lox/lox}* (*SPCrtTA⁺HuR^{fl/fl}* για απλούστευση). Για την απαλοιφή της HuR σε



αυτό το σύστημα, χορηγήθηκε δοξυκυκλίνη στην ξηρά τροφή των ποντικών *SRC HuR^{fllox/fllox}* από την πρώτη ημέρα της κύησης [E1.0] έως και την 25 ημέρα μετά τη γέννηση [P25].

Παράλληλα, αναπτύξαμε άλλο ένα διαγονιδιακό σύστημα ιστοειδικής απαλοιφής της HuR στο επιθήλιο του πνεύμονα, βασιζόμενοι στο σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP, χωρίς όμως να απαιτείται το σύστημα διενεργοποιητών Τετρακυκλίνης. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιούμε δύο διαγονιδιακά αλληλόμορφα. Το πρώτο, όπως έχει προαναφερθεί έχει προκύψει από την γονιδιακή στόχευση του γονιδίου *Elavl1/HuR* του ποντικού για την τοποθέτηση των αλληλουχιών loxP εκατέρωθεν του εξωνίου 2 του γονιδίου της HuR (αλληλίο *HuR/Elavl1^{fllox}*). Το δεύτερο διαγονιδιακό σύστημα, προέκυψε από την προσθήκη τροποποιημένου ιικού διαγονιδίου της CRE υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης Surfactant Protein C-SPC (διαγονιδιακό αλληλίο *Sftpc-Cre*). Τα διαγονιδιακά αλληλία συνυπάρχουν, μετά από τις διασταυρώσεις ποντικών με γονότυπους *SPC-Cre⁺* και *Elavl1/HuR^{fllox/fllox}* σε γενετικό υπόστρωμα ποντικών C57Bl/6, για τη δημιουργία των διπλών διαγονιδιακών συστημάτων *SPC-Cre⁺ Elavl1/HuR^{fllox/fllox}* (*Scre⁺ HuR^{fllox/fllox}*, για απλούστευση)

hnRNP/D/AUF1

Στην περίπτωση του γονιδίου *hnRNP/D/AUF1* αποφασίσαμε να απενεργοποιήσουμε την λειτουργία όλων των ισομορφών του, αφαιρώντας την ικανότητα πρόσδεσης στα RNAs που προσδέουν. Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας της γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού, ενσωματώθηκαν LoxP αλληλουχίες εκατέρωθεν των εξωνίων 3 & 4 του γονιδωματικού τύπου *hnRNP/D* (αλληλίο *hnRNP/D^{RRMfllox}*) του ποντικού, τα οποία κωδικοποιούν τα μοτίβα RRM όλων των ισομορφών. Η διαδικασία της γονιδιακής στόχευσης πραγματοποιήθηκε από τη Regeneron.

Οι ποντικοί με το τροποποιημένο αλληλίο *hnRNP/D^{RRMfllox}* διασταυρώθηκαν με ποντικούς *deleter-cre*, στους οποίους η ανασυνδυάση *cre* εκφράζεται στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, και προέκυψαν ετερόζυγοι ποντικοί με το μεταλλαγμένο αλληλίο *hnRNP/D^{ARRM}*, στο οποίο απουσιάζουν τα εξώνια 3 και 4. Οι ετερόζυγοι ποντικοί αναδιασταυρώθηκαν μεταξύ τους και προέκυψαν ομόζυγοι ποντικοί *hnRNP/D^{ARRM/ARRM}*.



Η ανάπτυξη και διατήρηση των ποντικών πραγματοποιήθηκε στις ειδικές εγκαταστάσεις της μονάδας πειραματόζωων του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» σύμφωνα με τους κανονισμούς της μονάδας.

2.3 Πειραματικές μέθοδοι

2.3.1 Ανάλυση γονοτύπου

Η αναγνώριση των διαγονιδιακών ποντικών *SRC HuR^{flax/flax}* και *Scrc⁺ HuR^{flax/flax}* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας γονιδιωματικό DNA που έχει απομονωθεί από τμήμα ουράς ποντικού. Για την βιοψία ουράς χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί ηλικίας 10-15 ημερών, γιατί σε αυτή την ηλικία η επέμβαση είναι φαινομενικά ανώδυνη και χωρίς επιπτώσεις στην φυσιολογική διαβίωση των ποντικών.

Διαδικασία

1. 10 ημέρες μετά την γέννηση τα ποντίκια σηματοδοτήθηκαν και από την άκρη της ουράς κόπηκε 0.5-1 cm όπου προστέθηκαν 0.5 ml διαλύματος TENS και 5 μls πρωτεΐνάση K. Στην συνέχεια τα δείγματα αναμίχθηκαν ελαφρώς με ανακίνηση και επώαστηκαν για μία ημέρα σε υδατόλουτρο των 55°C.
2. Την επόμενη ημέρα προστέθηκε 1μl RNase A (10mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 37° C.
3. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 500 μls από την DNA-Rphenol και αφού αναδεύτηκαν ισχυρά για 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 13 krpm μέγιστη ταχύτητα. Εν συνεχεία αφαιρέθηκαν περίπου 500 μls από την επάνω υδατική φάση με κομμένα ακρορύγχια (tips), για να αποφευχθεί η θραύση του γενομικού DNA. Χωρίς να υπάρξει επαφή με την μεσαία φάση, μεταφέρθηκαν σε καινούργια erpendorf tube.
4. Έπειτα έγινε εκχύλιση με διάλυμα χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1. Προστέθηκαν 350 μls από χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 σε κάθε tube, προκειμένου να αφαιρεθούν τα οποιαδήποτε ίχνη φαινόλης. Αναδεύτηκαν ισχυρά για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στη μικροφυγόκεντρο, με μέγιστη ταχύτητα τα 13 krpm.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα tubes και προχωρώντας με 1 tube την φορά προσθέσαμε 0.6 vol ισοπροπανόλη. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά μέχρι να σχηματιστεί μια ορατή λευκή μάζα, το DNA, ώστε ήταν δυνατή η απομόνωση με πιπέτες παστέρ.



6. Η πιπέτα με το DNA εμβαπτίστηκε σε 100% αιθανόλη για περαιτέρω συμπύκνωση και μετά εμβαπτίστηκε 2-3 φορές σε 70% αιθανόλη προκειμένου να πλυθεί και αφέθηκε να στεγνώσει. Έπειτα η πιπέτα με το DNA τοποθετήθηκε σε καθαρά eppendorf tubes, που περιέχουν 50-100 μ ls ddH₂O, αφέθηκε να διαλυθεί το DNA στο νερό για περίπου 15 λεπτά, και η πιπέτα ανακατεύθηκε προκειμένου να ελευθερωθεί όλο το DNA.

7. Μετά την διαλυτοποίηση του (30 λεπτά στους 37° C ή όλο το βράδυ στους 4° C), υπολογίστηκε τη συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα, με φωτομέτρηση στα 260 nm και το DNA αποθηκεύτηκε στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.3.2 Απομόνωση πνευμόνων.

Για τη συλλογή εμβρυικών πνευμόνων πραγματοποιήθηκαν προγραμματισμένες διασταυρώσεις θηλυκών ποντικών με αρσενικούς. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε ενδοκολπικός έλεγχος για την επιβεβαίωση της γονιμοποίησης (plug checking), και η μέρα αυτή ορίζεται ως 0,5. Τα έμβρυα συλλέχθηκαν κατά τις επιθυμητές ηλικίες, αφού θανατώθηκαν οι έγκυες θηλυκές, σύμφωνα με πρότυπα πρωτόκολλα ανατομίας.

Αντίστοιχα, συλλέχθηκαν πνεύμονες από ενήλικες ποντικούς ηλικίας ενός, τεσσάρων, δέκα και δεκαπέντε μηνών. Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο ή τμηματικά στις πειραματικές διαδικασίες απομόνωσης DNA, RNA, πρωτεϊνών καθώς και για τις ανοσοϊστοχημικές και ιστοπαθολογικές αναλύσεις

2.3.2.1 Ιστολογία και ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε τομές παραφίνης.

Οι πνεύμονες που συλλέχθηκαν από ενήλικες ποντικούς ή από έμβρυα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% για 24 ώρες. Στη συνέχεια αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά διαβαθμισμένα διαλύματα αιθανόλης και εμβαπτίστηκαν σε παραφίνη. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 4 ή 7 μ m. Οι τομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν στα πρωτόκολλα ιστολογίας και ανοσοϊστοχημείας.

Εναλλακτικά, τα δείγματα που συλλέχθηκαν εμβαπτίστηκαν απευθείας στην ουσία κρυσταλλισμού OCT (Tissue-Tec) και πραγματοποιήθηκαν τομές κρυστάτη πάχους 7 μ m.



Πρότυπο πρωτόκολλο χρώσης αιματοξυλίνης/εωσίνης – Ιστολογία

1. Οι τομές παραφίνης ενυδατώθηκαν ως εξής:
 - 2 x 5' διάλυμα ξυλόλης
 - 2' σε κάθε διάλυμα αιθανόλης 100%, 95%, 70%, 50% και 5' σε dH₂O.
2. Εμποτισμός σε αιματοξυλίνη 2'
3. Ξέπλυμα με H₂O
4. Εμποτισμός σε διάλυμα Scotch 5'
5. Ξέπλυμα με H₂O
6. Εμποτισμός σε εωσίνη 4'
7. Ξέπλυμα με H₂O
8. Αφυδάτωση μέχρι το διάλυμα της ξυλόλης
9. Επικάλυψη με DPX

Πρότυπο πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

1. Επώαση των τομών στους 60° C για 30'
2. Ενυδάτωση όπως περιγράφεται παραπάνω
3. Διαδικασία αποκάλυψης του επιτόπου:
 - 10' επώαση σε διάλυμα Citrate 10mM, pH 6 στους 95° C σε μικροκύματα
4. Αναμονή για 20'
5. 3 x 5' πλυσίματα με PBS
6. Απενεργοποίηση ενδογενών υπεροξειδασών (στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται αντίσωμα συζευγμένο με HRP και υπόστρωμα DAB)
7. 3 x 5' ξέπλυμα με PBS
8. Επικάλυψη για 1 ώρα με διάλυμα PBS, 1% BSA, 3% πρωτεΐνη ορού, 0,05% Tween, (Blocking diluent)
9. Επώαση με το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος (PBS, 1% BSA 0,05%, Tween 0,05% + αντίσωμα) για >8 ώρες, στους 4° C.
10. 3 x 5' ξέπλυμα με PBS
11. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου
12. 3 x 5' ξέπλυμα με PBS
13. Εμφάνιση
14. Ξέπλυμα με dH₂O
15. Αντίχρωση (με αιματοξυλίνη στην περίπτωση χρώσης με DAB)
16. Σταδιακή αφυδάτωση



17.Επικάλυψη

2.3.2.2 Απομόνωση RNA με Trizol.

1. Προσθήκη 500μl-1mL Trizol στο απομονωθέν πειραματικό υλικό (τμήμα ή ολόκληρος ιστός,).
2. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε μηχανικά και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Στο μίγμα προστέθηκαν 100-200μl χλωροφόρμιο, έγινε ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 με 3 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12000g στους 4° C
4. Απομονώθηκε το υπερκείμενο και σε αυτό προστέθηκαν 250μl ισοπροπανόλη και επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 12000g στους 4° C, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml 75% αιθανόλης αραιωμένη σε DEPC νερό.
6. Έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 7500g στους 4° C και αραιώθηκαν σε νερό DEPC.

2.3.2.2.1 Ποσοτική ανάλυση μεταγραφημάτων RNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).

Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση RT (reverse transcriptase) έχει την ικανότητα να συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA), με υπόστρωμα μονόκλωνα RNAs, και επιτρέπει σε συνδυασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), την ανίχνευση και την απομόνωση ειδικών mRNA. Στο παρακάτω πρωτόκολλο χρησιμοποιείται η RT από τον ρετροϊό Moloney Leukaemia (MMLV-RT).

1. Σε μικροσωληνίδιο 0.5 μl τοποθετήθηκαν 5-10μg ολικού RNA από ιστό ή κύτταρα σε τελικό όγκο 2-6 μl. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 80 pmol oligo dT προς υβριδοποίηση όλων των πολυαδενυλιωμένων μεταγραφημάτων (polyA+). Το μείγμα επώαστηκε στους 65° C για 5 λεπτά.
2. Μετά το πέρας του υβριδισμού, η αντίδραση μεταφέρθηκε στους 37° C.
3. Στην αντίδραση προστέθηκαν τα ακόλουθα:



	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα RT	1X	4μls
DTT	10mM	2μls
BSA	1X	2μls
dNTPs	0.25mM	2μls
Αναστολέας Ριβονουκλεασών (Rnasin)	40 Units	1μls
ddH ₂ O		4μls
MMLV-RT	200 Units	1μls

4. Η αντίδραση επώαστηκε για 1 ώρα στους 37° C.
5. Ακολούθησε κατακρήμιση των cDNA προϊόντων με προσθήκη 1/10 5M NaCl και 2 όγκων αιθανόλης
6. Τα ιζήματα επανεωρήθηκαν σε 50-100μls ddH₂o και ήταν έτοιμα για αντιδράσεις PCR.

Η κάθε αντίδραση PCR εμπειρείχε 1-3 μl cDNA και 1X ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 250μM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ και 2 units Taq Polymerase.

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε κοινές συνθήκες με βάση τον ακόλουθο κύκλο επώασης:

50° C για 2 λεπτό

95° C για 10 λεπτά

57° C για 1 λεπτό

72° C για 1.5 λεπτό

5 επαναλήψεις

93° C για 30 δεύτερα

57° C για 30 δεύτερα

72° C για 1 λεπτό

40 επαναλήψεις

Επιπρόσθετα το cDNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την ανίχνευση των μεταγράφων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-



Time PCR). Για κάθε αντίδραση έγινε χρήση των αντιδραστηρίων Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) στο θερμοκυκλοποιητή RotorGene 6000 (Corbett Research). Η έκφραση των μεταγράφων ομαλοποιήθηκε σύμφωνα με την έκφραση των mRNAs της B2 μικροσφαιρίνης και του L32. Η σχετική έκφραση των πειραματικών δειγμάτων υπολογίστηκε ως διαφορά επί των τιμών από τα δείγματα ελέγχου για τα οποία ορίστηκε μια αυθαίρετη αξία έκφρασης 1, χρησιμοποιώντας το BioRad RelQuant ή το REST 2005 (Corbett Research). Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα προέκυψαν από 3 ποντίκια/ομάδα/γενότυπος, εις τριπλούν η κάθε αντίδραση, ώστε να προκύπτουν τελικά 9 ανεξάρτητες αντιδράσεις για κάθε μέτρηση. Τα ζεύγη των ειδικών εκκνητών, περιγράφονται παραπάνω.

Στα πειράματα ακτινομυκίνης D (βλ. παρακάτω)

2.3.2.2 Ανάλυση μικροσυστοιχιών RNA

Για την ανάλυση μικροσυστοιχιών RNA χρησιμοποιήθηκαν 300ng ολικού RNA από δείγματα πνεύμονα για κάθε γονότυπο. Η περαιτέρω επεξεργασία τους (σήμανση δειγμάτων, υβριδοποίηση, απόκτηση της εικόνας αποτελεσμάτων) έγινε σύμφωνα με το τυποποιημένο πρωτόκολλο GeneChip[®] της Affymetrix. Αφού δημιουργηθούν οι λίστες δεδομένων από τις παραγόμενες εικόνες το πρώτο στάδιο ανάλυσης συμπεριλαμβάνει την κανονικοποίηση (normalization), τη στατιστική ανάλυση (statistical selection) και την προσθήκη του ονόματος και όλων των γνωστών πληροφοριών για κάθε κλώνο/γονίδιο (annotation).

Μετά την κανονικοποίηση και αφού έχει προστεθεί κάθε δυνατή πληροφορία για κάθε κλώνο/γονίδιο της μικροσυστοιχίας δημιουργήθηκαν οι λίστες των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων (ΔΕΓ/DEGs). Η τιμή της στατιστικής σημαντικότητας της έκφρασης (p-value) του εκάστοτε γονιδίου στη λίστα, προέκυψε με την εφαρμογή της στατιστικής μεθόδου ANOVA. Το ανώτερο κοινώς αποδεκτό όριο της τιμής p-value είναι ≤ 0.05 για να θεωρηθεί ένα γονίδιο στατιστικά σημαντικό. Μετά από τον ορισμό του p-value σε κάθε γονίδιο ορίστηκε το αποδεκτό όριο (threshold) στην διαφορά έκφρασης κάθε γονιδίου από το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου (FC-fold change), τόσο αυτών που υπο-εκφράζονται (πχ. $FC \leq -1.5$) όσο και αυτών που υπερ-εκφράζονται (πχ. $FC \geq 1.5$).

Μετά από τον προσδιορισμό των ΔΕΓ, ορίστηκε η βιολογική σημασία των αποτελεσμάτων και δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα μονοπάτια αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (data mining). Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό



Endeavour (<http://www.bits.vib.be/endeavour>) για την ομαδοποίηση των γονιδίων με βάση την έκφραση και τη σχέση μεταξύ τους (clustering) και την ανάλυση των βιολογικών μονοπατιών (pathway analysis) των γονιδίων με βάση τη σημαντικότητα τους στην κάθε περίπτωση (gene prioritization)

2.3.2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών με διάλυμα Laemmli

Laemly buffer: [0,125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% β-Merc-OH]

1. Σε τμήμα ή σε ολόκληρα δείγματα πνευμονικού ιστού προστέθηκε Laemmly buffer με 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, και πραγματοποιήθηκε μηχανική ομογενοποίηση.
2. Στο ομογενές μίγμα ασκήθηκαν υπέρηχοι (Sonication) για 15'' σε πάγο για λύση του DNA.
3. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4° C και απομονώθηκε το υπερκείμενο.
4. Το εκχύλισμα αυτό προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου συστήματος προσδιορισμού της περιεκτικότητας πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων BCA Protein Assay kit.

2.3.2.3.1 Ανοσοστύπωμα κατά Western

2.3.2.3.1α Παρασκευή πηκτής SDS-PAGE:

Γέλη διαχωρισμού 12%	Γέλη επιστέγασης 12%
3.4 ml DDH ₂ O	3.4 ml DDH ₂ O
4.0 ml 30% Ακρυλαμίδη/Bis	4.0 ml 30% Ακρυλαμίδη/Bis
2.5 ml gel buffer 1.5 M tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml gel buffer 0.5 M tris-HCl, pH 6.8
0.1 ml 10% w/v SDS	0.1 ml 10% w/v SDS
50 μl 10% APS	50 μl 10% APS
5 μl Temed	10 μl Temed

2.3.2.3.1β Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε SDS-page πηκτή.

Καθώς υπολογίστηκε η περιεκτικότητά κάθε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ήταν εφικτό το ισοκαταναμημένο φόρτωμα αυτών στην πηκτή. Πριν φορτωθούν, κάθε δείγμα αναμίχθηκε με ~2 μl βρωμοφαινόλη. Στην συνέχεια στα δείγματα πραγματοποιήθηκε βρασμός για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν σε 11000



στροφές για 1 λεπτό στους 4° C. Τα δείγματα φορτώθηκαν στην πήκτη και διαχωρίστηκαν για 80 με 90 λεπτά, στα 120 volt.

2.3.2.3.1γ Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Αφού τελειώσει ο διαχωρισμός, η πήκτη τοποθετείται σε ειδική διάταξη και πραγματοποιείται μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εντός διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer). Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, διαπιστώνεται με χρώση της μεμβράνης με ειδική κόκκινη χρωστική (ponceau).

2.3.2.3.1δ Προσκόλληση αντισωμάτων στην μεμβράνη.

Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και προστέθηκε διάλυμα επικάλυψης (blocking), (συνήθως 5% σκόνη γάλακτος σε PBS) αφήνοντας την αντίδραση για τουλάχιστον 1 ώρα. Το διάλυμα επικάλυψης αφαιρέθηκε και αφού η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS, προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα, σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA, αφήνοντας για επώαση όλη την νύχτα στους 4° C.

Το πρώτο αντίσωμα, απομακρύνθηκε ξεπλένοντας τρεις φορές από δέκα λεπτά με PBS 1X, το οποίο περιέχει 0.1% Tween. Στη συνέχεια προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα, με σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA, το οποίο είναι ειδικό έναντι του πρώτου. Η επώαση έγινε για 1 ώρα και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS, το οποίο περιέχει 0.1% Tween για την μη ειδική απομάκρυνση και του δεύτερου αντισώματος.

2.3.2.3.1ε Ανίχνευση σήματος πρωτεϊνών.

I. Εμφάνιση σε φιλμ με luminol.

Σε δύο σωλήνες (universals) προετοιμάστηκαν τα εξής δύο διαλύματα:

A) 250 μl tris pH 8.5 2M

50 μl luminol

22 μl coumaric acid

4.675 ml H₂O

B) 250 μl tris pH 8.5 2M

3 μl 30% υπεροξειδίου υδρογόνου

4.750 ml H₂O

Η διαδικασία της εμφάνισης σε φιλμ πραγματοποιήθηκε απουσία φωτός, όπου απομακρύνοντας το διάλυμα πλύσης προστέθηκε το τελικό διάλυμα A+B. Μόλις ανιχνεύθηκε φθορισμός (μερικά δευτερόλεπτα με ένα λεπτό) τυλίχθηκε η μεμβράνη σε διάφανο σελοφάν. Τα φιλμ τοποθετήθηκαν ένα-ένα επάνω στην μεμβράνη όπου



καταχωρήθηκαν φωτογραφίες σε διαφορετική έκθεση, από ελάχιστα δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά ανάλογα με την ένταση του σήματος. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε, σε ειδικά διαλύματα εμφάνισης (developer και fixer).

II. Εμφάνιση με ECL.

Σε μερικές περιπτώσεις η εμφάνιση έγινε με ECL, δηλαδή μέσω ενισχυμένου χημειοφθορισμού, όπου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες κατασκευαστή (Amersham). Η εμφάνιση επιτεύχθηκε μέσω phosphorimager STORM860 της εταιρίας Molecular Dynamics. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση ήταν το Image Quant 5.0.

2.3.2.3.1στ Απομάκρυνση αντισωμάτων (Stripping).

Η μεμβράνη στην οποία είχε προστεθεί το πρώτο αντίσωμα, υπέστη την διαδικασία της απομάκρυνσης αντισώματος (stripping). Με την διαδικασία αυτή, απομακρύνθηκαν τα αντισώματα που είχαν προηγουμένως προσκολληθεί στις θέσεις που αντιστοιχούσαν για την πρώτη πρωτεΐνη. Η μεμβράνη με το διάλυμα απομάκρυνσης αντισώματος (stripping) τοποθετήθηκε σε μια πλαστική συσκευασία επιτρέποντας την διεξαγωγή αντίδρασης για 30 λεπτά στους 50° C. Αφαιρέθηκε το διάλυμα stripping και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PBS 1X, 0.1% Tween. Τέλος αφαιρέθηκε το διάλυμα πλύσης και πραγματοποιήθηκε επανάληψη της αντίδρασης με διαφορετικά αντισώματα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί συνολικά 2 φορές

2.3.2.4 *In situ* ανίχνευση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης σε τομές παραφίνης/κρυοστάτη

Για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων, εφαρμόστηκε η τεχνική TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling), σε τομές πνεύμονα (παραφίνης/κρυοστάτη). Στις τομές παραφίνης ή κρυοστάτη, πραγματοποιήθηκε διάνοιξη τη διαπερατότητας με πρωτεΐνάση K (10mg/mL για 20') ή με 0,1% Triton, 0,1% sodium citrate (για 2' στους 4°C) αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του τυποποιημένου πρωτοκόλλου (cell death detection kit Roche). Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε



το τυποποιημένο σύστημα χρώσης AP-converter (Roche) σε υπόστρωμα Fast Blue (Sigma). Για αντίχρωση οι τομές εμβαπτίστηκαν στη χρωστική Nuclear Fast Red.

Για την ανίχνευση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενήλικοι ποντικοί ή θηλυκοί ποντικοί κατά την ενδιαφερόμενη μέρα κύησης, ενύονται ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση BrdU (1mg/ml) 3 ώρες πριν θανατωθούν. Στη συνέχεια οι πνευμονικοί ιστοί συλλέγονται και υφίστανται τις διαδικασίες ανοσοϊστοχημικής προετοιμασίας όπως περιγράφονται στην ενότητα 3.2.1, με ορισμένες παραλλαγές. Στις τομές παραφίνης πραγματοποιήθηκε διάνοιξη τη διαπερατότητας με πρωτεΐνάση K (10mg/mL για 20'). Στη συνέχεια, οι τομές επωάζονται για 1 ώρα με 2N HCl και ακολούθως με διάλυμα borate (pH 7.6) για 10', πριν από το διάλυμα επικάλυψης (blocking). Κατόπιν, οι τομές επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του BrdU και την επόμενη μέρα ακολουθείται το τυπικό πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης με υπόστρωμα DAB όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5.1.

2.4 Ex vivo πειραματικές διαδικασίες

2.4.1 Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός υποπληθυσμών βρογχοκυψελιδικών βλαστικών κυττάρων – BASCs

Η πειραματική διαδικασία για την απομόνωση των BASCs με κυτταρομετρία ροής έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Kim et al., 2007). Συνοπτικά:

1. Ποντικοί ηλικίας 6-10 εβδομάδων αναισθητοποιούνται και πραγματοποιείται διάνοιξη στην περιοχή του θωρακικού κλωβού.
2. Πραγματοποιείται έκχυση 10mL PBS στην δεξιά κοιλία μέχρι να απομακρυνθεί το αίμα από τους πνεύμονες.
3. Πραγματοποιείται ενδοτραχειακή έκχυση 2-3 mL διαλύματος του ενζύμου dispase (Gibco) 1U/mL σε PBS
4. Ακολούθως χορηγείται ενδοτραχειακά 1% αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως (LMP agarose- Biorad) ως επιστέγασμα.
5. Οι πνεύμονες συλλέγονται και επωάζονται σε 1mL διαλύματος dispase 1U/mL - κολλαγενάσης (2mg/mL τελική συγκέντρωση) στους 37° C για 1 ώρα.
6. Οι ιστοί τοποθετούνται σε τρυβλία Petri και προστίθεται σε αυτούς 7 mL DMEM θρεπτικού μέσου, χωρίς FBS, παρουσία ενζύμου του DNase (~0.025 mg/mL τελική συγκέντρωση)



7. Με ελεγχόμενες κινήσεις οι ιστοί κομματιάστηκαν μέχρις ότου δημιουργηθεί ένα σχετικά ομογενές μίγμα κυττάρων.
8. Στο μίγμα προστίθενται άλλα 20 mL DMEM θρεπτικού μέσου, χωρίς FBS και φιλτράρεται διαδοχικά από φίλτρα νάilon διαμέτρου 100μm και 40μm αντίστοιχα (BD).
9. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 800 rpm στους 4° C για 8'
10. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης ερυθρών κυττάρων (Gey's solution) και επωάζονται σε Θ.Δ. για 2'
11. Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 800 rpm στους 4° C για 5'
12. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 mL PBS και γίνεται ανάλυση της περιεκτικότητας του μίγματος (Coulter).
13. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε ειδική πλάκα 96 πηγαδίων (2x10⁶ κύτταρα ανά πηγάδι) και φυγοκεντρώνονται σε 800 rpm στους 4° C για 5'
14. Επαναδιαλύονται σε διάλυμα ειδικό για την κυτταομετρία και ακολουθεί τυπικό πρωτόκολλο χρώσης των κυττάρων με δείκτες επιφανείας και ανάλυση σε ειδικό μηχάνημα ανάλυσης (FACs CantoII - BD).

Χρώση με δείκτες επιφανείας:

Αντίσωμα	Συζευγμένο φθορόχρωμα/2 ^ο αντίσωμα	Κατασκευαστής	Αραίωση
CD34	PE	Biolegend, eBioscience	1 μl / 10 ⁶ κύτταρα
CD45 Ly5-biotin	Strep-PE-Cy5 αραίωση 1:2000	Biolegend	0,25 μl / 10 ⁶ κύτταρα
PECAM-biotin	Strep-PE-Cy5 αραίωση 1:2000	Biolegend	0,5 μl / 10 ⁶ κύτταρα
Sca-1	FITC	Biolegend	0,25 μl / 10 ⁶ κύτταρα



2.4.2 Καλλιέργειες πνευμονικών εκβλαστημάτων.

Πνεύμονες από έμβρυα ηλικίας 11.5 ημερών, απομονώθηκαν και με ειδικές λαβίδες διαχωρίστηκαν τα ακραία αναπτυσσόμενα τμήματα – πνευμονικά εκβλαστήματα (lung buds). Τα εκβλαστήματα αυτά εμβαπτίστηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 12 πηγαδίων, σε μίγμα θρεπτικού μέσου DMEM (F12) και Matrigel (1:1). Το θρεπτικό μέσο περιείχε ή όχι ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη FGF10 (500ng/mL), και τα δείγματα καλλιεργήθηκαν για 120 ώρες (37° C, 5% CO₂). Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τα δείγματα παρατηρούνταν και φωτογραφίζονταν ανά 24 ώρες.

2.5 In vitro πειραματικές διαδικασίες

2.5.1 Μέτρηση της σταθερότητας του mRNA μέσω της προσθήκης Ακτινομυκίνης D.

Η ακτινομυκίνη D προσδένει το DNA από το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής και αποτρέπει την επιμήκυνση της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση. Έτσι η προσθήκη του χημικού αυτού παράγοντα επιτρέπει την μελέτη σταθερότητας των mRNA που προϋπάρχουν, καθώς δεν είναι δυνατόν να παραχθούν καινούργια. Σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού σε καλλιέργεια, προστέθηκε ακτινομυκίνη D σε συγκέντρωση 5μg/ml με σκοπό την αναστολή της μεταγραφής και τα RNA απομονώθηκαν μετά από 30', 60' και 90' παρουσίας ακτινομυκίνης. Ο χρόνος ημιζώης των mRNAs στα κύτταρα που έχει χορηγηθεί ακτινομυκίνη D προσδιορίζεται με αντίδραση Real-Time PCR σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Abdelmohsen et al, 2007, Katsanou et al, 2009)

2.6 In vivo πειραματικές διαδικασίες

2.6.1 Πρωτόκολλο χημικής επαγωγής της καρκινογένεσης με ουρεθάνη.

Η ουρεθάνη είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που παρεμβάλλεται στο DNA επάγοντας τον καρκίνο στον οργανισμό. Συνοπτικά, σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ποντικοί ηλικίας 4 έως 10 εβδομάδων ενύονται ενδοπεριτοναϊκά με 10 εβδομαδιαίες δόσεις ουρεθάνης (1μg/g βάρους σε διάλυμα φυσιολογικού ορού) και εξετάζονται μετά από 16 ή 24 εβδομάδες μετά την πρώτη δόση.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



3.1 Ο ρόλος της HuR στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία του πνεύμονα

3.1.1 Η καθολική απαλοιφή της HuR είναι εμβρυϊκά θνησιγενής και προκαλεί σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη του πνεύμονα.

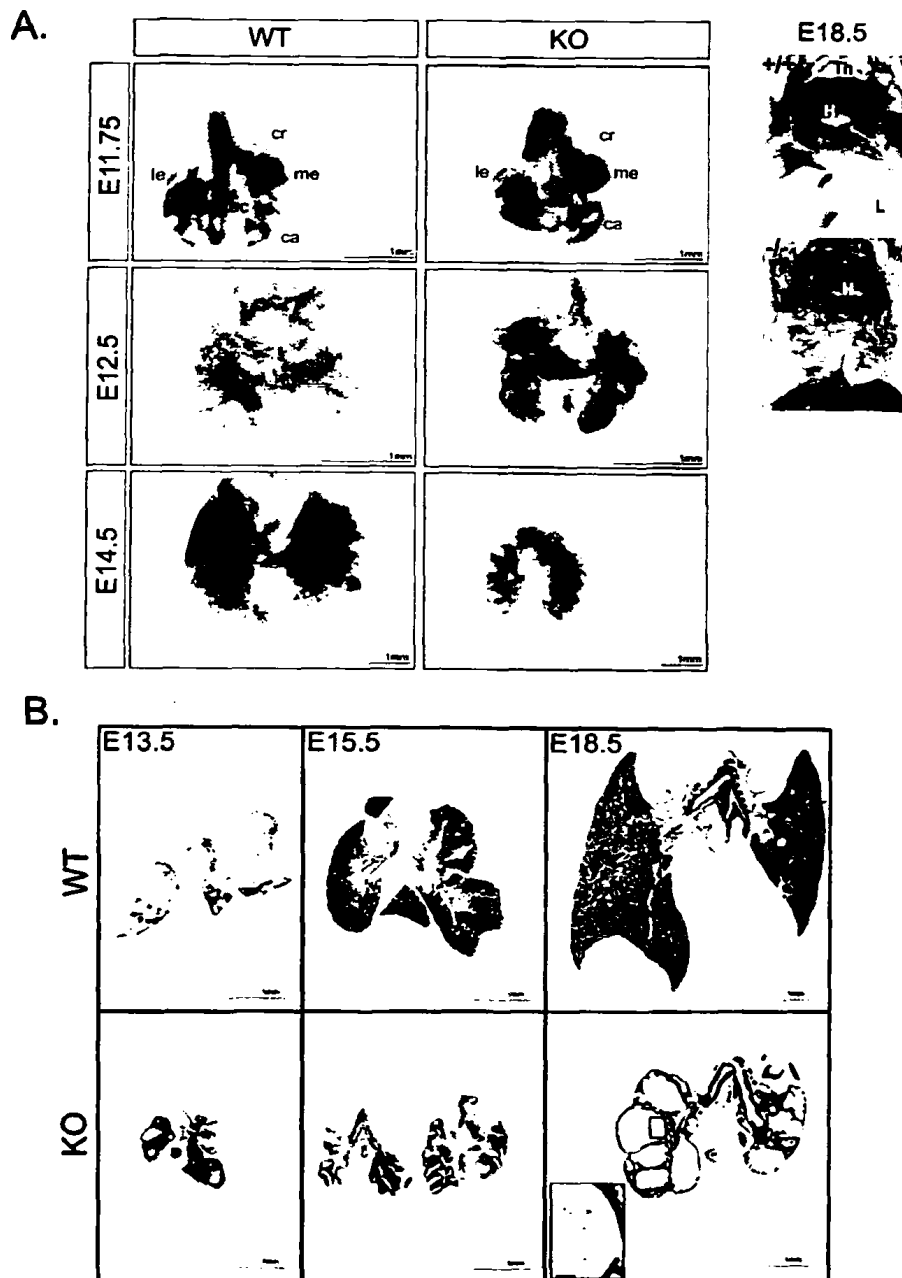
Όπως έχει περιγραφεί από μελέτες του εργαστηρίου μας (Katsanou et al, 2009) οι ποντικοί με καθολική απαλοιφή της HuR πεθαίνουν στο στάδιο της γαστριδίωσης λόγω της ελλιπούς διαφοροποίησης έξω-εμβρυϊκών /τροφοβλαστικών δομών και της καταστολής στην ανάπτυξη του πλακούντα. Για να υπερκεράσουμε τη θνησιμότητα στο στάδιο της γαστριδίωσης, αναπτύχθηκαν διαγονιδιακοί ποντικοί (Katsanou et al, 2009) στους οποίους η απαλοιφή της HuR πραγματοποιείται στα κύτταρα της επιβλάστης και στους προερχόμενους εξ αυτών ιστούς, αλλά όχι σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε το αλληλίο *Elavl^{flax}* σε συνδυασμό με το αλληλίο *Sox2Cre* στο οποίο το τροποποιημένο ιικό διαγονίδιο CRE βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Sox2*. Η τοποειδική αυτή απαλοιφή της HuR είναι επίσης θνησιγενής αλλά τα έμβρυα *Sox2Cre⁺ Elavl^{flax/flax}* (ΚΟ για ευκολία) καταφέρνουν να επιβιώσουν μέχρι την εμβρυϊκή ημέρα 17.5 (E17.5) παρουσιάζοντας σημαντικές διαταραχές στην ανάπτυξη διαφόρων οργάνων, συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα.

Για να προσδιοριστεί το χρονικό πλαίσιο στο οποίο εμφανίζεται η πνευμονική διαταραχή στους μεταλλαγμένους ποντικούς, απομονώσαμε εμβρυϊκούς πνεύμονες κατά τα αναπτυξιακά στάδια E11.75-E18.5. Μακροσκοπικά, οι εμβρυϊκοί πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών στο στάδιο E11.75 φαίνονται σχετικά φυσιολογικοί, η τραχεία και οι δύο κύριοι βρόγχοι είναι σωστά σχηματισμένοι και εμφανίζουν ισομετρική τμηματοποίηση των πρωτογενών πνευμονικών λοβών (εικόνα 1A). Παρόλα αυτά, οι αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα μεταλλαγμένων εμβρύων εμφανίζονται κατά το ψευδοαδενικό στάδιο (*pseudoglandular stage*) και επιδεινώνονται μετά την εμβρυϊκή μέρα E12.5. Συγκεκριμένα, ήδη από την εμβρυϊκή μέρα E12.5, οι μεταλλαγμένοι πνεύμονες είναι υποπλασμένοι, παρουσιάζουν αναπτυξιακή καθυστέρηση και μειωμένη διακλάδωση του μελλοντικού βρογχικού επιθηλίου. Ακολούθως, σε μεταγενέστερα στάδια (E14.5-18.5) η ανάπτυξη του κατώτερου αναπνευστικού καταστέλλεται και η τμηματοποίηση δεν είναι πλέον διακριτή (εικόνα 1A). Μικροσκοπικά, φαίνεται ότι η απουσία της HuR προκαλεί την απώλεια του βρογχικού δέντρου ενώ οι εμβρυϊκοί πνεύμονες εμφανίζουν μια



διαστρεβλωμένη δομή, αποτελούμενη από διογκωμένους σάκους με απουσία τελικών βρογχιολίων και αναπνευστικών σάκων (εικόνα 1B).

Εικόνα 1. Αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα των HuR υπολειπόμενων ποντικών.



(A) Μακροσκοπική ανάλυση εμβρυϊκών πνευμονικών δειγμάτων από μεταλλαγμένους και φυσικού τύπου ποντικούς αντίστοιχα. Η αναπτυξιακή διαταραχή στους πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών αρχίζει να εμφανίζεται μετά την 12^η εμβρυϊκή μέρα με πιο έντονη έκφραση σε μεταγενέστερα στάδια. Παρόλα αυτά η οργανογένεση γειτονικών ιστών δεν έχει επηρεαστεί φαινοτυπικά. (B) Μικροσκοπική ανάλυση αντίστοιχων δειγμάτων σε τομές παραφίνης και κρουστάτη, με χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης. Στο ένθεμα διακρίνεται η αποκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων προς τους διογκωμένους σάκους.

3.1.2 Ο φαινότυπος στους εμβρυϊκούς πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών σχετίζεται με διαταραχές στο μεσεγγυματικό τμήμα του πνεύμονα.

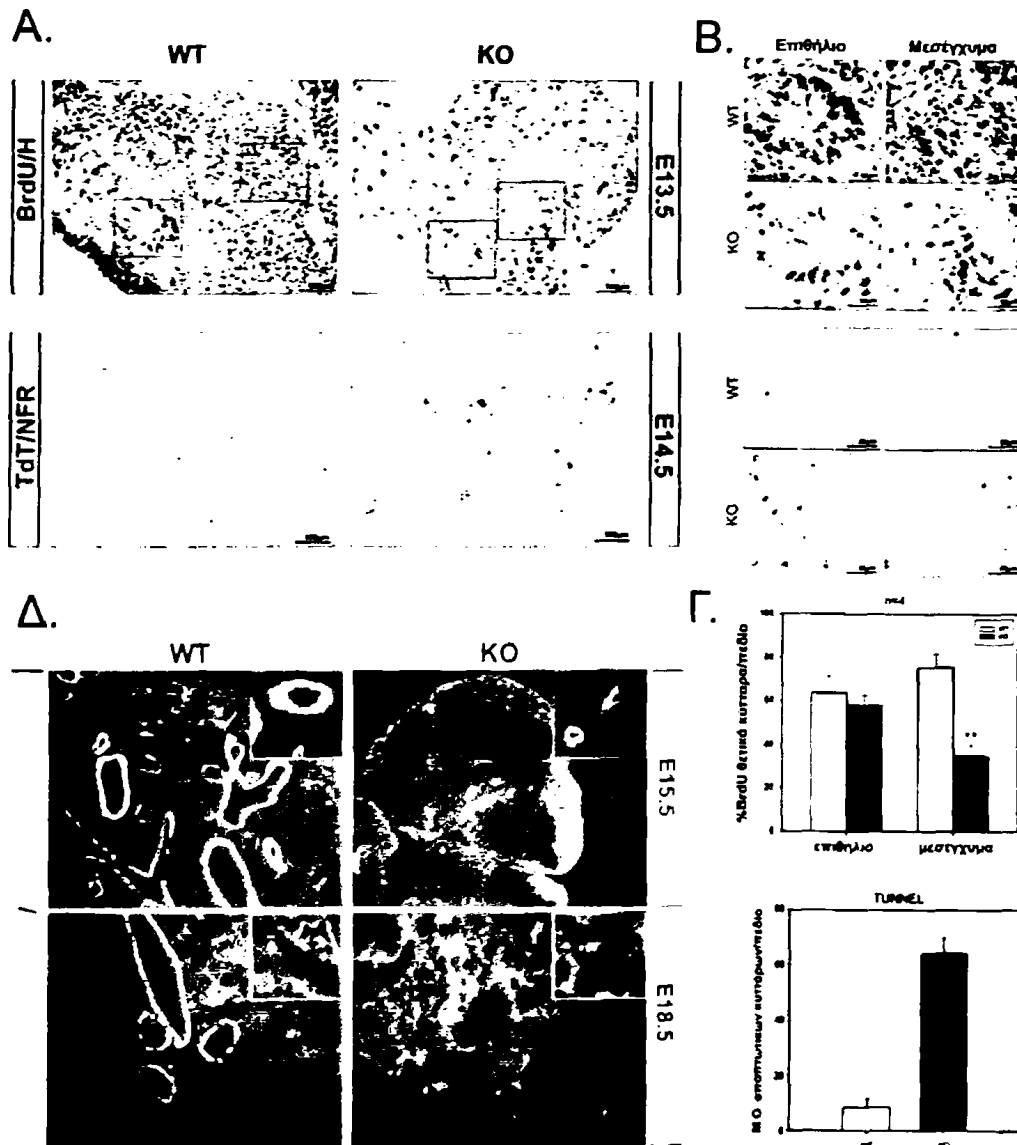
Δεδομένου ότι η καθολική απαλοιφή της HuR προκαλεί υποπλασία και καταστολή των διαδικασιών της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου, καθώς και το γεγονός ότι η HuR ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, θεωρήσαμε ότι η απώλειά της επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή/και την απόπτωση στα πρώιμα στάδια της πνευμονικής ανάπτυξης. Για να εξετάσουμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απομονώθηκαν εμβρυϊκοί πνεύμονες ηλικίας E13.5, από μεταλλαγμένους και φυσικού τύπου ποντικούς, στους οποίους είχε χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά μία δόση βρώμο-δεόξυ-ουριδίνης ή αλλιώς BrdU. Το BrdU είναι ανάλογο της θυμιδίνης και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση, τα οποία και το ενσωματώνουν. Από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση έναντι του BrdU, παρατηρήσαμε ότι στο πνευμονικό επιθήλιο δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην ενσωμάτωση του BrdU, μεταξύ των εξεταζόμενων ποντικών. Αντίθετα, στο πνευμονικό μεσέγγυμα των μεταλλαγμένων ποντικών το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση ήταν μόλις 30% (38 ± 8) έναντι 70% (78 ± 9) στην περίπτωση του πνευμονικού μεσεγγύματος φυσικού τύπου (εικόνες 2A, B και Γ).

Για να συσχετίσουμε τις διαφορές στον κυτταρικό κύκλο με την απόπτωση, χρησιμοποιήσαμε δείγματα εμβρυϊκών πνευμόνων στο στάδιο E14.5 και εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο TUNNEL για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, στους πνεύμονες των εμβρύων φυσικού τύπου παρατηρήθηκαν ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τον μεγάλο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων που παρατηρήθηκαν στους εμβρυϊκούς πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών (εικόνες 2A, B και Γ). Μάλιστα, είναι ενδιαφέρον ότι τα περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μεσόδερμα που υπόκειται του επιθηλίου (εικόνα 2B). Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδήγησαν σε πρώτη φάση, στο συμπέρασμα ότι ο αναπτυξιακός φαινότυπος στον πνεύμονα των HuR υπολειπόμενων ποντικών οφείλεται κατά ένα μέρος σε διαταραχές στο μεσεγγυματικό τμήμα του πνεύμονα

Για να επιβεβαιώσουμε τη διαταραχή στο πνευμονικό μεσέγγυμα, εξετάσαμε το σχηματισμό πνευμονικών δομών μεσοδερμικής προέλευσης όπως οι λείοι μύες που περιβάλλουν τα αγγεία και τους βρόγχους, με ανοσοφθορισμό έναντι της πρωτεΐνης *Sma1*. Η *Sma1* εκφράζεται στα λεία μυϊκά κύτταρα και αποτελεί μοριακό δείκτη για τον προσδιορισμό μεσεγγυματικών δομών. Από τις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις μας



σε τομές εμβρυϊκών πνευμόνων στα στάδια E15.5 και E18.5 παρατηρήσαμε ότι στους ποντικούς φυσικού τύπου τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι οργανωμένα σε δομές που περιβάλλουν το επιθήλιο των βρόγχων καθώς και το ενδοθήλιο των αγγείων (εικόνα 2Α). Αντίθετα, στους μεταλλαγμένους ποντικούς οι χαρακτηριστικές μεσοδερμικές δομές που περιβάλλουν τα αγγεία και τους βρόγχους σχεδόν απουσιάζουν, μάλιστα η έκφραση της *Smal* ήταν ιδιαίτερα εκτεταμένη χωρίς όμως να υπάρχει εμφανής διαφοροποίηση στις προαναφερόμενες δομές, γεγονός που αναδεικνύει την αποδιοργάνωση του πνευμονικού μεσεγγύματος (εικόνα 2Δ).



Εικόνα 2. Αποδιοργάνωση του πνευμονικού μεσεγγύματος στους μεταλλαγμένους ποντικούς (Α) (Β) Ανοσοϊστοχημική αντίγνωση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων με χρώση έναντι του BrdU και προσδιορισμός αποπτωτικών κυττάρων (TUNNEL). (Γ) Ποσοτικοποίηση των πολλαπλασιαζόμενων και των αποπτωτικών κυττάρων ανά γονότυπο. (Δ) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός μεσοδερμικών δομών (*Smal*-FITC πράσινη χρώση, DAPI μπλε χρώση)

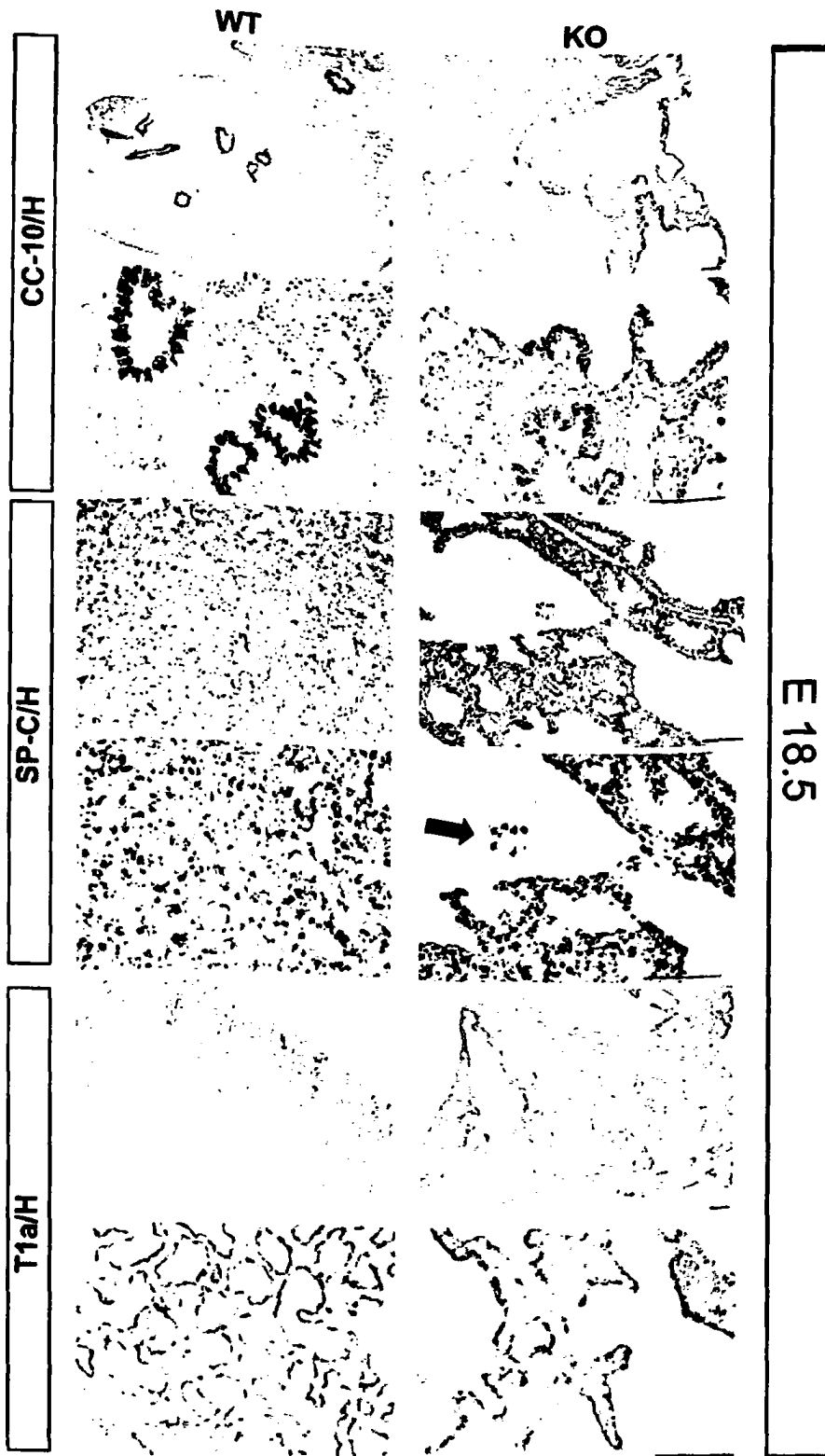


3.1.3 Η διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου δεν καταστέλλεται από την καθολική απαλοιφή της HuR.

Για να μελετήσουμε την επίδραση της απώλειας της HuR στη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου, εξετάσαμε ανοσοϊστοχημικά τους βασικούς κυτταρικούς τύπους που το συνιστούν, κατά το αναπτυξιακό στάδιο E18.5. Σε αυτό το στάδιο οι κύριοι κυτταρικοί πληθυσμοί του πνευμονικού επιθηλίου έχουν σχηματιστεί και μπορούν να ανιχνευτούν με ειδικούς για τον καθένα τύπο, μοριακούς δείκτες. Συγκεκριμένα, η εκκριτική πρωτεΐνη CC10 εντοπίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα Clara που συγκροτούν σε μεγάλο ποσοστό (στους κύριους και στους εγγύτερους βρόγχους) έως και αποκλειστικά (στους άωτους βρόγχους και στα βρογχιόλια) το βρογχικό επιθήλιο, καθώς και στα βλαστικά κύτταρα του πνεύμονα (στο βρόγχο-αναπνευστικό αγωγό σύζευξης). Αντίθετα, στους πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών και κατά το αντίστοιχο στάδιο, οι περισσότερες επιθηλιακές δομές που αποτελούν το βρογχικό επιθήλιο απουσίαζαν, επιβεβαιώνοντας την καταστολή των διαδικασιών της μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου. Μάλιστα, η έκφραση της CC10 ήταν διακριτή μεν αλλά περιοριζόταν σε ανοιχτές δομές που προσομοίαζαν τους βρογχο-κυψελιδικούς αγωγούς σύζευξης (Bronchio-Alveolar Duct Junction-BADJ) (εικόνα 3, χρώση CC10/H). Παρόλα αυτά, η παρουσία κυττάρων που εξέφραζαν τη γλυκοπρωτεΐνη gp38 (ή αλλιώς T1a) καθώς και την πρωτεΐνη C του επιφανειοδραστικού παράγοντα (SPC) ήταν ιδιαίτερα εμφανής στους πειραματικούς ποντικούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαφοροποίηση του κυψελιδικού επιθηλίου σε κύτταρα τύπου I και II αντίστοιχα δεν καταστέλλεται απουσία της HuR (εικόνα 3, χρώση SPC/H, T1a/H). Βέβαια, αρκετά κύτταρα τύπου II εμφάνιζαν πυρηνικά πυκνωτική μορφολογία και εντοπίζονταν διάχυτα στο εσωτερικό των διογκωμένων σάκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ακολούθως της διαφοροποίησης, τα επιθηλιακά κύτταρα αποκολλώνται ως συνέπεια της απόπτωσης (βέλος στην εικόνα 3, χρώση SPC/H).

Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι η απώλεια της HuR δεν επηρεάζει τη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου επιβεβαιώνεται από τις αναλύσεις μας σε διαγονιδιακούς ποντικούς με ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο (εικόνα 4 A και B). Όπως περιγράφεται στο 2ο μέρος η απώλεια της HuR αποκλειστικά στο πνευμονικό επιθήλιο δεν επηρεάζει τις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα και δεν καταστέλλει τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων.

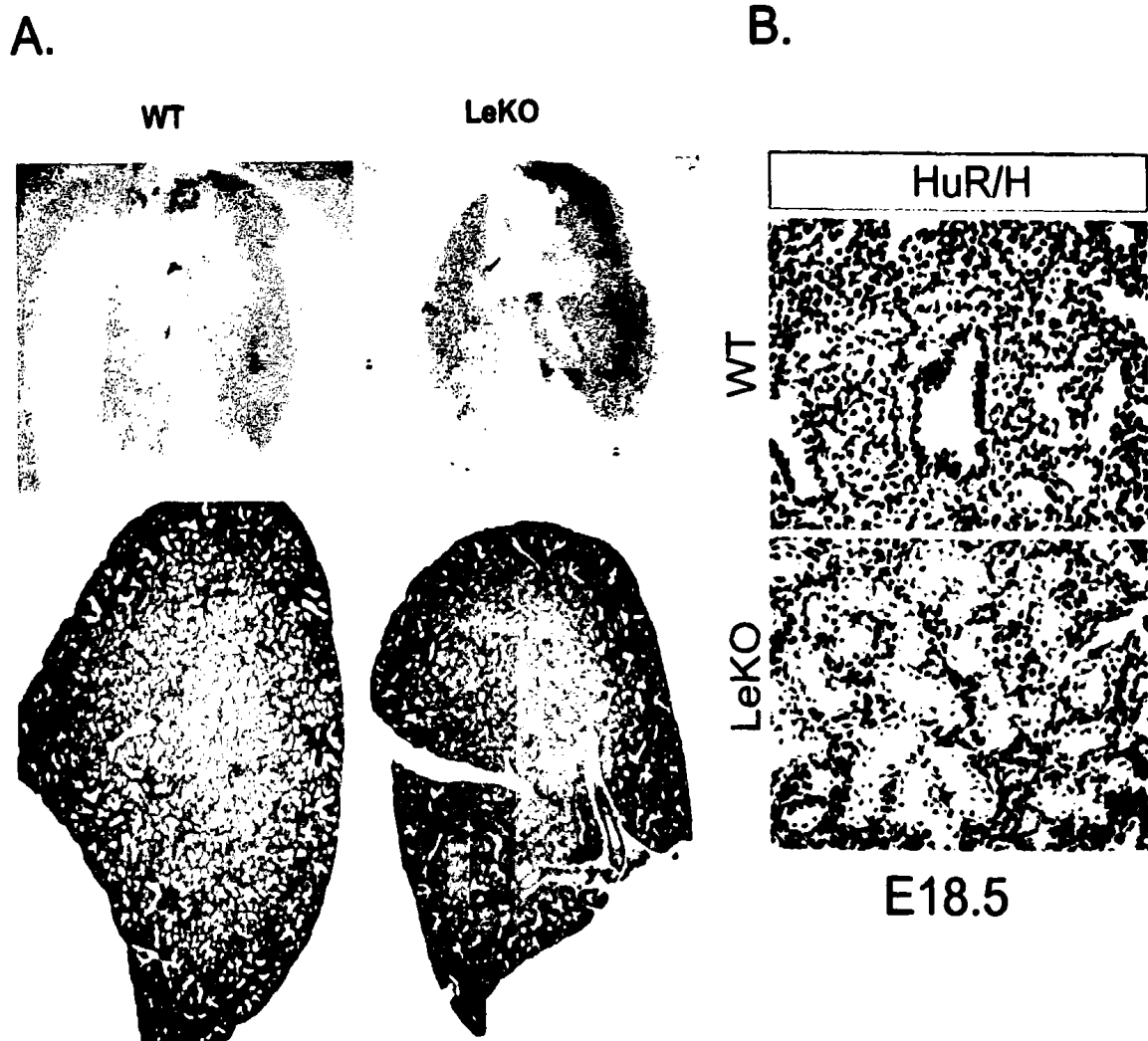




Εικόνα 3. Ανοσοϊστοχημική εξέταση της διαφοροποίησης στο εμβρυϊκό πνευμονικό επιθήλιο.

Η απώλεια της HuR δεν εμποδίζει τη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου σε κύτταρα Clara (χρώση CC10) και σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου I και II (χρώση T1a και SPC αντίστοιχα). Το βέλος αντιστοιχεί στα αποπτωτικά κύτταρα τύπου II που αποκολλώνται. Η χρώση έγινε με DAB και η αντίχρωση με αιματοξυλίνη.





Εικόνα 4. Η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του πνεύμονα.

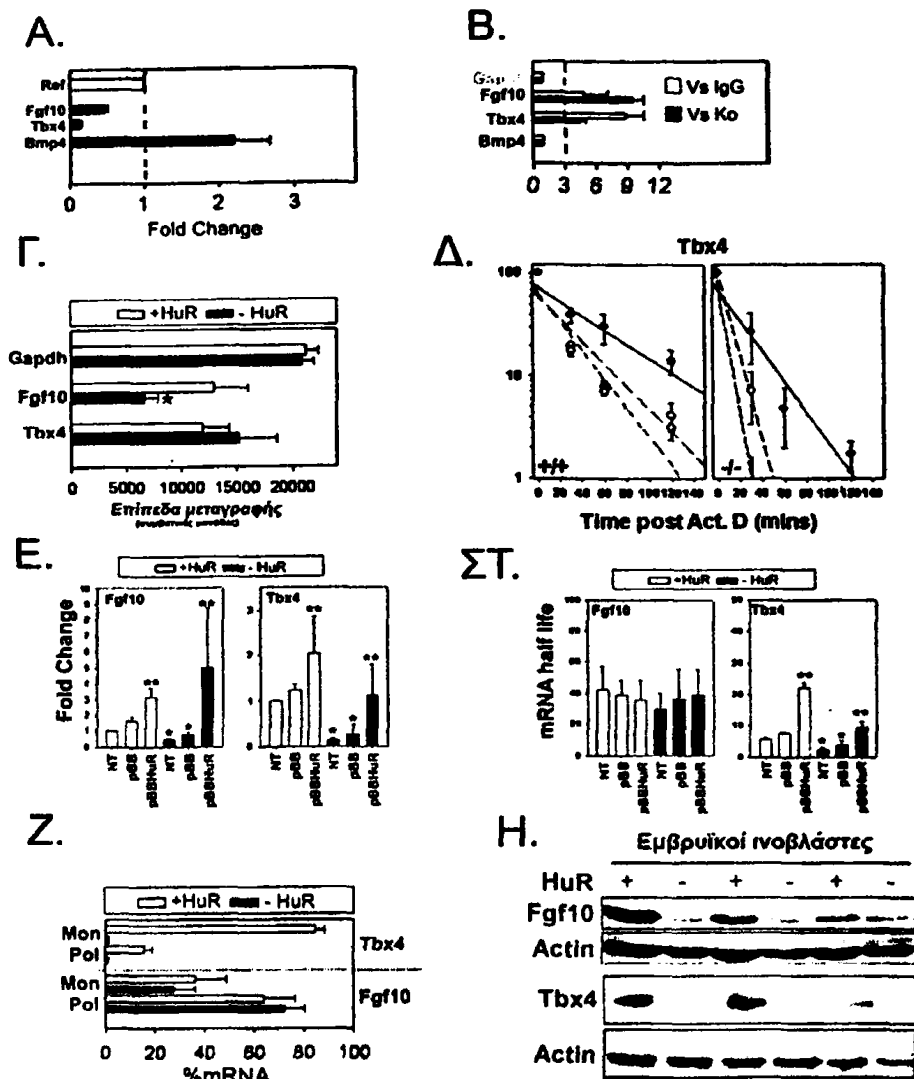
(Α) Μακροσκοπική και μικροσκοπική συγκριτική ανάλυση εμβρυικών πνευμόνων (E18.5) από διαγονιδιακούς ποντικούς με ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο. (Β) Ανοσοϊστοχημική επιβεβαίωση της επιλεκτικής απαλοιφής της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο. HuR χρώση-DAB. H: αντίχρωση με αιματοξυλίνη. WT: ποντικοί φυσικού τύπου, LeKO: διαγονιδιακοί ποντικοί με ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο επιθήλιο του πνεύμονα.

3.1.4 Η HuR ελέγχει το δίκτυο αλληλεπιδράσεων TBX4-FGF10-BMP4 κατά το στάδιο ανάπτυξης του βρογχικού δένδρου.

Όπως έχει προαναφερθεί τα μόρια TBX4, FGF10 και BMP4, παίζουν ζωτικό ρόλο στις μοριακές αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν την ανάπτυξη του βρογχικού δένδρου. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες από μεταλλαγμένους ποντικούς, έδειξαν ότι η απώλεια της HuR έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των mRNAs TBX4 και FGF10, ενώ η έκφραση του BMP4 mRNA εμφανίζεται αυξημένη σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (steady state) (Katsanou et al, 2009) (εικόνα 5A). Μάλιστα, στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε με RNA ανοσοκατακρήμνιση ότι το mRNA του FGF10 αποτελεί στόχο της πρωτεΐνης HuR (εικόνα 5B), και ότι η μείωση του στους μεταλλαγμένους ινοβλάστες οφείλεται στο μεταγραφικό επίπεδο, όπως παρατηρήθηκε μετά από nucleus-run-on ανάλυση (εικόνα 5Γ). Αντίθετα στην περίπτωση του TBX4 και του BMP4 δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια ισχυρή ένδειξη άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ της HuR και των mRNAs τους αντίστοιχα, σε αυτές τις συνθήκες (εικόνα 5B). Παρόλα αυτά, η HuR φαίνεται να επηρεάζει μεταμεταγραφικά την έκφραση του TBX4, όπως αναδείχθηκε σε πειράματα μεταγραφικής καταστολής μετά από χορήγηση ακτινομυκίνης D. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής του TBX4 mRNA, μειώνεται σημαντικά στους ινοβλάστες που υπολείπονται της HuR συγκριτικά με τον μάρτυρα (εικόνα 5Δ). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω, σε συγκριτικά πειράματα επιμόλυνσης εμβρυϊκών ινοβλαστών (KO vs WT) με πλασμιδιακό δότη (pBBHuR) στον οποίο είχε ενσωματωθεί το γονίδιο της HuR σημασμένο με HA. Η παρουσία εξωγενούς HuR στους ινοβλάστες και των δύο γονοτύπων, αύξησε τα επίπεδα του FGF10 mRNA, αλλά όχι το χρόνο ημιζωής του, ενώ στην περίπτωση του TBX4 αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης καθώς και ο χρόνος ημιζωής του mRNA του (εικόνα 5E και 5Τ). Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση της HuR στο επίπεδο της μετάφρασης για τα αντίστοιχα μόρια. Συγκριτική ανάλυση πολυριβωσωμικών και μονοριβωσωμικών κλασμάτων RNA, έδειξε ότι το πολυριβωσωμιό κλάσμα του FGF10 δεν επηρεάζεται από την απώλεια της HuR, αλλά στην περίπτωση του TBX4 δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα λόγω της χαμηλής έκφρασής του σε σχέση με τα επίπεδα αποδεκτής ανίχνευσης (εικόνα 5Ζ). Παρόλα αυτά, η ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων εμβρυϊκών ινοβλαστών, έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεϊνικής



έκφρασης του TBX4 και του FGF10 εμφάνιζαν σημαντική μείωση στους ινοβλάστες που υπολείπονται της HuR (εικόνα 5H).



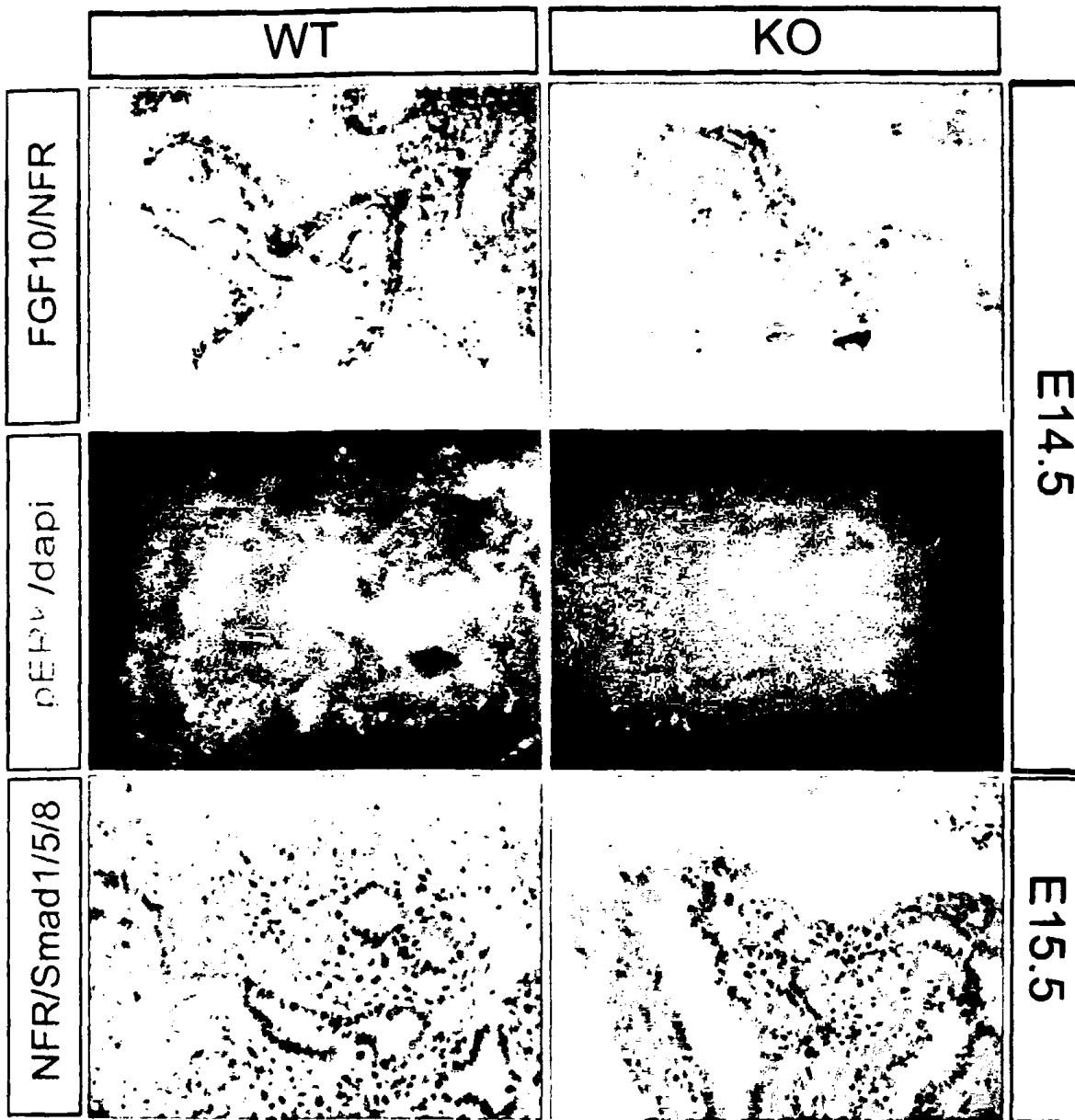
Εικόνα 5. Η επίδραση της HuR στα διάφορα στάδια της βιογένεσης των mRNAs των βασικών μορίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του πνεύμονα σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες.

(Α) Συγκριτική ποσοτική ανάλυση Real Time-PCR (qRT-PCR). Η μπάρα αναφοράς και η τιμή 1 αντιστοιχεί στην έκφραση του μάρτυρα. Για την ποσοτική προσαρμογή των επιπέδων έκφρασης και στους δύο γονοτύπους χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του $\beta 2M$. (Β) RNA ανοσοκατακρήμνιση. (Γ) Πυκνομετρική ποσοτικοποίηση σε πειράματα nucleic run-on με ραδιοεργούς RNA ανιχνευτές. (Δ) qRT-PCR του χρόνου ημιζωής του TBX4 mRNA σε πειράματα μεταγραφικής καταστολής με ακτινομυκίνη D. (Ε)(ΣΤ) Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης και του χρόνου ημιζωής με qRT-PCR στα πειράματα επιμόλυνσης εξωγενούς HuR. (Ζ) Ποσοτική ανάλυση των mRNAs των FGF10 και TBX4 σε μονοριβωσωμικά και πολυριβωσωμικά κλάσματα. (Η) Ανάλυση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.



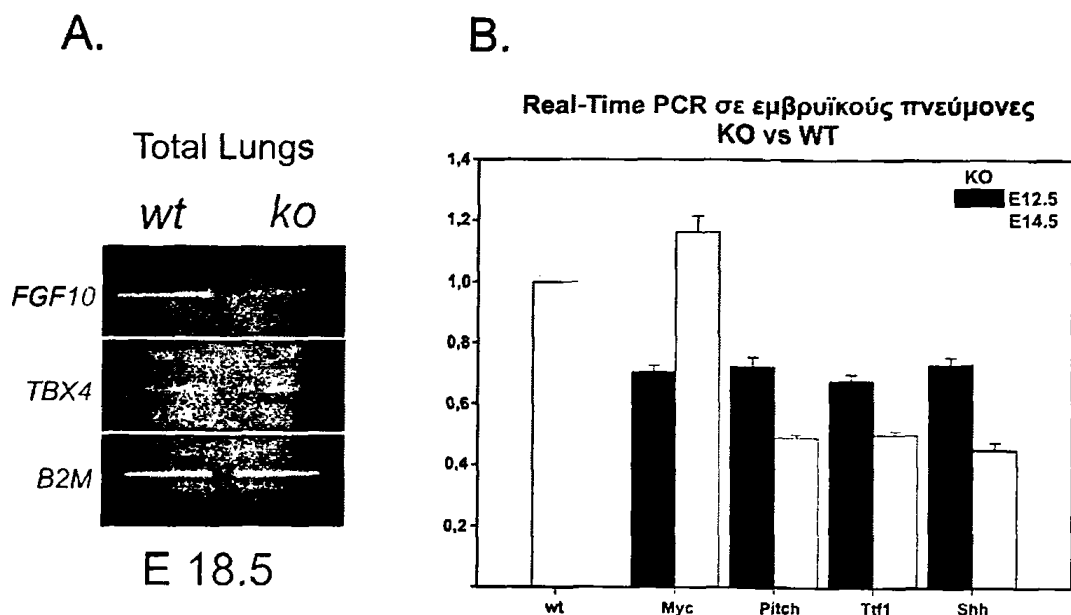
Τα μοριακά δεδομένα που προέκυψαν από τις αναλύσεις στους εμβρυικούς ινοβλάστες αποτέλεσαν μια σημαντική ένδειξη για την εξήγηση του εμβρυϊκού φαινοτύπου στον πνεύμονα των μεταλλαγμένων ποντικών και οδήγησαν τη μελέτη μας προς αυτή την κατεύθυνση. Δεδομένου ότι ο FGF10 είναι το βασικό μόριο που επάγει τον πολλαπλασιασμό του πνευμονικού επιθηλίου και την ανάπτυξη επιθηλιακών εκβλαστημάτων (buds), εξετάσαμε την ανοσοϊστοχημική κατανομή της πρωτεΐνης του FGF10 σε εμβρυικούς πνεύμονες ηλικίας E14.5. Η έκφραση του FGF10 ανιχνεύεται φυσιολογικά στην περιοχή του μεσοδέρματος που εφάπτεται με τις παρυφές του αναπτυσσόμενου επιθηλίου. Όπως αναμενόταν, στους πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην έκφραση του FGF10 στις αντίστοιχες περιοχές (εικόνα 6A). Για να συσχετίσουμε τον μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο πνευμονικό μεσέγγυμα με τη μειωμένη έκφραση του FGF10, εξετάσαμε την ανοσοϊστοχημική κατανομή των πρωτεϊνών pERK1/2. Οι pERKs1/2 είναι η ενεργοποιημένη μορφή των αντίστοιχων ERK πρωτεϊνών και ανήκουν στο μονοπάτι των MAP κινασών. Το μονοπάτι των ERKs εκτός των άλλων ενεργοποιείται και από το μοριακό μονοπάτι των FGF υποδοχέων. Πράγματι, στους μεταλλαγμένους πνεύμονες μόνο σε ένα μικρό αριθμό κυττάρων υπήρχε διακριτή έκφραση των pERKs (εικόνα 6A). Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση της μείωσης του FGF10 στην ενεργοποίηση του BMP4 μονοπατιού. Η έκφραση της πρωτεΐνης του BMP4 στον πνεύμονα επάγεται κυρίως από τον FGF10 και η πρόσδεση του BMP4 στον αντίστοιχο υποδοχέα του, ενεργοποιεί το μονοπάτι των pSMAD 1/5/8. Ακολούθως, εξετάσαμε την ανοσοϊστοχημική κατανομή των πρωτεϊνών pSMAD 1/5/8 σε εμβρυϊκούς πνεύμονες ηλικίας E15.5. Όπως αναμενόταν η κατανομή των pSMAD1/5/8 στους πνεύμονες που υπολείπονται της HuR περιοριζόταν σε ένα πολύ μικρό αριθμό κυττάρων. Εν αντιθέσει, στους πνεύμονες φυσικού τύπου οι pSMAD1/5/8 ανιχνεύονταν στη μεγαλύτερη επιφάνεια του μεσεγγύματος και στην απώτερη περιοχή του αναπτυσσόμενου πνευμονικού επιθηλίου (εικόνα 6A). Παράλληλα επιβεβαιώσαμε τη μείωση της έκφρασης των mRNAs του FGF10 και του TBX4 σε πνευμονικά εκχυλίσματα μεταλλαγμένων ποντικών ηλικίας E18.5 (εικόνα 7A).





Εικόνα 6. Η απώλεια της HuR *in vivo* επηρεάζει την έκφραση του FGF10 και την ενεργοποίηση των pERK1/2 και pSMAD1/5/8 στο πνευμονικό επιθήλιο εμβρύων. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της κατανομής των FGF10, pERK1/2 και pSMAD1/5/8. Διακρίνεται η έντονη έκφραση του FGF10 στις παρυφές του αναπτυσσόμενου πνευμονικού επιθηλίου εμβρύων φυσικού τύπου σε αντίθεση με τη σημαντική μείωσή του σε έμβρυα με καθολική απαλοιφή της HuR (επάνω). Αντιστοίχως, απουσία της HuR δεν πραγματοποιείται αποτελεσματική ενεργοποίηση της κινάσης ERK1/2 (pERK1/2 FITC: πράσινο, DAPI: πυρηνική χρώση) καθώς και του SMAD1/5/8 (Fast Blue: μπλε, πυρηνική χρώση: Nuclear Fast Red)





Εικόνα 7. Η καθολική απαλοιφή της HuR στον πνεύμονα επηρεάζει το μοριακό δίκτυο αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με την πρωτεΐνη του FGF10.

(Α) Ημιοσοτική RT-PCR συγκριτική ανάλυση της έκφρασης του TBX4 και FGF10 σε εκχυλίσματα RNA εμβρυϊκών πνευμόνων στην ηλικία E18.5. (Γ) Ποσοτική Real-Time PCR σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μορίων TTF1, Nmyc, Shh και Pitch σε εκχυλίσματα RNA εμβρυϊκών πνευμόνων στην ηλικία E12.5 και E14.5. Ως γονίδιο ποσοτικής αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το L32.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μορφογένεση του πνεύμονα σε εκχυλίσματα RNA εμβρυϊκών πνευμόνων ηλικίας E12.5 και E14.5. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η διαταραχή στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα των μεταλλαγμένων ποντικών, αρχίζει να εμφανίζεται στην ηλικία E12.5. Κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια οι μεταγραφικοί παράγοντες TTF1 και Nmyc παίζουν καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό και στη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου. Σε εμβρυϊκούς πνεύμονες ηλικίας E12.5 και E14.5 που υπολείπονται της HuR, η έκφραση του TTF1 ήταν μειωμένη κατά 33% και 50% αντίστοιχα. Στην περίπτωση του Nmyc, η έκφρασή του στους πνεύμονες των μεταλλαγμένων ποντικών ήταν ελαττωμένη κατά 30% σε ηλικία E12.5, ενώ ήταν αυξημένη κατά 16% στην ηλικία E14.5. Επιπρόσθετα εξετάσαμε στις αντίστοιχες ηλικίες την έκφραση των μορίων Shh και Pitch. Η πρωτεΐνη του Shh εκκρίνεται από

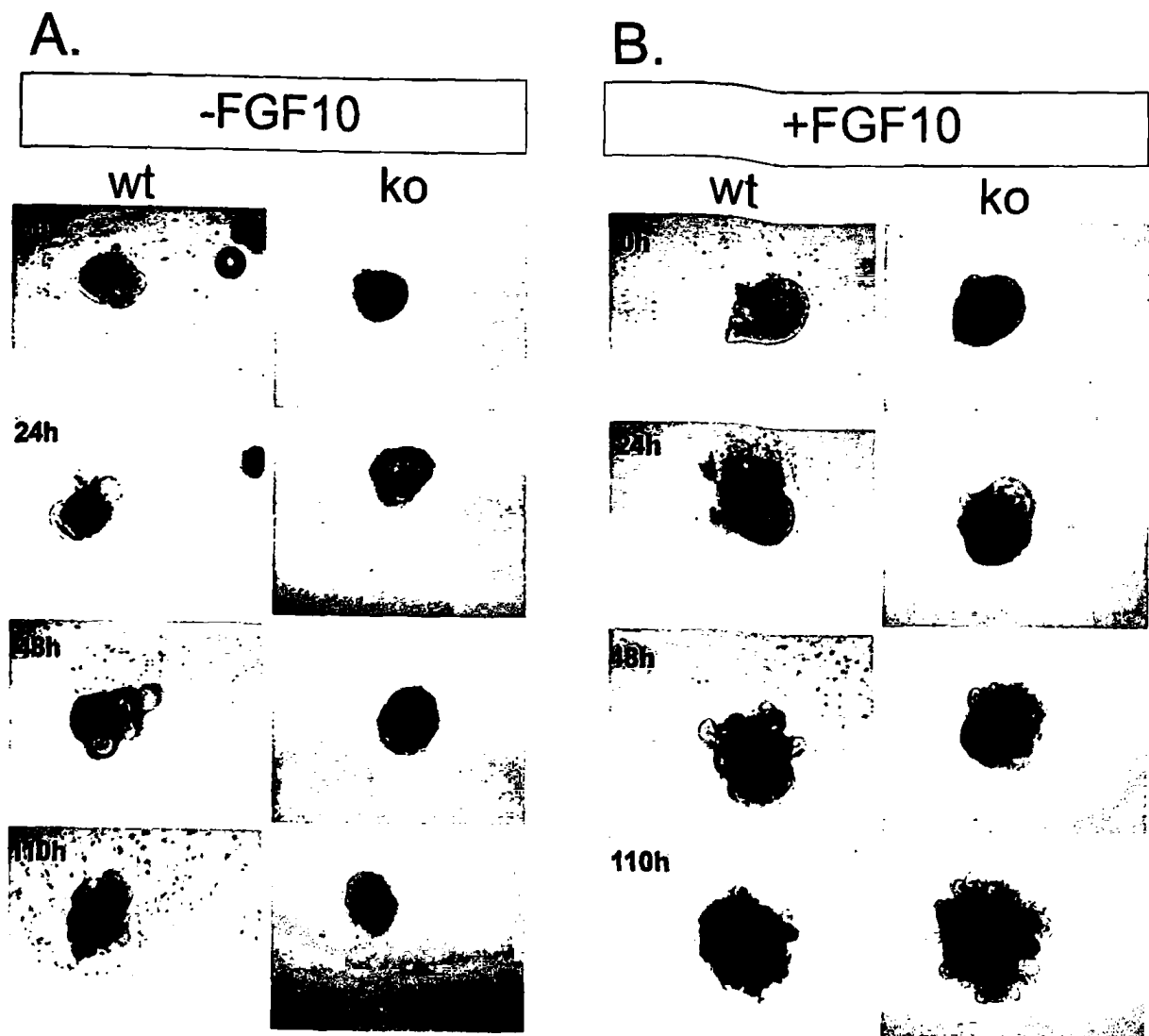
τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα ως απόκριση στον παράγοντα FGF10 (εικόνα 7B). Ακολούθως, η πρωτεΐνη Shh προσδένεται από τα μεσεγχοματικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα Patch, ενεργοποιώντας το Shh μονοπάτι. Στην περίπτωση των μεταλλαγμένων ποντικών, τα επίπεδα έκφρασης του Shh καθώς και του αντίστοιχου υποδοχέα Patch, ήταν ελαττωμένα κατά 30% περίπου, στην ηλικία E12.5. Μάλιστα, στην ηλικία E14.5, τα επίπεδα έκφρασής τους ήταν ελαττωμένα κατά 55% και 65% αντίστοιχα (εικόνα 6B).

3.1.5 Η εξωγενής χορήγηση του παράγοντα FGF10 σε πνευμονικά εκβλαστήματα ηλικίας E11.5, αναστρέφει το φαινότυπο.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, αναδείχθηκε ότι η καθολική απώλεια της HuR επηρεάζει αρνητικά (άμεσα ή έμμεσα) την έκφραση βασικών μορίων για τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου. Κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαταραχή φαίνεται να παίζει η μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης του FGF10, καθώς αυτός ο παράγοντας αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, υποθέσαμε πως η εξωγενής χορήγηση FGF10 σε ένα πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, θα μπορούσε να αναστρέψει τον φαινότυπο στους πνεύμονες των μεταλλαγμένων εμβρύων. Συνεπώς, σε καλλιέργειες πνευμονικών εκβλαστημάτων που απομονώθηκαν από έμβρυα ηλικίας E11.5, εξετάστηκε η ικανότητά τους να διαμορφώνουν διακλαδώσεις παρουσία/απουσία εξωγενούς FGF10. Αφού καλλιεργήθηκαν για τέσσερις μέρες, παρατηρήσαμε ότι απουσία εξωγενούς FGF10 τα εκβλαστήματα φυσικού τύπου είχαν δημιουργήσει κάποιες διογκωμένες διακλαδώσεις. Αντίθετα στα πνευμονικά εκβλαστήματα των μεταλλαγμένων ποντικών δεν υπήρχαν εμφανείς διακλαδώσεις (εικόνα 8A). Παρόλα αυτά η παρουσία εξωγενούς FGF10 στο θρεπτικό μέσο, προκάλεσε τη δημιουργία πολυάριθμων διακριτών διακλαδώσεων στα εκβλαστήματα και των δύο γονοτύπων (εικόνα 8B). Αποδεικνύεται λοιπόν, ότι τα εκβλαστήματα που υπολείπονται της HuR, αποκρίνονται στην εξωγενή χορήγηση του FGF10 και διαμορφώνουν διακλαδιζόμενες δομές προσομοιάζοντας τη διαδικασία μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου.





Εικόνα 8. Εξωγενής χορήγηση FGF10 σε πνευμονικά εκβλαστήματα εμβρύων ηλικίας E11.5 αναστρέφει το φαινότυπο.

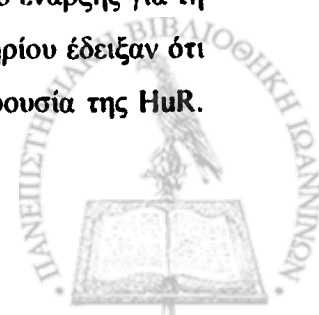
(A) Απουσία FGF10, μόνο τα εκβλαστήματα φυσικού τύπου εμφανίζουν την ικανότητα να προβάλουν διακλαδιζόμενες δομές. (B) Η παρουσία του FGF10 στην καλλιέργεια πνευμονικών εκβλαστημάτων (500 ng/mL) προκαλεί τη δημιουργία πολυάριθμων διακλαδώσεων και στους δύο γονότυπους.

3.2 Ο ρόλος της HuR στην παθοφυσιολογία και το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου

3.2.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο επιθήλιο του πνεύμονα.

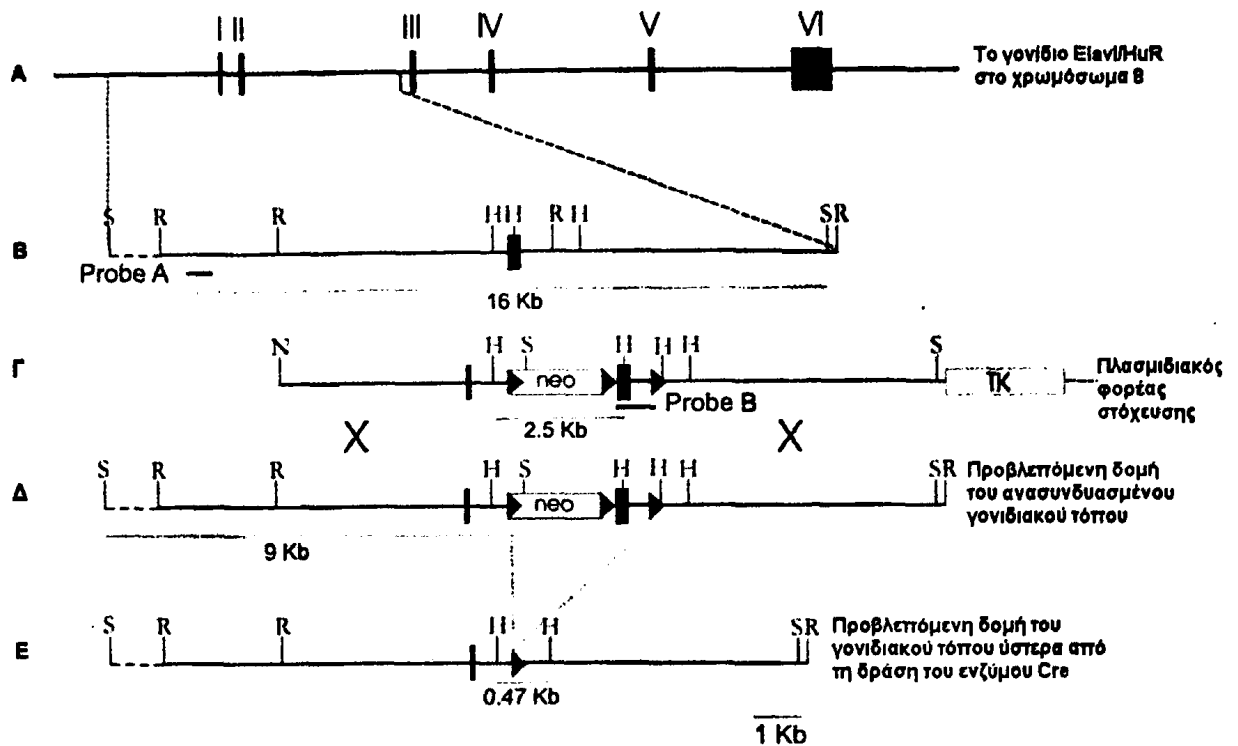
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η καθολική απαλοιφή της HuR στον ποντικό είναι εμβρυϊκά θνησιγενής και καταστέλλει την εμβρυϊκή ανάπτυξη στο στάδιο της γαστριδίωσης (Katsanou et al 2009). Συνεπώς η ανάλυση των δράσεων της HuR στη φυσιολογία του ανεπτυγμένου πνευμονικού επιθηλίου, αποτρέπεται στο πλαίσιο της καθολικής της απαλοιφής. Για να παρακάμψουμε αυτό το πρόβλημα αναπτύξαμε συστήματα ιστοειδικής και χρονικής απορρυθμίσσης του γονιδίου της, βασιζόμενοι στο σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP του βακτηριοφάγου P1 (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ). Στο σύστημα αυτό, τμήμα γονιδιωματικού τόπου που σχετίζεται με την έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης, τίθεται μεταξύ αλληλουχιών ανασυνδυασμού loxP. Η παρουσία της ρεκομβινάσης Cre εναλλάσσει τα ομόλογα τμήματα των loxP αφαιρώντας με αυτόν τον τρόπο την ενδιάμεση γονιδιωματική αλληλουχία. Η ιστοειδική παρουσία της Cre επιτυγχάνεται με τη διαγονιδιακή της υπερέκφραση από ιστοειδικούς υποκινητές. Εναλλακτικά, και στις περιπτώσεις όπου απαιτείται ο χρονικός καθορισμός του ανασυνδυασμού, το σύστημα Cre/loxP μπορεί να συνδυαστεί με συστήματα διενεργοποιητών Τετρακυκλίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο υποκινητής έκφρασης της Cre μπορεί να είναι καθολικός και πρέπει να περιλαμβάνει αλληλουχίες χειρισμού του διενεργοποιητή (Tet operator sequences/Tet responsive element, TRE). Η ιστοειδικότητα της έκφρασης προκύπτει από την έκφραση ενός διαγονιδίου διενεργοποιητή reverse Tetracycline transactivator (rtTA) υπό τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή.

Σύμφωνα με την παραπάνω στρατηγική, και για την απαλοιφή της HuR από κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου σε στάδια πέραν της γαστριδίωσης χρησιμοποιούμε 3 διαγονιδιακά αλληλόμορφα. Το πρώτο έχει προκύψει από την γονιδιακή στόχευση του γονιδίου *Elavl/HuR* (εικόνα 9) του ποντικού για την τοποθέτηση των αλληλουχιών loxP αλληλουχίες εκατέρωθεν του εξωνίου 2 του γονιδίου της HuR (αλλήλιο *Elavl^{lox}*). Το εξώνιο 2 φέρει το κωδικόνιο έναρξης για τη σύνθεση της πρωτεΐνης HuR και προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι η απαλοιφή του από το γονιδίωμα εμποδίζει ολοκληρωτικά την παρουσία της HuR.



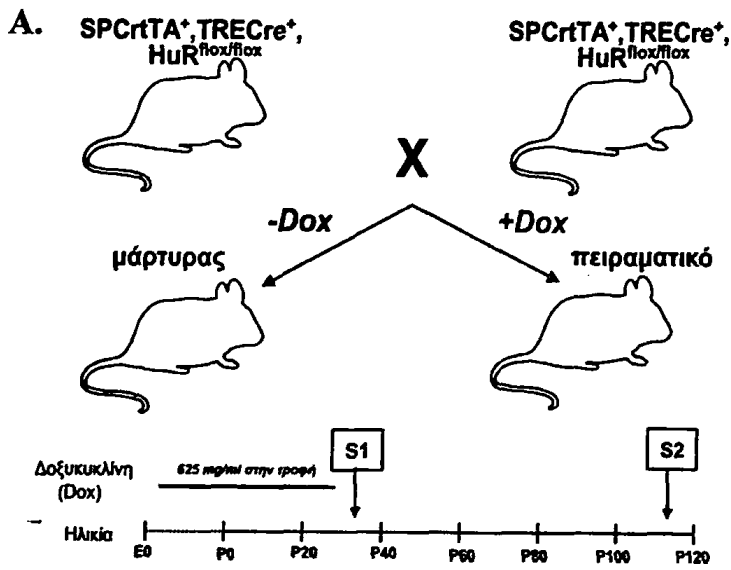
Το δεύτερο διαγονιδιακό σύστημα, προέκυψε από την προσθήκη ικών διαγονιδίων της CRE υπό τον έλεγχο ενός ελάχιστου ικού υποκινητή (Cytomegalovirus minimal promoter), ο οποίος περιλαμβάνει στοιχεία απόκρισης του διενεργοποιητή τετρακυκλίνης (διαγονιδιακό αλληλίο *TRECre*). Τέλος, το τρίτο διαγονιδιακό σύστημα περιλαμβάνει τη διαγονιδιακή προσθήκη του βακτηριακού rTA υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης Surfactant Protein C-SPC (διαγονιδιακό αλληλίο *SPC-rTA*). Το γονίδιο της SPC εκφράζεται αποκλειστικά στο επιθήλιο του πνεύμονα κατά την ανάπτυξη (μέγιστη έκφραση την 9^η εμβρυϊκή μέρα) και η πρωτεΐνη SPC εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II του πνεύμονα. Τα διαγονιδιακά αλληλία συνυπάρχουν, μετά από τις διασταυρώσεις ποντικών με γονότυπους *SPCrtTA⁺*, *TRECre⁺* και *Elavl/HuR^{flx/flx}* σε μικτό γενετικό υπόστρωμα ποντικών C57Bl/6,129Ola, για την δημιουργία των τριπλών διαγονιδιακών συστημάτων *SPCrtTA⁺TRECre⁺ Elavl/HuR^{flx/flx}* (*SRCHuR^{fl}* για απλούστευση). Για την απαλοιφή της HuR σε αυτό το σύστημα, χορηγήθηκε δοξυκυκλίνη στην ξηρά τροφή των ποντικών *SRCHuR^{flx/flx}* από την πρώτη ημέρα της κύησης [E1.0] έως και την 25 ημέρα μετά τη γέννηση [P25] (εικόνα 10A). Από τη συγκριτική γονοτυπική ανάλυση διαφόρων οργάνων των απογόνων με γονότυπο *SRCHuR^{fl}* για την παρουσία αυτοσωμικού ανασυνδυασμού, διαπιστώθηκε ότι ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται επαγωγίμως μόνο στον πνεύμονα και διατηρείται και μετά το πέρας της χορήγησης δοξυκυκλίνης (εικόνα 11A). Παρόλα αυτά σε πρωτεϊνικά πνευμονικά εκχυλίσματα τριπλά διαγονιδιακών ποντικών, παρουσία (πειραματικοί) ή απουσία (μάρτυρες) δοξυκυκλίνης στην τροφή, παρατηρήσαμε μια σχετική «διαρροή» του συστήματος στους μάρτυρες ποντικούς. Οι ποντικοί αυτοί εμφάνιζαν σποραδικά ένα σημαντικό ποσοστό ανασυνδυασμού της HuR με αντίστοιχη μείωση στην έκφραση της πρωτεΐνης HuR (εικόνα 11B). Για το λόγο αυτό, στα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα επαγωγικής απαλοιφής της HuR, θεωρήθηκαν ως μάρτυρες οι διπλά διαγονιδιακοί ποντικοί (*SPCrtTA⁺/HuR^{flx/flx}* ή *TRECre⁺/HuR^{flx/flx}*) ή ποντικοί με γονότυπο *HuR^{flx/flx}*.





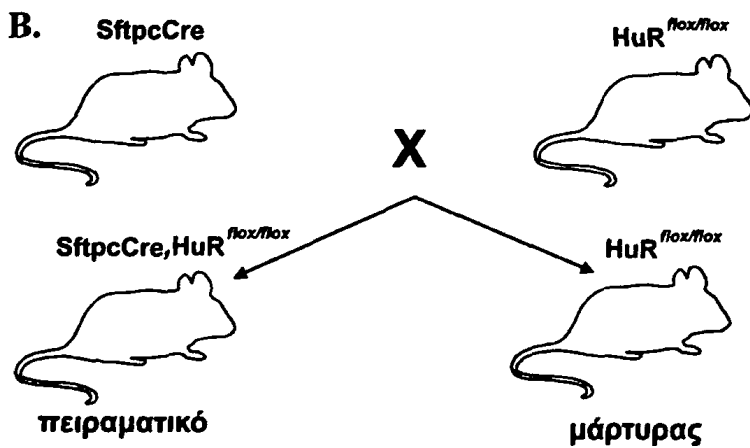
Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα στόχευσης και της στρατηγικής που ακολουθήθηκε για την πειραματική κυτταροειδική απαλοιφή της HuR από τον ποντικό, χρησιμοποιώντας το σύστημα ομόλογου ανασυνδυασμού Cre/LoxP

(Α) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιακού τόπου της HuR στο χρωμόσωμα 8 του ποντικού. (Β) Λεπτομερής δομή του γονιδιακού τόπου της HuR ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα στόχευσης. (Γ) Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα στόχευσης και (Δ) Προβλεπόμενη δομή του ανασυνδυασμένου γονιδιακού τόπου της HuR ύστερα από την επίτευξη ομόλογου ανασυνδυασμού στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Το μαύρο παραλληλόγραμμο αντιπροσωπεύει το εξόνιο 2, το οποίο είναι απαραίτητο για την έκφραση του γονιδίου της HuR, ενώ τα ανοιχτόχρωμα παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν τα γονίδια επιλογής (νεομυκίνη -neo και κινάση της θυμιδίνης - TK). Οι χρωματιστές κεφαλές βέλους καθορίζουν τη θέση των LoxP αλληλουχιών. Επιπλέον, καθορίζεται η θέση του εξωτερικού 5' και του εσωτερικού 3' ανιχνευτή (Probe A και Probe B αντίστοιχα). Αναφέρονται οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων: H, HindIII; R, EcoRI; N, Not; S, StuI. (Ε) Προβλεπόμενη δομή του γονιδιακού τόπου της HuR ύστερα από τη δράση της ρεκομπινάσης Cre και της πλήρους αποκοπής του τμήματος DNA που βρίσκεται ανάμεσα στις αλληλουχίες LoxP και περιλαμβάνει την κασέτα neo και το εξόνιο 2



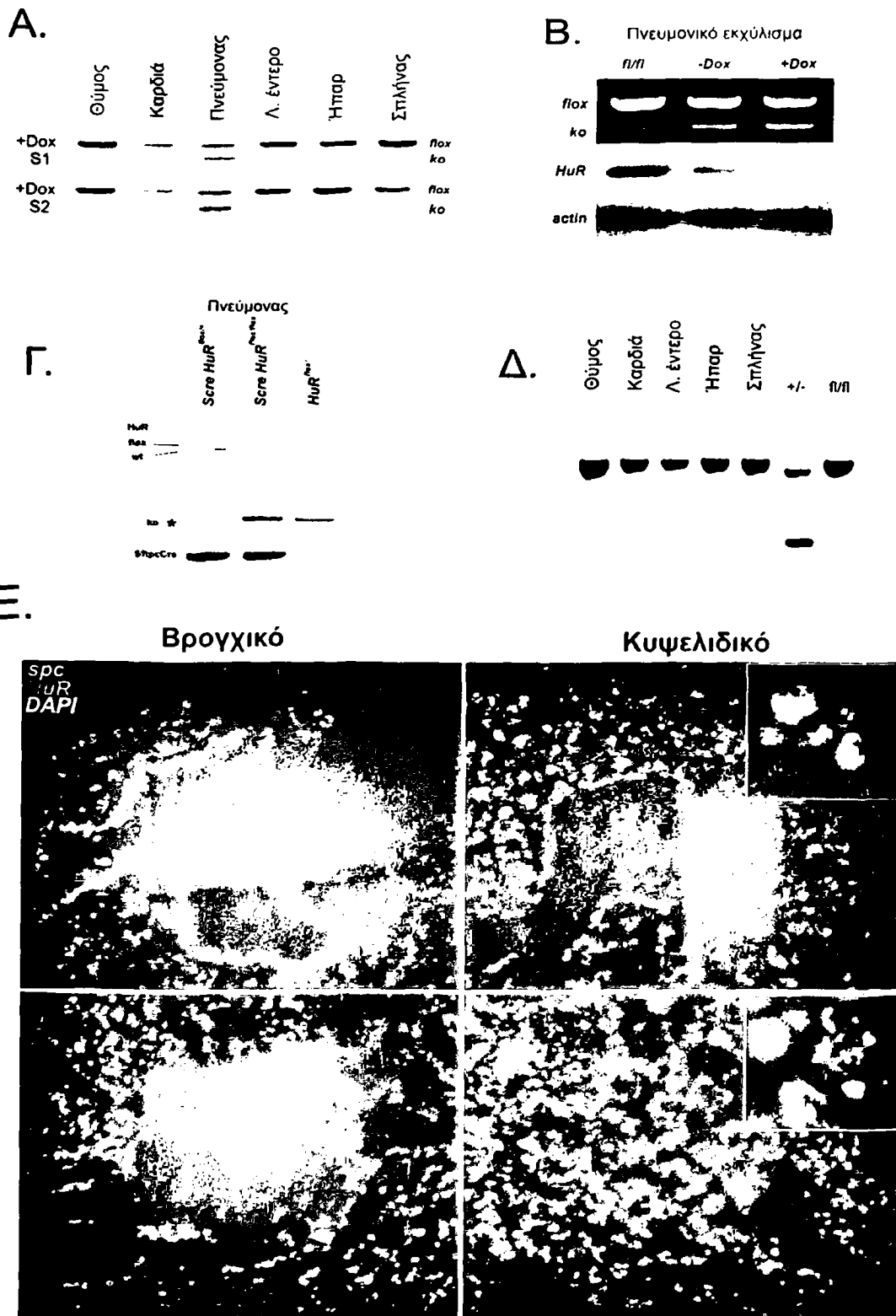
Εικόνα 10.

Δημιουργία διαγονιδιακών συστημάτων ιστοειδικής απαλοιφής της HuR Διασταυρώσεις για την ανάπτυξη των διαγονιδιακών ποντικών $SRCHuR^{fl/fl}$ (A) και $Scrc HuR^{flx/flx}$ (B). S1 και S2 αντιστοιχούν στα χρονικά πλαίσια συλλογής πειραματικού υλικού.



Παράλληλα, αναπτύξαμε ένα νέο διαγονιδιακό σύστημα ιστοειδικής απαλοιφής της HuR στο επιθήλιο του πνεύμονα, βασιζόμενοι στο σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP χωρίς να απαιτείται το σύστημα διενεργοποιητών τετρακυκλίνης. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιούμε δύο διαγονιδιακά αλληλόμορφα. Το πρώτο, όπως έχει προαναφερθεί έχει προκύψει από την γονιδιακή στόχευση του γονιδίου *Elavl1/HuR* του ποντικού για την τοποθέτηση των αλληλουχιών loxP εκατέρωθεν του εξωνίου 2 του γονιδίου της HuR (αλλήλιο *HuR/Elavl1^{lox}*). Το δεύτερο διαγονιδιακό σύστημα, προέκυψε από την προσθήκη τροποποιημένου ιικού διαγονιδίου της CRE υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης Surfactant Protein C-SPC (διαγονιδιακό αλλήλιο *Sftpc-Cre*). Τα διαγονιδιακά αλλήλια συνυπάρχουν, μετά από τις διασταυρώσεις ποντικών με γονότυπους *SPC-Cre⁺* και *Elavl1/HuR^{lox/lox}* σε γενετικό υπόστρωμα ποντικών C57Bl/6, για τη δημιουργία των διπλών διαγονιδιακών συστημάτων *SPC-Cre⁺ Elavl1/HuR^{lox/lox}* (*Scrc⁺ HuR^{lox/lox}*, για απλούστευση) (εικόνα 10B). Από τη συγκριτική γονοτυπική ανάλυση διαφόρων οργάνων των ποντικών αυτών για την παρουσία αυτοσωμικού ανασυνδυασμού διαπιστώθηκε ότι ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται αποκλειστικά στον πνεύμονα (εικόνα 11 Γ και Δ) Επιπλέον εξακριβώθηκε και η απαλοιφή της πρωτεΐνης HuR αποκλειστικά στο επιθήλιο του πνεύμονα με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της HuR και της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης SPC, η οποία αποτελεί μοριακός δείκτης για τον χαρακτηρισμό των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II. (εικόνα 11E).





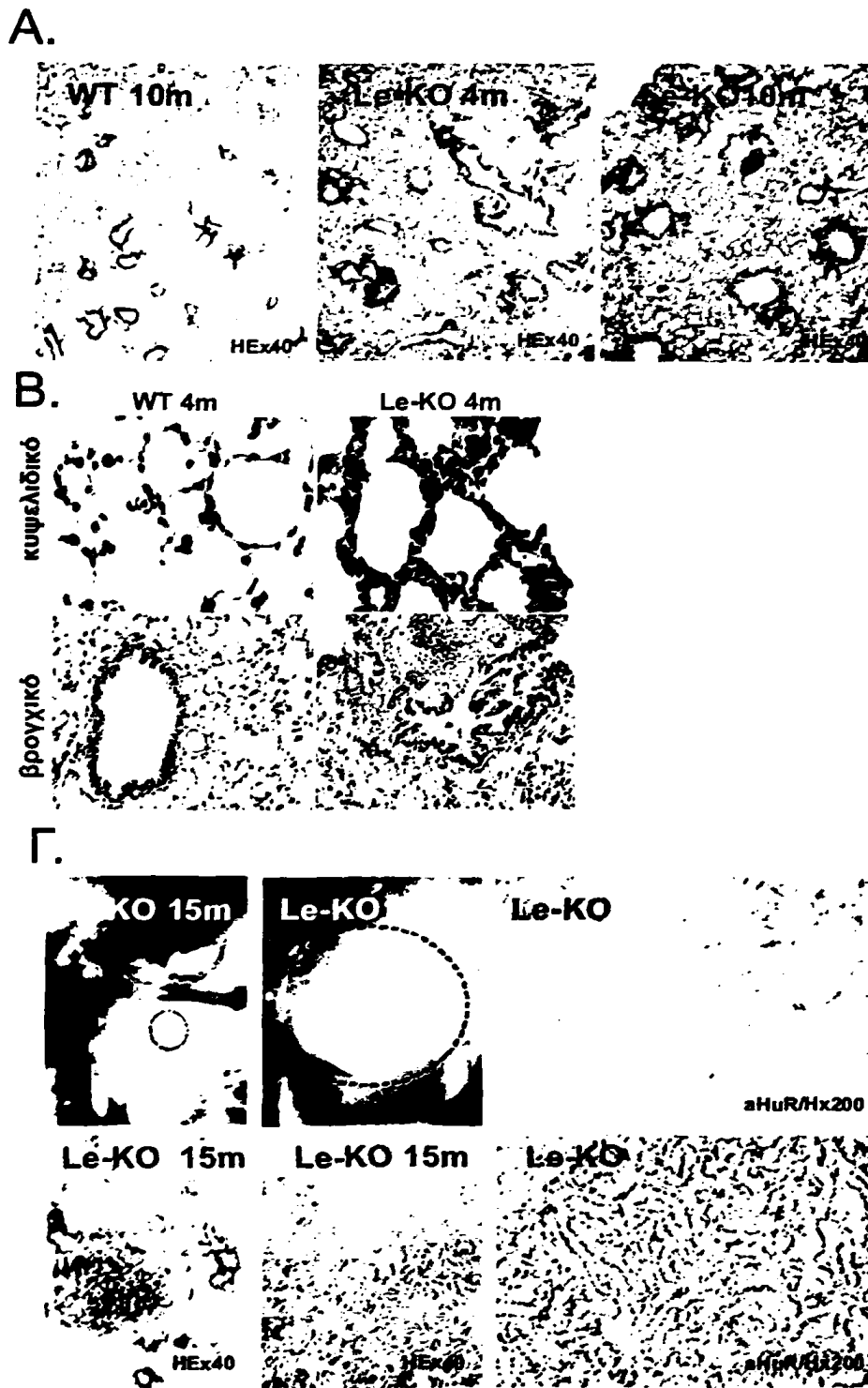
Εικόνα 11. Ιστοειδική απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο ποντικών. Διαγονιδιακοί ποντικοί με γονότυπο $SRC^{HuR^{fl/fl}}$ παρουσία ή απουσία δοξυκυκλίνης απομονώθηκαν σε δύο χρονικά πλαίσια S1 και S2 αντίστοιχα, και εξετάστηκε η ιστοειδική απαλοιφή της HuR με PCR ανάλυση (Α) και ανοσοσύτρωμα κατά Western (Β). Αντίστοιχα εξετάστηκε η ιστοειδική απαλοιφή της HuR στους ποντικούς $Scre^{HuR^{fl/fl}}$ με PCR (Γ και Δ) και με ανοσοφθορισμό. SPC (FITC-πράσινη χρώση), HuR (Alexa555-κόκκινη χρώση) DAPI (μπλε χρώση)



3.2.2 Η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο προδιαθέτει την ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων.

Όπως αναφέρθηκε στο 1ο μέρος των αποτελεσμάτων, η απώλεια της HuR στο εμβρυϊκό επιθήλιο του πνεύμονα δεν διαταράσσει τις αναπτυξιακές διαδικασίες που καθορίζουν τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου. Παρόλα αυτά, η ιστοειδική απαλοιφή της HuR επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογία του πνευμονικού επιθηλίου. Συγκεκριμένα, ποντικοί που υπολείπονται της HuR αποκλειστικά στο πνευμονικό επιθήλιο (Le-KO για ευκολία), θυσιάστηκαν σε διαδοχικά χρονικά πλαίσια και συλλέξαμε τους πνεύμονές τους όπου και εξετάστηκαν συγκριτικά. Μακροσκοπικά παρατηρήσαμε τη σποραδική εμφάνιση αδενωμάτων και καρκινωμάτων στους Le-KO ποντικούς ηλικίας 15 μηνών (εικόνα 12Γ). Μάλιστα τα αδενοκαρκινώματα αυτά εμφάνιζαν μηδαμινή έως μωσαϊκή ανίχνευση της πρωτεΐνης HuR (εικόνα 12Γ). Αντίστοιχα, οι πνεύμονες των Le-KO σε νεώτερες ηλικίες εμφάνιζαν μια κλιμακούμενη παθολογική κατάσταση, έναντι αυτών του φυσικού τύπου (WT για λόγους ευκολίας). Συγκεκριμένα, ήδη σε ηλικία τεσσάρων μηνών, παρατηρήθηκε στο κυψελιδικό τοίχωμα των Le-KO ποντικών αυξημένη κυτταροβρίθεια και πάχυνση καθώς και εστίες ίνωσης. Ανάλογη ήταν και η εικόνα στο βρογχικό επιθήλιο των αντίστοιχων ποντικών, όπου παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα πάχυνσης των βρόγχων, υψηλά ποσοστά ατυπικών κυττάρων καθώς και εκτεταμένη ίνωση και φλεγμονή (εικόνα 12 Α και Β). Συνεπώς, η απουσία της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο προκαλεί διαταραχές στη φυσιολογία του πνεύμονα με προοδευτικό τρόπο, προδιαθέτοντας τον ιστό σε καρκινικό μετασχηματισμό.





Εικόνα 12. Η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο προκαλεί διαταραχές στη φυσιολογία του πνεύμονα και προδιαθέτει την εμφάνιση νεοπλασιών.

(Α)(Β) Μικροσκοπική ανάλυση σε δείγματα πνευμόνων από ποντικούς ηλικίας 4 και 10 μηνών σε τομές παραφίνης. (Γ) Μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση σε δείγματα πνευμόνων από ποντικούς Le-KO ηλικίας 15 μηνών, καθώς και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της κατανομής της πρωτεΐνης HuR σε περιοχές νεοπλασίας.

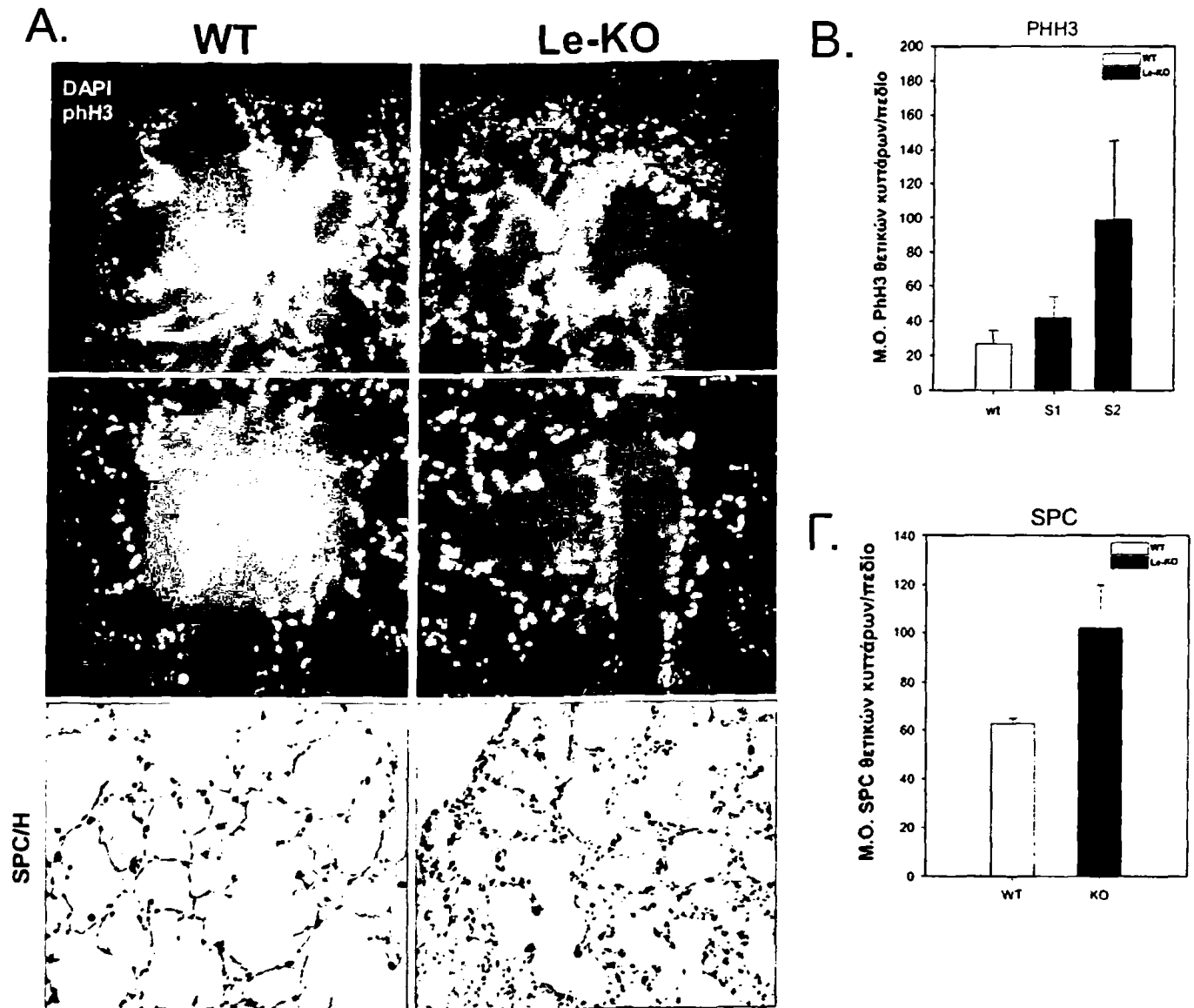


3.2.3 Οι διαγονιδιακοί ποντικοί που υπολείπονται της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο, εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά βλαστικών κυττάρων.

Δεδομένου ότι η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο προκαλεί υπερπλασία και αυξημένη κυτταροβρίθεια, καθώς και το γεγονός ότι η HuR ελέγχει την έκφραση πρώτο-ογκογονιδίων, θεωρήσαμε ότι η απώλειά της επηρεάζει το δυναμικό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον πνεύμονα. Για να εξετάσουμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απομονώθηκαν πνεύμονες ηλικίας 30 (S1) και 110 ημερών (S2) αντίστοιχα, και εξετάστηκε η ανοσοϊστοχημική κατανομή του μιτωτικού δείκτη p_{H3}. Πράγματι, στο πνευμονικό επιθήλιο των Le-KO ποντικών παρατηρήθηκε μια προοδευτική αύξηση των κυττάρων που εξέφραζαν τον δείκτη p_{H3}. Συγκεκριμένα, η κατανομή του p_{H3} ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στην περιοχή των βρογχο-κυψελιδικών αγωγών σύζευξης (BADJ) όπου εντοπίζονται τα βρογχο-κυψελιδικά βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς BASCs (εικόνα 13). Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε μια σημαντική αύξηση στην κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη SPC του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο οποίος εκφράζεται στα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα καθώς και στα BASCs.

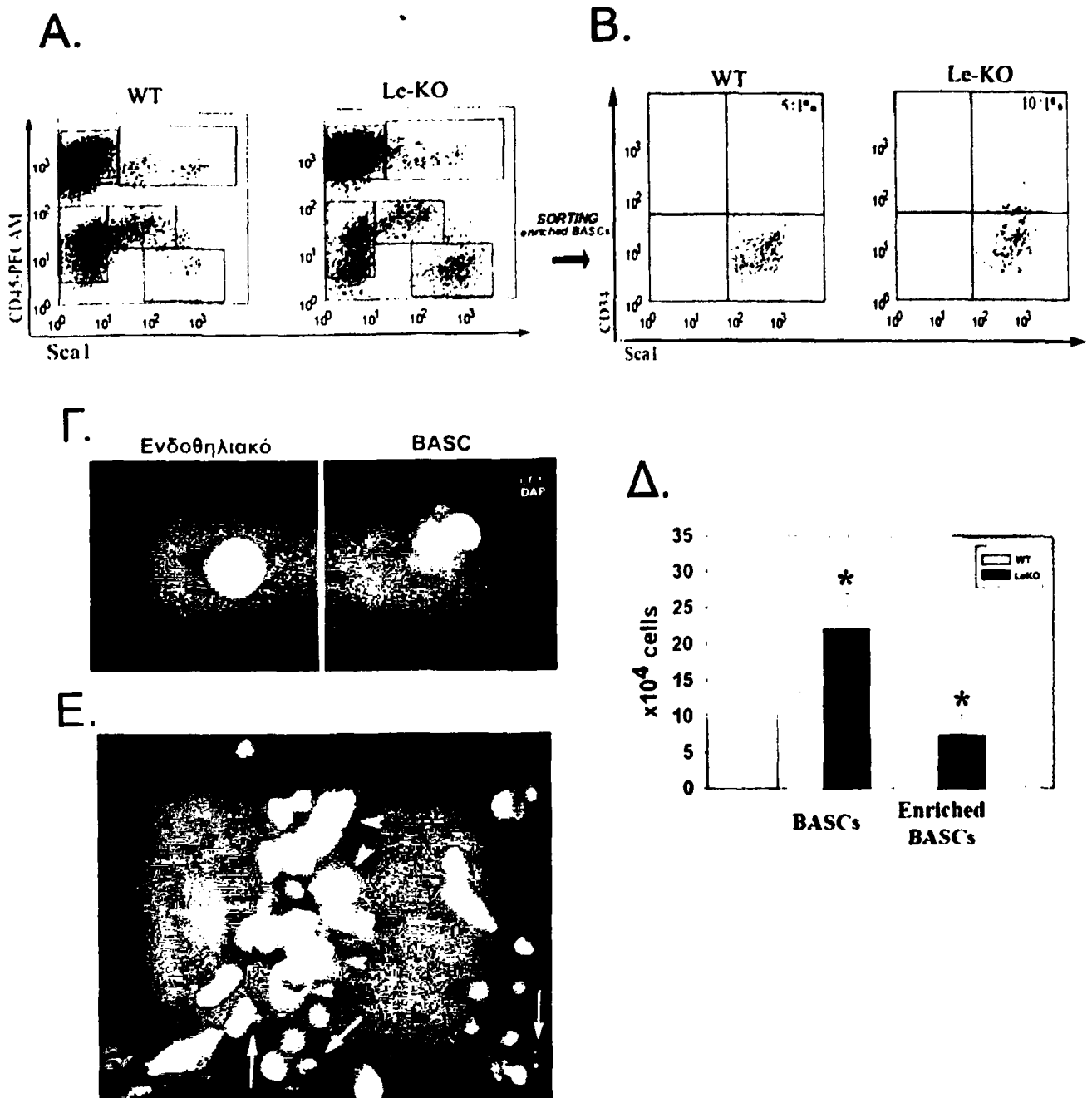
Τα πνευμονικά βλαστικά κύτταρα, προσδιορίζονται κατά τη βιβλιογραφία (Kim et al, Cell 2005) με δείκτες επιφανείας, ως Sca1⁺, CD34⁺, Pecam1, CD45⁻ καθώς και από την ταυτόχρονη παρουσία των πρωτεϊνών SPC και CC10 στο κυτταρόπλασμά τους. Μάλιστα, ο αριθμός καθώς και η έκτοπη κατανομή των BASCs, θεωρούνται ως δείκτες για την έναρξη των νεοπλαστικών διεργασιών. Συνεπώς θεωρήσαμε ότι τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στο πνευμονικό επιθήλιο των Le-KO σχετίζονται με αλλαγές στον πληθυσμό των BASCs. Πράγματι με κυτταρομετρική ανάλυση ροής (FACs ανάλυση), διαπιστώσαμε ότι ο αριθμός των BASCs ήταν διπλάσιος στα δείγματα των πειραματικών ποντικών έναντι των ποντικών φυσικού τύπου (εικόνα 14 A, B και Δ). Με κυτταρομετρικό διαχωρισμό (Sorting) απομονώσαμε τα BASCs και επιβεβαιώσαμε ανοσοϊστοχημικά τον συνεντοπισμό των πρωτεϊνών SPC και CC10 (εικόνα 14Γ) στο κυτταρόπλασμά τους. Παράλληλα επιβεβαιώσαμε τον εντοπισμό των BASCs σε τομές παραφίνης (εικόνα 14E) Συνεπώς η απώλεια της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο αυξάνει το δυναμικό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον πνεύμονα και επηρεάζει σημαντικά τη «δεξαμενή» των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων.





Εικόνα 13. Η HuR επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο πνευμονικό επιθήλιο.

(Α) Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των κυττάρων που εκφράζουν το μιτωτικό δείκτη pH3 και την πρωτεΐνη SPC (από κάτω). (Β)(Γ) Ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημικής κατανομής των pH3 και SPC αντίστοιχα.



Εικόνα 14. Η απώλεια της HuR συζώνει σημαντικά την πληθυσμιακή κατανομή των βρογχοκυψελιδικών βλαστικών κυττάρων (BASCs).

(Α) Κυτταρομετρική ανάλυση από ομογενοποιημένα δείγματα πνευμόνων. Ο κυτταρικός πληθυσμός που χαρακτηρίζεται βάση μοριακών δεικτών ως CD45⁺Pecam1⁺ Scal⁺, διαχωρίστηκε με βάση το μοριακό δείκτη CD34 ώστε να προσδιοριστούν οι εμπλουτισμένοι σε BASCs πληθυσμοί (Β). (Γ) Ανοσοϊστοχημική επιβεβαίωση των BASCs που απομονώθηκαν. Τα BASCs εμφανίζουν συνεντοπισμό των πρωτεϊνών SPC και CC10 στο κυτταρόπλασμά τους. (Δ) Διαγραμματική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα κυτταρομετρική ανάλυσης. (Ε) Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των BASCs σε τομές παραφίνης. Με βέλη υποδεικνύονται τα τύπου II κύτταρα και με τις άκρες βελών υποδεικνύονται τα BASCs. SPC κόκκινο-χρώμα (Alexa 555), CC10-πράσινο χρώμα (FITC), πυρήνες-μπλε χρώμα (DAPI).



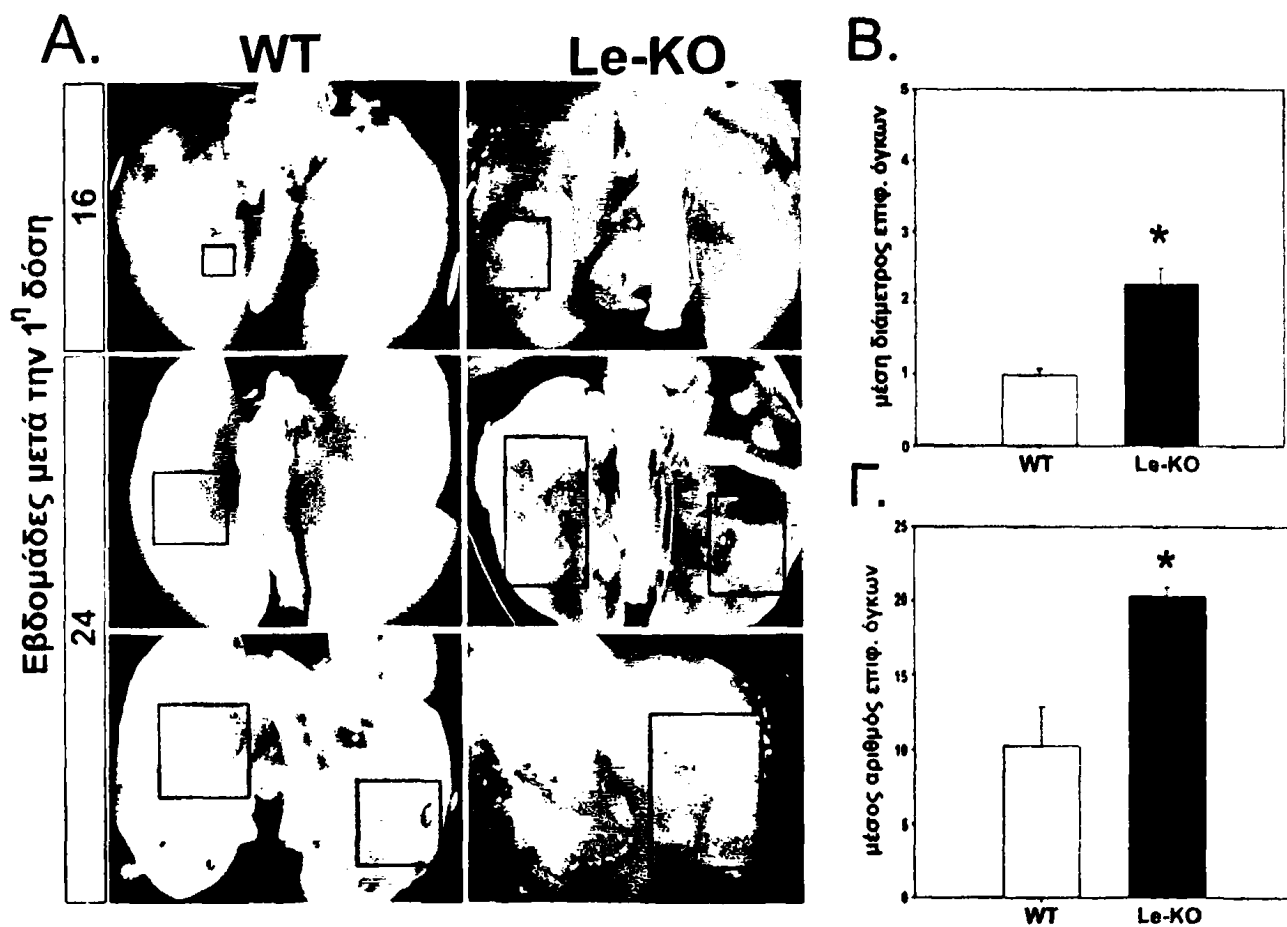
3.2.4 Η απουσία της HuR από το πνευμονικό επιθήλιο προωθεί την καρκινογένεση κατόπιν καρκινικού ερεθίσματος.

Για να αναδείξουμε το ρόλο της HuR κατά την καρκινογένεση, μελετήσαμε την απόκριση του πνευμονικού επιθηλίου των εξεταζόμενων ποντικών, έναντι χημικού ερεθίσματος με ουρεθάνη. Η ουρεθάνη είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που επάγει τον καρκίνο στο πνευμονικό επιθήλιο και χρησιμοποιείται κατά κόρον ως πειραματικό μοντέλο καρκινικής εξαλλαγής στον πνεύμονα. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ποντικοί ηλικίας ενός έως τριών μηνών ενύονται ενδοπεριτοναϊκά με 10 εβδομαδιαίες δόσεις ουρεθάνης (1 μg/g βάρους) και εξετάζονται 16 ή 24 εβδομάδες μετά την πρώτη δόση.

Όπως αναμενόταν, μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου καρκινογένεσης διαπιστώσαμε την εμφάνιση επιφανειακών νεοπλασμάτων στους πνεύμονες των ποντικών στους οποίους εφαρμόστηκε. Παρόλα αυτά, μεταξύ των εξεταζόμενων ποντικών, των δύο γονοτύπων, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Συγκεκριμένα, ο μέσος αριθμός των όγκων που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια των πνευμόνων των Le-KO ποντικών ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τον αντίστοιχο μέσο αριθμό των ποντικών φυσικού τύπου (εικόνες 15 A και Γ). Επιπρόσθετα, η μέση διάμετρος των όγκων που εξετάστηκαν μακροσκοπικά, ήταν σαφώς μεγαλύτερη στους Le-KO ποντικούς σε σύγκριση με τους WT ποντικούς (εικόνες 15 A και B). Στη συνέχεια, οι πνεύμονες που απομονώθηκαν εξετάστηκαν μικροσκοπικά σε τομές παραφίνης, όπου και διαπιστώθηκε, όπως αναμενόταν, η διαφορετική κατηγοριοποίηση μεταξύ των νεοπλασιών που εμφάνιζαν οι δύο γονότυποι. Συγκεκριμένα, οι WT ποντικοί παρουσίαζαν κυρίως αδενώματα διαφόρων τύπων (συμπαγούς και τριχοειδούς μορφής κυρίως) αλλά όχι κακοήθη καρκινώματα. Αντιθέτως, οι Le-KO ποντικοί εμφάνιζαν, εκτός από αδενώματα, μεταγενέστερα στάδια νεοπλασίας όπως αδenoκαρκινώματα, καθώς και κακοήθη καρκινώματα (εικόνα 16, H/E), γεγονός που υποδηλώνει ότι η απουσία της HuR προωθεί την καρκινογένεση. Επίσης, για να συσχετίσουμε την επιθετικότητα των όγκων στους Le-KO ποντικούς, μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική κατανομή της β-κατενίνης σε αυτούς. Η αυξημένη έκφραση καθώς και ο πυρηνικός εντοπισμός της β-κατενίνης, αποτελούν δείκτες χαμηλής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Πράγματι, στην περίπτωση των Le-KO ποντικών, παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση της β-κατενίνης, καθώς και έντονη πυρηνική κατανομή, στα κύτταρα των νεοπλασιών (εικόνα 16, b-catenin/H). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε

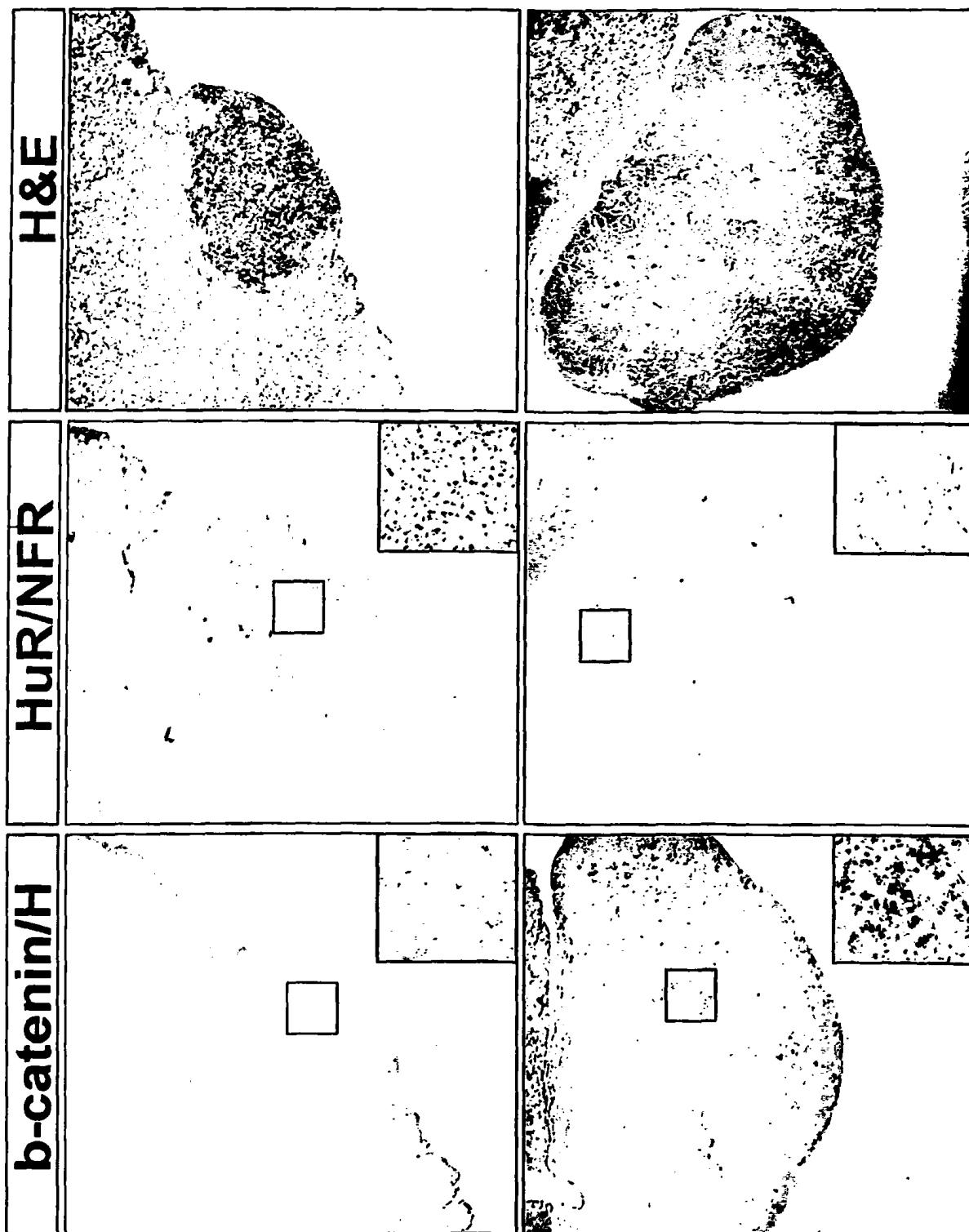


ότι η μειωμένη έκφραση της HuR σε νεοπλασίες προωθεί τη μετάβασή τους σε κακοήγη καρκινώματα.



Εικόνα 15. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου χημικής καρκινογένεσης με ουρεθάνη.

(Α) Συγκριτική ανάλυση μακροσκοπίας μεταξύ WT και Le-KO ποντικών μετά από 16 και 24 εβδομάδες από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου καρκινογένεσης. Η μέση διάμετρος (B) καθώς και μέσος αριθμός των όγκων που παρατηρήθηκαν (Γ) ήταν σημαντικά αυξημένα, στους ποντικούς Le-KO έναντι των WT.



Εικόνα 16. Οι παρατηρούμενοι όγκοι μεταξύ WT και Le-KO ποντικών διαφέρουν ιστολογικά. Μικροσκοπία και ανοσοϊστοχημική κατανομή της HuR και της β-κατενίνης στους εξεταζόμενους καρκινικούς ιστούς. Η:αιματοξυλίνη, E: εωσίνη. NFR: Nuclear Fast Red, αντίχρωση. HuR: μπλε χρώση με Fast Blue, β-κατενίνη: καφέ χρώση με DAB.

3.2.5 Προσδιορισμός των mRNAs στόχων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση

Ο φαινότυπος που παρουσιάζουν οι διαγονιδιακοί ποντικοί στον πνεύμονα, αναδεικνύει ότι η απώλεια της HuR από το πνευμονικό επιθήλιο προκαλεί διαταραχές στη γονιδιακή έκφραση καρκινοσχετιζόμενων γονιδίων. Για να προσδιορίσουμε τα γονίδια που έχουν απορυθμιστεί, απομονώσαμε ολικό RNA από δείγματα πνευμόνων, από τους Le-KO ποντικούς και από τους μάρτυρες ποντικούς. Το ολικό RNA που απομονώθηκε, υβριδοποιήθηκε στη συνέχεια σε μικροσυστοιχίες RNA της Affymetrix, όπου και αναγνωρίστηκαν 210 γονίδια με διαφορετική έκφραση (110 εμφάνιζαν αυξημένη και 100 μειωμένη έκφραση αντιστοίχως) ανάμεσα στους δύο γονοτύπους. Για να συνδέσουμε τις γονιδιακές αλλαγές με το φαινότυπο των Le-KO ποντικών, χρησιμοποιήσαμε στην ανάλυση μας το λογισμικό Endeavor το οποίο κατηγοριοποίησε και ιεράρχησε τα παραπάνω γονίδια. Η ιεράρχηση και η κατηγοριοποίηση των γονιδίων που αναγνωρίστηκαν, βασίστηκε στη συγκριτική ανάλυση με γονίδια αναφοράς που σχετίζονται με καρκινικό φαινότυπο στον πνεύμονα, όπως αναγράφεται στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του ποντικού MGI (Mouse Genome Informatics). Από την παραπάνω ανάλυση προέκυψε ένας συγκεκριμένος αριθμός γονιδίων που έχουν απορυθμιστεί στους Le-KO ποντικούς και που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα. Από αυτά, το *c-fos* -που μειώνεται- και η τοποϊσομεράση 2A (Top2A) -που αυξάνεται- έχουν την πιο υψηλή συσχέτιση με τον καρκίνο του πνεύμονα (πίνακας 3.1).

Γονίδια με μειωμένη έκφραση

Γονίδιο	ID	Περιγραφή	p-value*	FC**
Fos	14281	FBJ osteosarcoma oncogene	0.00558	-1,85966
Nr4a1	15370	nuclear receptor subfamily 4, group A, member	0.0344	-1,83345
Stk32c	57740	serine/threonine kinase 32C	0.0364	-1,87788
Ntrk2	18212	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	0.0369	-1,54437
Slamf1	27218	signaling lymphocytic activation molecule family	0.0391	-1,69359
Pla2g12a	66350	phospholipase A2, group X1IA	0.0423	-1,53954
Cntn1	12805	contactin 1	0.0432	-1,94567

Γονίδια με αυξημένη έκφραση

Γονίδιο	ID	Περιγραφή	p-value*	FC**
Top2a	21973	topoisomerase (DNA) II alpha	0.00212	1,61303
Gtf3c2 M	71752	general transcription factor IIIC, polypeptide 2,	0.0214	1,59208
Pbk	52033	PDZ binding kinase	0.0228	1,68288
Cycc	13063	cytochrome c, somatic	0.0340	1,74925
Nab1	17936	Ngfi-A binding protein 1	0.0361	1,69127
Rag1	19373	recombination activating gene 1	0.0365	1,66894
Hmgn2	15331	high mobility group nucleosomal binding	0.0380	1,85824
Exosc7	66446	exosome component 7	0.0440	1,52969

Πίνακας 3.1 Ιεράρχηση των γονιδίων που επηρεάστηκαν στους διαγονιδιακούς ποντικούς
p-value: τιμή σημαντικότητας, FC: Fold change – διαφορά έκφρασης συγκριτικά με το αντίστοιχο γονίδιο από τους μάρτυρες ποντικούς.



3.3 Ο ρόλος της ριβονουκλεοπρωτεΐνης AUF1 στην παθολογία και το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου

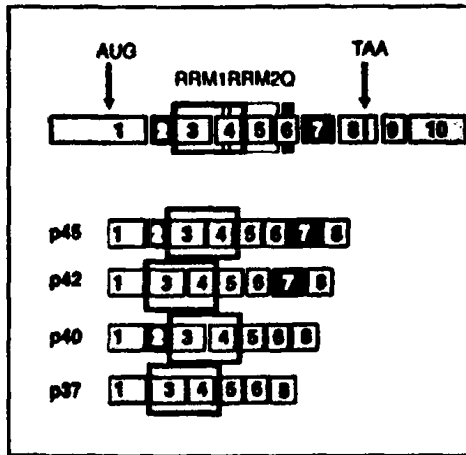
3.3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με καθολική απαλοιφή της λειτουργικής πρωτεΐνης του AUF1 – φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, η hnRNP/AUF1 πρωτεΐνη απαντάται σε 4 ισομορφές (p37, p40, p42, p45), που αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος με διαφορετικά κωδικόνια έναρξης. Συνεπώς η διαγονιδιακή τους απαλοιφή παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Για το σκοπό αυτό, αποφασίσαμε να απενεργοποιήσουμε την λειτουργία όλων των ισομορφών, αφαιρώντας την ικανότητα πρόσδεσης στα mRNAs που προσδένουν (εικόνα 16). Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας της γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού, αφαιρέθηκαν τα εξόνια 3 & 4 του γονιδωματικού τόπου *hnRNP* του ποντικού τα οποία κωδικοποιούν τα μοτίβα RRM όλων των ισομορφών (εικόνα 17). Μετά τη γονιδιακή στόχευση προέκυψαν ετεροζυγωτικοί ποντικοί *hnRNP^{JRRM}*. Οι ποντικοί αυτοί αναδιασταυρώνονται για τη δημιουργία ποντικών *hnRNP^{JRRMJRRM}* (εικόνα 18). Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν ομόζυγοι ποντικοί με γονότυπο *hnRNP^{JRRMJRRM}*, στους οποίους επιβεβαιώθηκε η απαλοιφή των εξονίων 3 και 4, καθώς και η απουσία όλων των ισομορφών της hnRNP/AUF1 (εικόνες 18 Δ και E). Σε αντίθεση με την καθολική απαλοιφή της HuR, οι ποντικοί με γονότυπο *hnRNP^{JRRMJRRM}* αναπτύσσονται και γεννιούνται. Συνεπώς, η παρουσία *hnRNP^{JRRMJRRM}* ποντικών, επιτρέπει την ανάλυση της φυσιολογίας του πνεύμονα χωρίς την επιπρόσθετη ανάγκη ανάπτυξης ιστοειδικού συστήματος.

Ωστόσο, οι ποντικοί *hnRNP^{JRRMJRRM}* έχουν αναπτυχθεί σε μεικτό γενετικό υπόστρωμα (C57/129) και παρουσιάζουν σημαντικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (εικόνα 19). Συγκεκριμένα ο αριθμός των ομόζυγων ποντικών *hnRNP^{JRRMJRRM}* που προκύπτει από τις αναδιασταυρώσεις των ετερόζυγων ποντικών, παρουσιάζει απόκλιση από την αναμενόμενη μεντελιανή αναλογία κατά 50%. Επιπρόσθετα, 60% των ομόζυγων ποντικών *hnRNP^{JRRMJRRM}* που γεννιούνται πεθαίνουν πριν το τέλος της γαλουχίας (εικόνα 19Γ), ενώ οι ποντικοί που επιβιώνουν εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη και στείριότητα (εικόνες 19 Α και Β). Παρά την ποικιλότητα του φαινοτύπου των ποντικών *hnRNP^{JRRMJRRM}*, οι ποντικοί που επιβιώνουν δεν παρουσιάζουν διαταραχές στην ανάπτυξη και τη παθολογία του

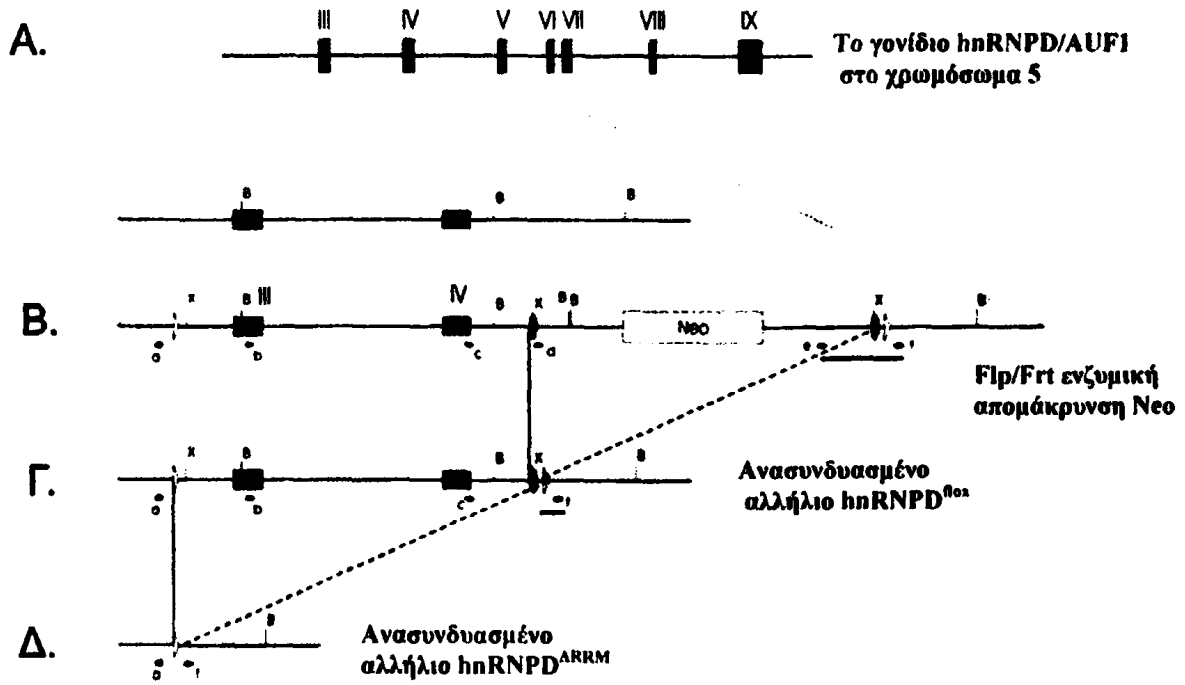


πνεύμονα. γεγονός που υποδηλώνει πως ο AUF1 δεν είναι απαραίτητος στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα (εικόνα 20).



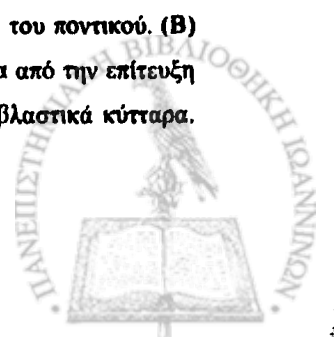
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής για την απενεργοποίηση της hRNP/D/AUF1

Τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν τις λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης σε RNA (RRMs) της πρωτεΐνης AUF1. Η απαλοιφή αυτών των εξωνίων αδρανοποιεί τη λειτουργία όλων των ισομορφών της πρωτεΐνης AUF1.

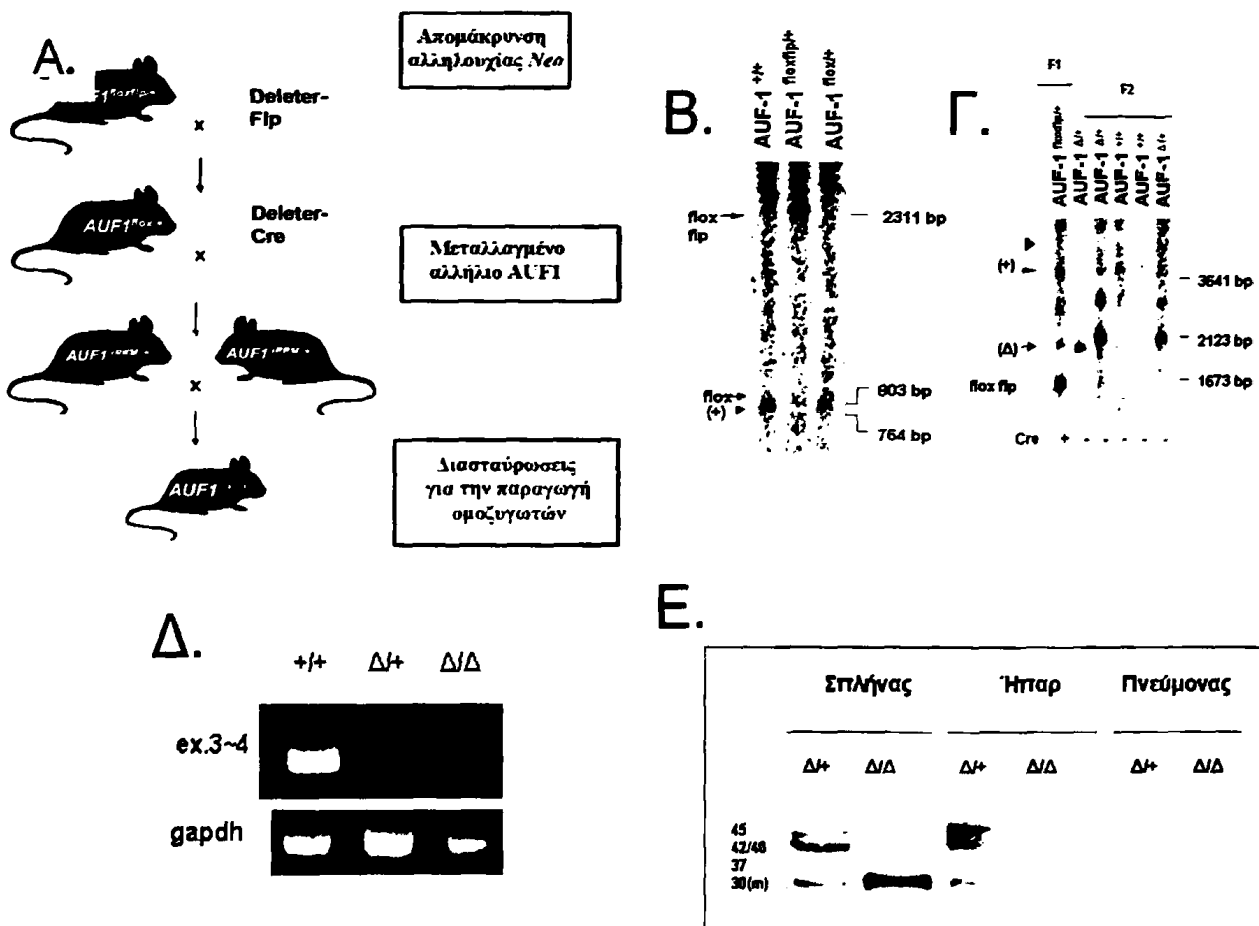


Εικόνα 17. Στρατηγική στόχευσης του γονιδίου hRNP/D/AUF1

(Α) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιακού τόπου του AUF1 στο χρωμόσωμα 5 του ποντικού. (Β) Προβλεπόμενη δομή του ανασυνδυασμένου γονιδιακού τόπου της hRNP/D ύστερα από την επίτευξη ομόλογου ανασυνδυασμού με τον πλασμιδιακό φορέα στόχευσης, στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.



Τα μαύρα παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν τα εξώνια 3 και 4, τα οποία είναι απαραίτητα για την έκφραση των RRM του γονιδίου της hnRNPΔ/AUF1, ενώ τα ανοιχτόχρωμα παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν το γονίδιο επιλογής (νεομυκίνη -neo). Οι κεφαλές βέλους καθορίζουν τη θέση των LoxP αλληλουχιών και τα χρωματιστά οβάλ σχέδια καθορίζουν τη θέση των Frt αλληλουχιών. Το γονίδιο επιλογής νεομυκίνη - Neo, βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες Frt. Οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από το ένζυμο ανασυνδυασμού φλιπάση - FIp το οποίο εναλλάσσει τα ομόλογα τμήματα των Frt, αφαιρώντας με αυτόν τον τρόπο την ενδιάμεση γονιδιωματική αλληλουχία, όπως συμβαίνει και με το σύστημα ανασυνδυασμού Cre/LoxP. Αναφέρονται οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων: Β. *Bgl*I και Χ. *Xba*I. (Γ) Σχηματική αναπαράσταση του αλληλίου hnRNPΔ^{fllox}. (Δ) Προβλεπόμενη δομή του γονιδιακού τόπου της hnRNPΔ/AUF1 ύστερα από τη δράση της ρεκομβινάσης Cre και της πλήρους αποκοπής του τμήματος DNA που περιλαμβάνει τα εξώνια 3 και 4.

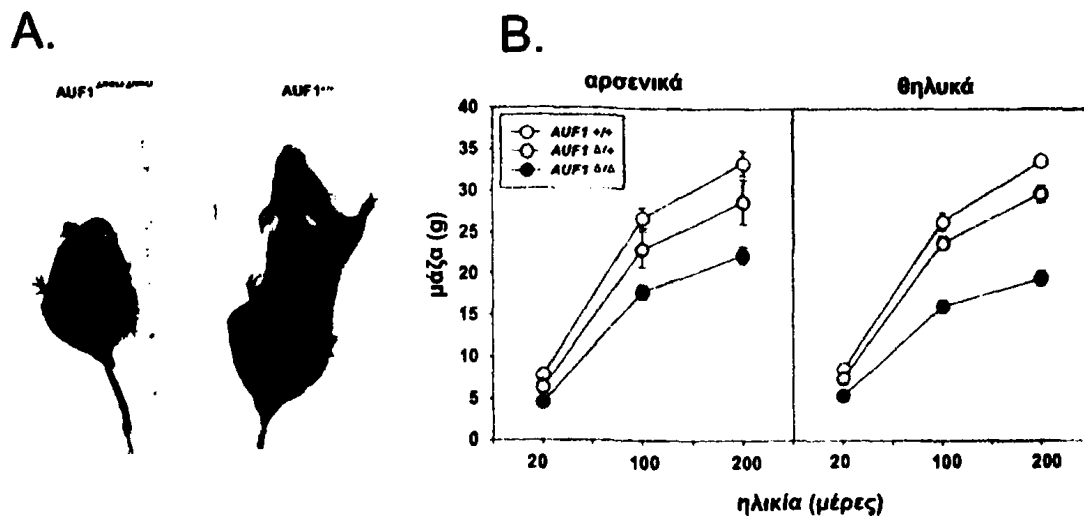


Εικόνα 18. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με καθολική απαλοιφή της λειτουργικής πρωτεΐνης του AUF1.

(Α) Διασταυρώσεις για τη δημιουργία ομόζυγων μεταλλαγμένων ποντικών. (Β)(Γ)(Δ) Επιβεβαίωση της απομάκρυνσης του Neo και των εξωνίων 3 και 4 με στύπωμα κατά Southern και RT-PCR



ανάλυση. (E) Αντίστοιχα, επιβεβαίωση με ανοσοστύπωμα κατά Western της απενεργοποίησης όλων των πρωτεϊνικών ισομορφών της hnRNPδ/AUF1.



Γ.

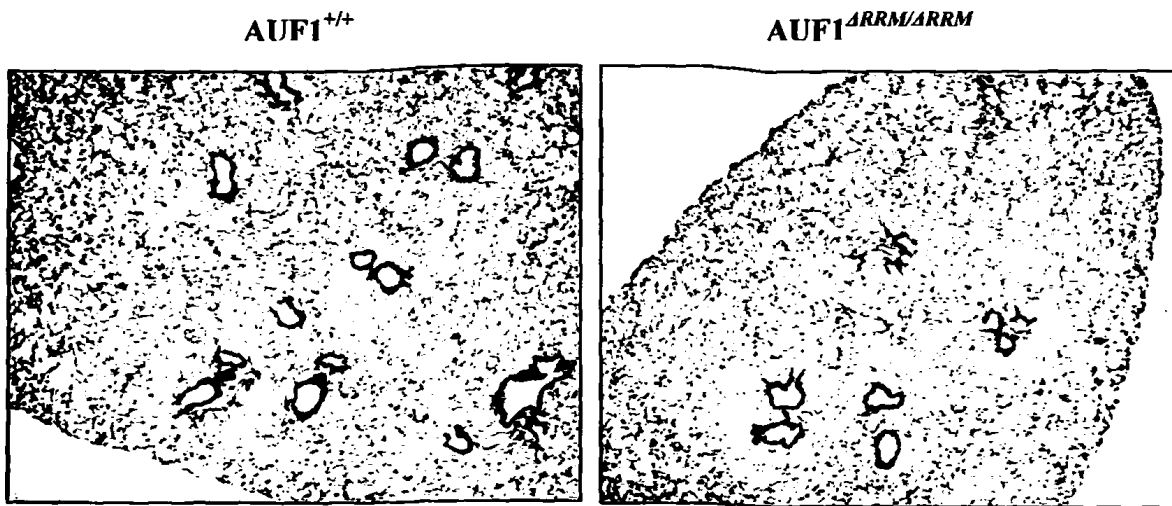
		AUF1 ^{+/+}	AUF1 ^{Δ/Δ}	AUF1 ^{Δ/Δ}
Progeny	206	56	110	23
Birth ratio		27,18%	53,39%	11,11%
Expected ratio		25%	50%	25%

	AUF1 ^{+/+}		AUF1 ^{Δ/Δ}		AUF1 ^{Δ/Δ}	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Progeny	35	21	63	47	11	12
Birth ratio	62,50%	37,50%	57,20%	42,80%	47,80%	52,20%
Expected ratio	50%	50%	50%	50%	50%	50%

Εικόνα 19. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ποντικών hnRNPδ/AUF1^{ARRM1/ARRM1}

(Α)(Β)Οι μεταλλαγμένοι ποντικοί εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη ανεξαρτήτως φύλου. (Γ) Ο αριθμός των ομόζυγων ποντικών hnRNPδ^{ARRM1/ARRM1} που προκύπτει από τις αναδιασταυρώσεις ετερόζυγων ατόμων, παρουσιάζει απόκλιση από την αναμενόμενη μεντελιανή αναλογία





Εικόνα 20. Οι ποντικοί $AUF1^{\Delta RRM/\Delta RRM}$ δεν εμφανίζουν αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα. Ιστολογική ανάλυση αιματοξυλίνης – εωσίνης σε δείγματα πνευμόνων από ποντικούς φυσικού τύπου και μεταλλαγμένους ποντικούς $AUF1^{\Delta RRM/\Delta RRM}$ ηλικίας 8 εβδομάδων.

Ωστόσο, η εμπλοκή του AUF1 στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει ως ερώτημα που δεν μπορεί να μελετηθεί σε αυτό το σύστημα, δεδομένου του φαινοτύπου που εμφανίζει ατελή διεισδυτικότητα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει επιστατικές αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στο μεικτό γενετικό υπόστρωμα. Συνεπώς είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένα αμιγές γενετικό υπόστρωμα, ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του AUF1 στην καρκινογένεση του πνεύμονα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ



4.1 Η HuR είναι απαραίτητη στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε το ρόλο της HuR στις αναπτυξιακές διαδικασίες που καθοδηγούν τη μορφογένεση του πνεύμονα. Όπως έχει περιγραφεί από μελέτες του εργαστηρίου μας (Katsanou et al, 2009) η καθολική απαλοιφή της HuR από το γονιδίωμα του ποντικού είναι εμβρυϊκά θνησιγενής παρουσιάζοντας σημαντικές διαταραχές στην ανάπτυξη διαφόρων οργάνων, συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα.

Φαινοτυπικά οι αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα μεταλλαγμένων εμβρύων εμφανίζονται κατά το ψευδοαδενικό στάδιο (*pseudoglandular stage*) και επιδεινώνονται μετά την εμβρυϊκή μέρα E12.5. Ποιο συγκεκριμένα η απουσία της HuR προκαλεί την απώλεια του βρογχικού δέντρου ενώ οι εμβρυϊκοί πνεύμονες εμφανίζουν μια διαστρεβλωμένη δομή, αποτελούμενη από διογκωμένους σάκους με απουσία τελικών βρογχιολίων και αναπνευστικών σάκων (εικόνα 1). Παρόλα αυτά η καθολική απαλοιφή της HuR δεν φαίνεται να καταστέλλει τη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου, δεδομένου ότι οι υπολειπόμενες δομές εμφανίζουν διαφοροποιημένες επιθηλιακές στοιβάδες (εικόνες 3 και 4). Παρατηρήσαμε ότι ο αναπτυξιακός φαινότυπος στον πνεύμονα των μεταλλαγμένων εμβρύων συσχετιζόταν με διαταραχές στο μεσεγγυματικό τμήμα του πνεύμονα. Η HuR ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (Kim & Gorspe, 2008; Wang et al, 2000a), και η απαλοιφή της από τον πνεύμονα περιόρισε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αύξησε τα επίπεδα της απόπτωσης σχεδόν αποκλειστικά στο μεσεγγυματικό τμήμα του πνεύμονα (εικόνες 2 Α, Β και Γ). Ακολούθως, οι μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο των μεσεγγυματικών κυττάρων απουσία της HuR συσχετίστηκαν με την αποδιοργάνωση των μεσεγγυματικών δομών και την απουσία των λείων μυών που επενδύουν το ανώτερο βρογχικό επιθήλιο και τα αγγεία (εικόνα 2Δ).

Οι αναπτυξιακές διαδικασίες στον πνεύμονα συνίστανται σε ενορχηστρωμένα αμοιβαίες μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παρυφών του αναπτυσσόμενου επιθηλίου και του υποκείμενου μεσοδέρματος. Το δίκτυο αυτών των μοριακών αλληλεπιδράσεων αποτελείται από μεταγραφικούς, μορφορυθμιστικούς και αυξητικούς παράγοντες. Έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση των μορίων TBX4, FGF10 και BMP4 (Weaver et al, 2003, Weaver et al, 1999, Sakiyama et al, 2003, Bellusci et al, 1997a, Lebeche et al, 1999 and as reviewed in Cardoso et al 2006) επάγει και κατευθύνει τη μορφογένεση του βρογχικού δένδρου. Βιοχημικές μελέτες του



εργαστηρίου μας σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών, έδειξαν ότι η απουσία της HuR έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των mRNAs TBX4 και FGF10, ενώ η έκφραση του BMP4 mRNA εμφανίζεται αυξημένη σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (εικόνα 5A). Βέβαια, από τα παραπάνω μόρια, η HuR αλληλεπιδρά άμεσα μόνο με το mRNA του FGF10, συνεπώς η επίδραση που ασκεί στους άλλους δύο παράγοντες είναι έμμεση (εικόνα 5B) (Katsanou et al, 2009). Ο FGF10 είναι το βασικό μόριο που επάγει τον πολλαπλασιασμό του πνευμονικού επιθηλίου και την ανάπτυξη επιθηλιακών εκβλαστημάτων (buds) (as reviewed in Cardoso et al 2006), κατά τα πρώτα στάδια της οργανογένεσης του πνεύμονα. Αντίστοιχα, και σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η έκφραση των mRNAs των FGF10 και TBX4 ήταν μειωμένη σε εμβρυϊκούς πνεύμονες μεταλλαγμένων ποντικών ηλικίας E18.5 (εικόνα 7A). Ακολούθως, η κατανομή της πρωτεΐνης FGF10 καθώς και η εξαρτώμενη από αυτήν έκφραση των μορίων pERK1/2, TTF1, Shh και Pitc1 στον εμβρυϊκό πνεύμονα, ήταν περιορισμένες απουσία της HuR (εικόνες 6 και 7B). Επιπρόσθετα αποδείξαμε, ότι τα πνευμονικά εκβλαστήματα (lung buds) ηλικίας E11.5, που υπολείπονται της HuR, αποκρίνονται στην εξωγενή χορήγηση του FGF10 *in vitro* και διαμορφώνουν διακλαδιζόμενες δομές προσομοιάζοντας τη διαδικασία μορφογένεσης του βρογχικού δένδρου (εικόνα 8A).

Συμπερασματικά τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν το σημαντικό και πολύπλοκο ρόλο της μεσεγγυματικής HuR στα αναπτυξιακά προγράμματα γονιδιακής έκφρασης που καθορίζουν την οργανογένεση του πνεύμονα. Η μειωμένη έκφραση του FGF10 στον πνεύμονα των μεταλλαγμένων εμβρύων, καθιστά τη HuR ως χωροχρονικό οργανωτή των γονιδιακών δικτύων, που ελέγχουν τις αναπτυξιακές διαδικασίες κατά την αμοιβαία αλληλεπίδραση του μεσεγγύματος με το πνευμονικό επιθήλιο.

4.2 Η απώλεια της HuR προδιαθέτει το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχουν δυο βασικοί μηχανισμοί για το μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Ο ένας μηχανισμός, περιλαμβάνει ενδογενείς μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, ενώ ο δεύτερος μηχανισμός οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν διαταραχές στη βιολογία του κυττάρου.



Η συσχέτιση της HuR με τις διαδικασίες της καρκινικής εξαλλαγής έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν διεξαχθεί σε *in vitro* μοντέλα καρκινικών κυτταρικών σειρών, συνεπώς δεν είναι εφικτή η διερεύνηση των διαδικασιών που προηγούνται της καρκινογένεσης. Αντιστοίχως, οι μελέτες όπου εξετάζεται ο ρόλος της πρωτεΐνης HuR, σε ασθενείς διαφόρων τύπου καρκίνου ή σε *in vivo* καρκινικά μοντέλα, περιορίζονται στις μοριακές συνέπειες που ενδεχομένως προκαλεί η καρκινογένεση. Παρόλα αυτά, από τις μελέτες αυτές έχει συγκεντρωθεί ένας σημαντικός όγκος πληροφοριών που αναδεικνύουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις στα καρκινοσχετιζόμενα δίκτυα μονοπατιών, στα οποία διαμεσολαβεί η HuR.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάζεται για πρώτη φορά ο *in vivo* ρόλος της HuR στη φυσιολογία του πνευμονικού επιθηλίου, πριν αυτό υποστεί κάποιο μετασχηματισμό. Για να μελετήσουμε το ρόλο που διαδραματίζει η HuR στο πνευμονικό επιθήλιο χρησιμοποιήσαμε συστήματα ιστοειδικής απαλοιφής της HuR (εικόνες 10 A και B). Η πρώιμη απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο στα διαγονιδιακά συστήματα εξακριβώθηκε με μοριακές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (εικόνα 11), και όπως παρατηρήθηκε δεν επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη του πνεύμονα (εικόνες 11 και 4). Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε ότι η ιστοειδική απαλοιφή της HuR προδιαθέτει την ανάπτυξη νεοπλασιών. Συγκεκριμένα, ποντικοί που υπολείπονται της HuR αποκλειστικά στο πνευμονικό επιθήλιο, εμφάνισαν μια κλιμακούμενη χρονικά και παθολογικά κατάσταση, που κατέληγε στις μεγαλύτερες ηλικίες σε εμφάνιση σποραδικών αδενωμάτων και αδenoκαρκινωμάτων, με μηδαμινή έως μωσαϊκή ανίχνευση της πρωτεΐνης HuR (εικόνα 12). Πράγματι η ιστοπαθολογική ανάλυση στους πνεύμονες των διαγονιδιακών ποντικών έδειξε αυξημένη πάχυνση και κυτταροβρίθεια στο τοίχωμα των κυψελίδων, αυξημένη υπερπλασία και ατυπία στο αδενικό επιθήλιο, καθώς και σποραδική ανάπτυξη φλεγμονωδών εστιών και αδενωμάτων. Προηγούμενες αναφορές κυρίως σε *in vitro* συστήματα, έχουν επισημάνει το ρόλο της HuR στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (κεφάλαια 1.4.2, 1.4.3, 1.9.5). Ακολούθως, η απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο των ποντικών προκάλεσε μια προοδευτική αύξηση των κυττάρων που εξέφραζαν το μιτωτικό δείκτη pH3 (εικόνα 13). Μάλιστα, η κατανομή του pH3 ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στην περιοχή των βρογχο-κυψελιδικών αγωγών σύζευξης (BADJ), όπου εντοπίζονται τα βρογχο-κυψελιδικά βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς BASCs (Kim et al,



2005). Καθώς ο αριθμός και η έκτοπη κατανομή των BASCs, θεωρούνται ως δείκτες για την έναρξη των νεοπλαστικών διεργασιών (Kim et al, 2005, Ventura et al, 2007, Yanagi et al, 2007), διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός τους ήταν διπλάσιος στο πνευμονικό επιθήλιο των διαγονιδιακών ποντικών (εικόνα 14). Η παρατήρηση αυτή προσομοιάζει το φαινότυπο της απώλειας του p38 στον πνεύμονα (Ventura et al, 2007). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι κάτω από συνθήκες κυτταρικού στρες η ενεργοποίηση του p38 ρυθμίζεται από τη HuR. Σύμφωνα με αυτό, η HuR στο πνευμονικό επιθήλιο μπορεί να διατηρεί την ομοιότητα της «δεξαμενής» των BASCs, μέσω της μεταμεταγραφικής ρύθμισης του p38 εμποδίζοντας κατά αυτό τον τρόπο, την ανάπτυξη νεοπλασιών στο πνευμονικό επιθήλιο.

Ακολούθως, για να προσδιορίσουμε το ρόλο της HuR στη διαδικασία της καρκινογένεσης, μελετήθηκε η απόκριση του πνευμονικού επιθηλίου σε μοντέλα χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης (κεφάλαιο 2.6). Παρατηρήθηκε ότι η απουσία της HuR από το πνευμονικό επιθήλιο προωθεί την καρκινογένεση, ενισχύοντας το καρκινογόνο ερέθισμα. Συγκεκριμένα, οι όγκοι που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια των πνευμόνων των διαγονιδιακών ποντικών ήταν μεγαλύτεροι τόσο σε μέγεθος όσο και σε αριθμό, σε σύγκριση με αυτούς στους μάρτυρες ποντικούς (εικόνα 15). Αναλυτικά, η ιστοπαθολογική ανάλυση έδειξε ότι οι περισσότεροι όγκοι που εντοπίζονται στους διαγονιδιακούς ποντικούς ήταν αδenoκαρκινώματα σε αντίθεση με τους μάρτυρες ποντικούς που εμφάνισαν κυρίως καλοήγη αδενώματα (εικόνα 16). Η ανάλυση αυτή, υποδεικνύει ότι η απώλεια της HuR προωθεί την μετάβαση από το ενδιάμεσο στάδιο της καρκινογένεσης (αδένωμα) σε μεταγενέστερα και πιο επιθετικά στάδια (αδenoκαρκινώμα).

Πρόσφατες μελέτες από βιοψίες καρκίνου του πνεύμονα, του κόλον και του μαστού, έχουν αναφέρει την αυξημένη έκφραση των επιπέδων της πρωτεΐνης HuR στους καρκίνους αυτούς (κεφάλαιο 1.10.5). Ειδικότερα, μία μελέτη από τον Blaxall και συνεργάτες, όπου χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης σε ποντικούς, έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση της HuR σχετίζεται με την ανάπτυξη νεοπλασίας στον πνεύμονα. Σύμφωνα με την παραπάνω αναφορά, θα ήταν αναμενόμενο ότι η ιστοειδική απαλοιφή της HuR να δρα ανασταλτικά στη δημιουργία καρκίνων στον πνεύμονα. Παρόλα αυτά, οι όγκοι που παρατηρήθηκαν στους διαγονιδιακούς ποντικούς, αν και πιο επιθετικοί, εμφάνιζαν μηδαμινή έως μωσαϊκή ανίχνευση της πρωτεΐνης HuR, σε αντίθεση με τους όγκους στους μάρτυρες



ποντικούς όπου έδειξαν να είναι HuR θετικοί (εικόνα 16). Παράλληλα, στα κύτταρα των νεοπλασιών που υπολείπονται της HuR, η έκφραση της β-κατενίνης ήταν πιο αυξημένη τόσο στην κυτταροπλασματική όσο και στην πυρηνική της κατανομή (εικόνα 16). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το mRNA της β-κατενίνης αποτελεί στόχος της HuR. Συνεπώς, η απώλεια της HuR ενδέχεται να προκαλεί την απορρύθμιση του μεταμεταγραφικού ελέγχου της β-κατενίνης με αποτέλεσμα να οδηγήσει στην αυξημένη έκφραση της στα καρκινικά κύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών.

Επιπλέον, συγκριτική ανάλυση μικροσυστοιχιών σε ολικά εκχυλίσματα RNA προερχόμενα από πνευμονικό ιστό, ανέδειξε τα γονίδια *c-fos* και *Top2A* ως τα πιο σημαντικά μόρια που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, και των οποίων η έκφραση έχει μειωθεί και αυξηθεί αντιστοίχως στους διαγονιδιακούς ποντικούς (πίνακας 3.1). Μελέτες σε πνευμονικά αδενοκαρκινώματα έχουν δείξει την αυξημένη έκφραση του γονιδίου της τοποϊσομεράσης 2A (*Top2A*) (Kobayashi et al, 2004; Roe et al, 2009). Επίσης, τα επίπεδα της έκφρασης του *Top2A* mRNA αποτελούν κριτήριο για το χαρακτηρισμό διαφορετικών τύπων καρκίνου, αφού στα αρχικά στάδια δημιουργίας αδενώματος η έκφρασή του είναι μειωμένη σε αντίθεση με το στάδιο του αδενοκαρκινώματος όπου είναι αυξημένη (Woenckhaus et al, 2008). Όσον αφορά το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fos*, τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών τόσο σε συνθήκες *in vivo* όσο και σε *in vitro* συστήματα, παραμένουν μέχρι και σήμερα αντικρουόμενα. Οι περισσότερες μελέτες σε βιοψίες καρκινικού ιστού, συσχετίζουν την αυξημένη έκφραση του *c-fos* με την καρκινογένεση, ενώ σε άλλες έχει παρατηρηθεί η μειωμένη έκφραση του σε μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα καθώς και σε μεταγενέστερα στάδια της καρκινογένεσης (Jin et al, 2007; Kukushkin et al, 2002). Το γεγονός ότι στη δική μας *in vivo* μελέτη παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του *c-fos* και αυξημένη έκφραση του *Top2A* υποδηλώνει μια πρώτη συσχέτιση του μοριακού μηχανισμού που προκαλεί την ανάπτυξη νεοπλασίας καθώς και την παρουσία αυξημένου αριθμού αδενοκαρκινωμάτων στους διαγονιδιακούς ποντικούς, στο μοντέλο της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έρχονται να αποσαφηνίσουν το ρόλο σημαντικών γονιδίων στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του γονιδίου APC εμφανίζονται στο

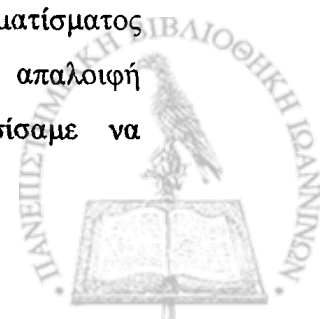


πρώτο στάδιο της νεοπλασίας, αντιστοίχως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο k-ras παρουσιάζονται στο στάδιο της δημιουργίας αδενώματος, ενώ το p53 παίζει καθοριστικό ρόλο στο στάδιο του αδenoκαρκινώματος. Στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι το p53 αποτελεί κύριο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και εμφανίζεται να φέρει πολλές μεταλλάξεις σε διάφορους τύπους καρκίνων. Μάλιστα το mRNA του p53 έχει αποδειχθεί να είναι στόχος της HuR και να ρυθμίζεται από αυτή, ενώ μία πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριο μας (Papadaki et al, 2009), έδειξε ότι η απαλοιφή της HuR από τα T λεμφοκύτταρα συνδέεται με την μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης p53. Συμπερασματικά λοιπόν θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι η απώλεια της HuR από το επιθήλιο του πνεύμονα οδηγεί στην μειωμένη έκφραση του p53 με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης, ενισχύοντας έτσι την πιο γρήγορη μετάβαση από το στάδιο του αδενώματος σε αυτό του αδenoκαρκινώματος.

Εν κατακλείδι, η μελέτη αυτή υποδεικνύει ότι ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να εμπλέκεται η HuR στα στάδια της καρκινογένεσης του πνεύμονα σχετίζεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απώλεια της HuR προκαλεί φλεγμονώδεις διαταραχές στη φυσιολογία του πνεύμονα, προδιαθέτοντας έτσι τη δημιουργία της νεοπλασίας, μέσω ενδογενών μηχανισμών και ταυτόχρονα προωθεί τη μετάβαση από τα ενδιάμεσα στάδια της καρκινογένεσης (αδενώματα) σε μεταγενέστερα και πιο επιθετικά στάδια (αδenoκαρκινώματα), κατά την επαγόμενη καρκινογένεση. Συνεπώς, θα μπορούσε να προταθεί ότι η HuR μπορεί να διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μια μηχανιστικής διαδικασίας του επιθηλίου του πνεύμονα, που περιλαμβάνει την αντιμετώπιση της πνευμονικής φλεγμονής και του επαγόμενου καρκίνου του πνεύμονα.

4.3 Η πρωτεΐνη hnRNP/D/AUF1 δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του πνευμονικού επιθηλίου

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε το ρόλο της hnRNP/D/AUF1 στην παθολογία και το μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου. Η hnRNP/D/AUF1 υπαντάται σε 4 ισομορφές (p37, p40, p42, p45) που αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος με διαφορετικά κωδικόνια έναρξης και συνεπώς η διαγονιδιακή τους απαλοιφή παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Για το σκοπό αυτό, αποφασίσαμε να



απενεργοποιήσουμε την λειτουργία όλων των ισομορφών, αφαιρώντας την ικανότητα πρόσδεσης στα RNA που προσδέουν. Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας της γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού, αφαιρέθηκαν τα εξώνια 3 & 4 του γονιδωματικού τόπου *hnRNP D* του ποντικού τα οποία κωδικοποιούν τα μοτίβα RRM όλων των ισομορφών. Σε αντίθεση με την καθολική απαλοιφή της HuR, *hnRNP D^{ARRM/ARRM}* ποντικοί αναπτύσσονται και γεννιούνται. Η παρουσία *hnRNP D^{ARRM/ARRM}* επιτρέπει την ανάλυση της φυσιολογίας του πνεύμονα χωρίς την επιπρόσθετη ανάγκη ανάπτυξης ιστοειδικού συστήματος. Ωστόσο, οι ποντικοί *hnRNP D^{ARRM/ARRM}* έχουν αναπτυχθεί σε μεικτό γενετικό υπόστρωμα (C57/129) και παρουσιάζουν σημαντικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα ο αριθμός των ομόζυγων μεταλλαγμένων ποντικών που προκύπτει από τις αναδιασταυρώσεις των αντίστοιχων ετερόζυγων, παρουσιάζει απόκλιση από την αναμενόμενη μεντελιανή αναλογία κατά 50%. Επιπρόσθετα, 60% των ομόζυγων ποντικών που γεννιούνται πεθαίνουν πριν το τέλος της γαλουχίας, ενώ οι ποντικοί που επιβιώνουν εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη και στειρότητα.

Παρά την ποικιλότητα του φαινοτύπου των ποντικών *hnRNP D^{ARRM/ARRM}* οι ποντικοί που επιβιώνουν δεν παρουσιάζουν διαταραχές στην ανάπτυξη και τη παθολογία του πνεύμονα, γεγονός που υποδηλώνει πως ο AUF1 δεν είναι απαραίτητος στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα. Ωστόσο, η εμπλοκή του AUF1 στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει ως ερώτημα που δεν μπορεί να μελετηθεί σε αυτό το σύστημα, δεδομένου του φαινοτύπου που εμφανίζει ατελή διεισδυτικότητα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει επιστατικές αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στο μεικτό γενετικό υπόστρωμα. Συνεπώς είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένα αμιγές γενετικό υπόστρωμα, ώστε να διασαφηνιστεί ο ρόλος του AUF1 στην καρκινογένεση του πνεύμονα.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω και παρά τις παρατηρήσεις από προηγούμενες αναφορές για τις αλληλεπιδράσεις HuR-AUF1, ο AUF1 δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του πνεύμονα. Πάρα ταύτα, ο ρόλος του AUF1 στην καρκινογένεση παραμένει ασαφής. Συνεπώς η HuR φαίνεται να διαδραματίζει το βασικό ρόλο στις αντιδράσεις των πνευμονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη και κατά τον μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου.



5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



5.1 Περίληψη

Ανάλυση μεταμεταγραφικών δικτύων στη φυσιολογία και τον μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου

Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες που προσδένουν mRNAs με στοιχεία πλούσια σε αδενίνη και ουρακίλη (AU-rich binding proteins – AREBPs), κατέχουν ιδιαίτερη θέση στη μετά-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Η παρούσα ερευνητική μελέτη αναλύει το βιολογικό ρόλο των ARE-BPs HuR και hnRNP/D/AUF1 *in vivo*, στην ανάπτυξη, στη φυσιολογία και στο μετασχηματισμό του πνεύμονα. Για την ανάλυση αυτή, δημιουργήθηκαν καινοτόμα διαγονιδιακά συστήματα απαλοιφής της HuR και εφαρμόστηκαν πειραματικά πρότυπα καρκινογένεσης. Η καθολική απαλοιφή της HuR στον ποντικό προκαλεί σοβαρές αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα. Συγκεκριμένα, οι αναπτυξιακές διαταραχές στον πνεύμονα των μεταλλαγμένων εμβρύων εμφανίζονται κατά τα στάδια ανάπτυξης του βρογχικού δένδρου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η HuR δεν επηρεάζει τη διαφοροποίηση του πνευμονικού επιθηλίου, αλλά καθοδηγεί τη διαδικασία της μορφογένεσης των πνευμονικών διακλαδώσεων, κυρίως επηρεάζοντας το μοριακό δίκτυο αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων του μεσεγχυματικού ιστού με το πνευμονικό ενδόδερμα. Πιο ειδικά, μοριακές αναλύσεις αποδεικνύουν, ότι η HuR διαμεσολαβεί άμεσα ή έμμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης βασικών μορφογενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη του πνεύμονα, όπως ο FGF10 και ο BMP4.

Η αποκλειστική απαλοιφή της HuR στο πνευμονικό επιθήλιο, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του πνεύμονα, αλλά ρυθμίζει το δυναμικό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των πρόδρομων επιθηλιακών και των βλαστικών κυττάρων του πνεύμονα. Η σημασία του ελέγχου της HuR στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών παίζει ζωτικό ρόλο στην αποφυγή ανάπτυξης νεοπλασίας, καθώς επίσης και στον τρόπο απόκρισης του πνευμονικού επιθηλίου σε εξωγενή καρκινογόνα ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, η απαλοιφή της HuR από το πνευμονικό επιθήλιο, απουσία καρκινικού ερεθίσματος, προδιαθέτει την ανάπτυξη νεοπλασίας. Αντίστοιχα, παρουσία εξωγενούς καρκινογόνου ερεθίσματος, η αποσιώπηση της HuR ενισχύει την καρκινογένεση και προωθεί τη μετάβαση των νεοπλασιών σε μεταγενέστερα και πιο επιθετικά στάδια. Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η HuR ασκεί αυτόν τον



έλεγχο, φαίνεται να περιλαμβάνει τη ρύθμιση της έκφρασης μορίων-καθοριστών του κυτταρικού κύκλου όπως η β-κατενίνη, καθώς και άλλων μορίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, όπως το c-fos και η τοποϊσομεράση 2A.

Σε αντίθεση με τη HuR, η καθολική απενεργοποίηση της hnRNP/AUF1 δεν είναι εμβρυϊκά θνησιγενής, αλλά οι μεταλλαγμένοι ποντικοί που γεννιούνται παρουσιάζουν υψηλή θνησιμότητα μετά τη γαλουχία, έχουν μικρότερο μέγεθος και εμφανίζουν στειρότητα. Παρά την ποικιλότητα του φαινοτύπου των ποντικών αυτών, ο AUF1 δεν είναι απαραίτητος στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πνεύμονα. Συνοψίζοντας, η HuR διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις αντιδράσεις των πνευμονικών κυττάρων τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τον μετασχηματισμό του πνευμονικού επιθηλίου, ενώ ο AUF1 δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του πνεύμονα.



5.2 Summary

Analysis of post-transcriptional networks in physiology and transformation of pulmonary epithelium

The AU-rich binding proteins – AREBPs, are major post-transcriptional regulators of gene expression and are implicated in cellular procedures that control cell cycle proliferation, apoptosis and differentiation. In this study, we are focusing on the *in vivo* biological role of the ARE-BPs, Elavl/HuR and hnRNP/D/AUF1, during the development, morphogenesis and transformation of pulmonary epithelium in the lung. The complete ablation of HuR in the mice is embryonic lethal and leads to severe developmental defects. The developmental aberrations in mutant lungs start at the early stages of branching morphogenesis. Although, HuR is not implicated in the epithelial differentiation, appears to be a key coordinator of the developmental programs that control epithelial branching morphogenesis. In specific, HuR has been shown to mediate, directly or indirectly, the expression of major lung morphogenic factors such as FGF10 and BMP4, by regulating the molecular networks of reciprocal interactions among lung mesenchyme and the adjacent epithelium. Besides, this study has indicated that the lung epithelial ablation of HuR does not affect the development of the lung. However, this epithelial HuR ablation has been observed to promote the increased proliferation of broncho-alveolar stem cells (BASCs), which in turn promote the tumorigenic procedures involved in the development of lung cancer. Therefore, HuR appears to elicit a vital role in the cellular responses implicated in the transformed phenotype of the lung through its influence on the expression, by stabilizing and/or regulating the translation, of multiple target mRNAs (such as β -catenin, c-fos and top2a) that are known to be key players during lung cancer development. Furthermore, the study on the other AREBP hnRNP/D/AUF1, demonstrated that the hnRNP/D/AUF1 null mice although are born, show low survival rates, smaller size and sterility.

Collectively, our data reveal the essential role of HuR in the cellular developmental and tumorigenic processes of the lung epithelium, whereas the AUF1 doesn't emerge as a key competitor neither in the development nor in the pathophysiology of the lung.



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



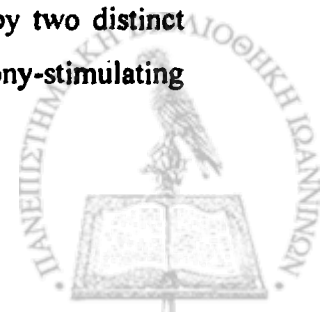
- Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H., and Gorospe, M. 2007a. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* 6(11): 1288-1292.
- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A. et al. 2007b. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25(4): 543-557.
- Abe, R., Sakashita, E., Yamamoto, K., and Sakamoto, H. 1996. Two different RNA binding activities for the AU-rich element and the poly(A) sequence of the mouse neuronal protein mHuC. *Nucleic Acids Res* 24(24): 4895-4901.
- Amadio, M., Scapagnini, G., Laforenza, U., Intrieri, M., Romeo, L., Govoni, S., and Pascale, A. 2008. Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR. *Curr Pharm Des* 14(26): 2651-2658.
- Antic, D. and Keene, J.D. 1998. Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J Cell Sci* 111 (Pt 2): 183-197.
- Bakheet, T., Frevel, M., Williams, B.R., Greer, W., and Khabar, K.S. 2001. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res* 29(1): 246-254.
- Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M.G., Henderson, R., Winnier, G., and Hogan, B.L. 1997a. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124(1): 53-63.
- Bellusci, S., Grindley, J., Emoto, H., Itoh, N., and Hogan, B.L. 1997b. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124(23): 4867-4878.



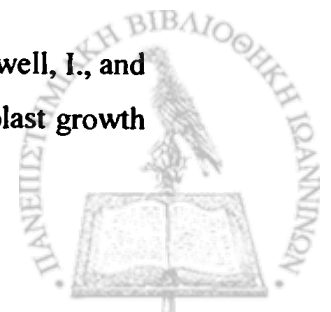
- Bernasconi, N.L., Wormhoudt, T.A., and Laird-Offringa, I.A. 2000. Post-transcriptional deregulation of myc genes in lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(4): 560-565.
- Besse, F. and Ephrussi, A. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 971-980.
- Bevilacqua, P.C. 2003. Mechanistic considerations for general acid-base catalysis by RNA: revisiting the mechanism of the hairpin ribozyme. *Biochemistry* **42**(8): 2259-2265.
- Bhaskaran, M., Wang, Y., Zhang, H., Weng, T., Baviskar, P., Guo, Y., Gou, D., and Liu, L. 2009. MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiol Genomics* **37**(3): 268-278.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. 2006. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 513-521.
- Blaxall, B.C., Dwyer-Nield, L.D., Bauer, A.K., Bohlmeyer, T.J., Malkinson, A.M., and Port, J.D. 2000. Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Molecular carcinogenesis* **28**(2): 76-83.
- Bohinski, R.J., Di Lauro, R., and Whitsett, J.A. 1994. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* **14**(9): 5671-5681.
- Borron, P., Veldhuizen, R.A., Lewis, J.F., Possmayer, F., Caveney, A., Inchley, K., McFadden, R.G., and Fraher, L.J. 1996. Surfactant associated protein-A



- inhibits human lymphocyte proliferation and IL-2 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(1): 115-121.
- Bos, J.L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17): 4682-4689.
- Bragg, A.D., Moses, H.L., and Serra, R. 2001. Signaling to the epithelium is not sufficient to mediate all of the effects of transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 4 on murine embryonic lung development. *Mech Dev* 109(1): 13-26.
- Brennan, C.M., Gallouzi, I.E., and Steitz, J.A. 2000. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* 151(1): 1-14.
- Brewer, G. 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 11(5): 2460-2466.
- Campos, A.R., Grossman, D., and White, K. 1985. Mutant alleles at the locus elav in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J Neurogenet* 2(3): 197-218.
- Cardoso, W.V. 2000. Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Dev Dyn* 219(2): 121-130.
- Chapman, D.L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S.I., Gibson-Brown, J.J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R.J., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. 1996. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 206(4): 379-390.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Rajmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107(4): 451-464.
- Chen, C.Y., Xu, N., and Shyu, A.B. 1995. mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating



- factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol Cell Biol* 15(10): 5777-5788.
- Chuang, P.T., Kawcak, T., and McMahon, A.P. 2003. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hipl, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* 17(3): 342-347.
- Chung, S., Eckrich, M., Perrone-Bizzozero, N., Kohn, D.T., and Furneaux, H. 1997. The Elav-like proteins bind to a conserved regulatory element in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA. *J Biol Chem* 272(10): 6593-6598.
- Coalson, J.J., King, R.J., Yang, F., Winter, V., Whitsett, J.A., Delemos, R.A., and Seidner, S.R. 1995. SP-A deficiency in primate model of bronchopulmonary dysplasia with infection. In situ mRNA and immunostains. *Am J Respir Crit Care Med* 151(3 Pt 1): 854-866.
- Colvin, J.S., White, A.C., Pratt, S.J., and Ornitz, D.M. 2001. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 128(11): 2095-2106.
- Croce, C.M. 2008. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358(5): 502-511.
- Dalmau, J., Furneaux, H.M., Gralla, R.J., Kris, M.G., and Posner, J.B. 1990. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Annals of neurology* 27(5): 544-552.
- De Langhe, S.P., Sala, F.G., Del Moral, P.M., Fairbanks, T.J., Yamada, K.M., Warburton, D., Burns, R.C., and Bellusci, S. 2005. Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung. *Dev Biol* 277(2): 316-331.
- De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J.M., Hajihosseini, M., Rosewell, I., and Dickson, C. 2000. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth



- factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127(3): 483-492.
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Long, L., Wagner, B.J., and Brewer, G. 1997. Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements. *J Biol Chem* 272(44): 27635-27643.
- Denkert, C., Weichert, W., Pest, S., Koch, I., Licht, D., Kobel, M., Reles, A., Sehouli, J., Dietel, M., and Hauptmann, S. 2004. Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer research* 64(1): 189-195.
- Desai, T.J., Malpel, S., Flentke, G.R., Smith, S.M., and Cardoso, W.V. 2004. Retinoic acid selectively regulates *Fgf10* expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut. *Dev Biol* 273(2): 402-415.
- Dixon, D.A., Tolley, N.D., King, P.H., Nabors, L.B., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. 2001. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 108(11): 1657-1665.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews* 3(3): 195-205.
- Enokizono, Y., Konishi, Y., Nagata, K., Ouhashi, K., Uesugi, S., Ishikawa, F., and Katahira, M. 2005. Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J Biol Chem* 280(19): 18862-18870.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 9-22.



- Eversole, A. and Maizels, N. 2000. In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 20(15): 5425-5432.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A. 1998. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15293-15298.
- Fawal, M., Armstrong, F., Ollier, S., Dupont, H., Touriol, C., Monsarrat, B., Delsol, G., Payrastre, B., and Morello, D. 2006. A "liaison dangereuse" between AUF1/hnRNP D and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood* 108(8): 2780-2788.
- Figueroa, A., Cuadrado, A., Fan, J., Atasoy, U., Muscat, G.E., Munoz-Canoves, P., Gorospe, M., and Munoz, A. 2003. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol* 23(14): 4991-5004.
- Ford, L.P., Bagga, P.S., and Wilusz, J. 1997. The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol Cell Biol* 17(1): 398-406.
- Fuentes-Panana, E.M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J., and Ling, P.D. 2000. Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *J Virol* 74(17): 8166-8175.
- Galban, S., Martindale, J.L., Mazan-Mamczarz, K., Lopez de Silanes, I., Fan, J., Wang, W., Decker, J., and Gorospe, M. 2003. Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 23(20): 7083-7095.
- Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., and Steitz, J.A. 2001. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA (New York, NY)* 7(9): 1348-1361.



- Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N., and Steitz, J.A. 2000. HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3073-3078.
- Gao, F.B. and Keene, J.D. 1996. Hel-N1/Hel-N2 proteins are bound to poly(A)+ mRNA in granular RNP structures and are implicated in neuronal differentiation. *J Cell Sci* 109 (Pt 3): 579-589.
- Giangreco, A., Reynolds, S.D., and Stripp, B.R. 2002. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 161(1): 173-182.
- Giles, K.M., Daly, J.M., Beveridge, D.J., Thomson, A.M., Voon, D.C., Furneaux, H.M., Jazayeri, J.A., and Leedman, P.J. 2003. The 3'-untranslated region of p21WAF1 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein. *J Biol Chem* 278(5): 2937-2946.
- Giorgi, C. and Moore, M.J. 2007. The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Semin Cell Dev Biol* 18(2): 186-193.
- Good, P.J. 1997. The role of elav-like genes, a conserved family encoding RNA-binding proteins, in growth and development. *Semin Cell Dev Biol* 8(6): 577-584.
- Gouble, A., Grazide, S., Meggetto, F., Mercier, P., Delsol, G., and Morello, D. 2002. A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPD overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* 62(5): 1489-1495.
- Gouble, A. and Morello, D. 2000. Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development. *Oncogene* 19(47): 5377-5384.
- Guttinger, S., Muhlhauser, P., Koller-Eichhorn, R., Brennecke, J., and Kutay, U. 2004. Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(9): 2918-2923.

Hambardzumyan, D., Sergent-Tanguy, S., Thinard, R., Bonnamain, V., Masip, M., Fabre, A., Boudin, H., Neveu, I., and Naveilhan, P. 2009. AUF1 and Hu proteins in the developing rat brain: implication in the proliferation and differentiation of neural progenitors. *J Neurosci Res* 87(6): 1296-1309.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.

Hentze, M.W. and Kuhn, L.C. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8175-8182.

Holcik, M. and Sonenberg, N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 318-327.

Hong, J.H., Chiang, C.S., Tsao, C.Y., Lin, P.Y., Wu, C.J., and McBride, W.H. 2001. Can short-term administration of dexamethasone abrogate radiation-induced acute cytokine gene response in lung and modify subsequent molecular responses? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(2): 296-303.

Huang, Y. and Steitz, J.A. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell* 17(5): 613-615.

Jacobson, A. and Peltz, S.W. 1996. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65: 693-739.

Jin, S.P., Kim, J.H., Kim, M.A., Yang, H.K., Lee, H.E., Lee, H.S., and Kim, W.H. 2007. Prognostic significance of loss of c-fos protein in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* 13(4): 284-289.

Johansson, J. and Curstedt, T. 1997. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 244(3): 675-693.



- Jorgensen, P. and Tyers, M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14(23): R1014-1027.
- Katahira, M., Miyanoiri, Y., Enokizono, Y., Matsuda, G., Nagata, T., Ishikawa, F., and Uesugi, S. 2001. Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA. *J Mol Biol* 311(5): 973-988.
- Katsanou, V., Milatos, S., Yiakouvaki, A., Sgantzis, N., Kotsoni, A., Alexiou, M., Harokopos, V., Aidinis, V., Hemberger, M., and Kontoyiannis, D.L. 2009. The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Mol Cell Biol* 29(10): 2762-2776.
- Katsanou, V., Papadaki, O., Milatos, S., Blackshear, P.J., Anderson, P., Kollias, G., and Kontoyiannis, D.L. 2005. HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell* 19(6): 777-789.
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. 2006. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 26(8): 3295-3307.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169(6): 871-884.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121(6): 823-835.



- Kim, H.H. and Gorospe, M. 2008. Phosphorylated HuR shuttles in cycles. *Cell Cycle* 7(20): 3124-3126.
- Kim, H.H., Yang, X., Kuwano, Y., and Gorospe, M. 2008. Modification at HuR(S242) alters HuR localization and proliferative influence. *Cell Cycle* 7(21): 3371-3377.
- King, P.H. 2000. RNA-binding analyses of HuC and HuD with the VEGF and c-myc 3'-untranslated regions using a novel ELISA-based assay. *Nucleic Acids Res* 28(7): E20.
- Knudson, A.G. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1(2): 157-162.
- Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., and Yokota, J. 2004. Identification of genes whose expression is upregulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene* 23(17): 3089-3096.
- Kohler, A. and Hurt, E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 761-773.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Kollias, G. 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10(3): 387-398.
- Kuersten, S. and Goodwin, E.B. 2003. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4(8): 626-637.
- Kukushkin, A.N., Abramova, M.V., Svetlikova, S.B., Darieva, Z.A., Pospelova, T.V., and Pospelov, V.A. 2002. Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of



- MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter. *Oncogene* **21**(5): 719-730.
- Kuroki, Y., McCormack, F.X., Ogasawara, Y., Mason, R.J., and Voelker, D.R. 1994. Epitope mapping for monoclonal antibodies identifies functional domains of pulmonary surfactant protein A that interact with lipids. *J Biol Chem* **269**(47): 29793-29800.
- Lagnado, C.A., Brown, C.Y., and Goodall, G.J. 1994. AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol* **14**(12): 7984-7995.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. 2004. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* **23**(15): 3092-3102.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. 1999. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**(5413): 499-502.
- Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M., and Di Lauro, R. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**(4): 1093-1104.
- Le Hir, H., Nott, A., and Moore, M.J. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* **28**(4): 215-220.
- Le Hir, H. and Seraphin, B. 2008. EJCs at the heart of translational control. *Cell* **133**(2): 213-216.
- Lebeche, D., Malpel, S., and Cardoso, W.V. 1999. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mech Dev* **86**(1-2): 125-136.



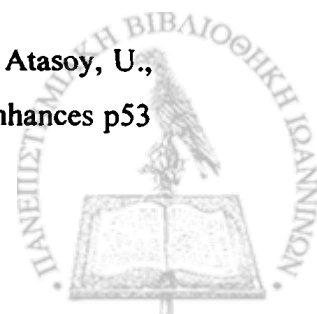
- Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. 2004. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11(10): 992-1000.
- Lesur, O., Bernard, A., Arsalane, K., Lauwerys, R., Begin, R., Cantin, A., and Lane, D. 1995. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 152(1): 290-297.
- Levadoux-Martin, M., Gouble, A., Jegou, B., Vallet-Erdtmann, V., Auriol, J., Mercier, P., and Morello, D. 2003. Impaired gametogenesis in mice that overexpress the RNA-binding protein HuR. *EMBO Rep* 4(4): 394-399.
- Levine, T.D., Gao, F., King, P.H., Andrews, L.G., and Keene, J.D. 1993. Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Mol Cell Biol* 13(6): 3494-3504.
- Levy, A.P. 1998. Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins. *Trends in cardiovascular medicine* 8(6): 246-250.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A.P. 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273(11): 6417-6423.
- Li, H., Park, S., Kilburn, B., Jelinek, M.A., Henschen-Edman, A., Aswad, D.W., Stallcup, M.R., and Laird-Offringa, I.A. 2002. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 277(47): 44623-44630.
- Lin, S., Wang, W., Wilson, G.M., Yang, X., Brewer, G., Holbrook, N.J., and Gorospe, M. 2000. Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is



- mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 20(21): 7903-7913.
- Lin, W.J., Duffy, A., and Chen, C.Y. 2007. Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J Biol Chem* 282(27): 19958-19968.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7(7): 719-723.
- Lofflin, P., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. 1999. Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* 13(14): 1884-1897.
- Lopez de Silanes, I., Fan, J., Yang, X., Zonderman, A.B., Potapova, O., Pizer, E.S., and Gorospe, M. 2003. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22(46): 7146-7154.
- Lopez de Silanes, I., Quesada, M.P., and Esteller, M. 2007. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol* 29(1): 1-17.
- Lopez de Silanes, I., Zhan, M., Lal, A., Yang, X., and Gorospe, M. 2004. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 2987-2992.
- Lu, J.Y., Bergman, N., Sadri, N., and Schneider, R.J. 2006a. Assembly of AUF1 with eIF4G-poly(A) binding protein complex suggests a translation function in AU-rich mRNA decay. *RNA* 12(5): 883-893.
- Lu, J.Y., Sadri, N., and Schneider, R.J. 2006b. Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev* 20(22): 3174-3184.



- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., and Furneaux, H. 1996. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* 271(14): 8144-8151.
- Ma, W.J., Chung, S., and Furneaux, H. 1997. The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 25(18): 3564-3569.
- Ma, W.J. and Furneaux, H. 1997. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. *Hum Genet* 99(1): 32-33.
- Maeda, Y., Dave, V., and Whitsett, J.A. 2007. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 87(1): 219-244.
- Mailleux, A.A., Tefft, D., Ndiaye, D., Itoh, N., Thiery, J.P., Warburton, D., and Bellusci, S. 2001. Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Mech Dev* 102(1-2): 81-94.
- Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J.C., Neira, J.L., and Iovanna, J.L. 2006. Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2671-2676.
- Malpel, S., Mendelsohn, C., and Cardoso, W.V. 2000. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127(14): 3057-3067.
- Martin, K.C. and Ephrussi, A. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136(4): 719-730.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. 2008. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* 9(11): 843-854.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D., and Gorospe, M. 2003. RNA-binding protein HuR enhances p53



- translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8354-8359.
- Mazan-Mamczarz, K. and Gartenhaus, R.B. 2007. Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1. *Cancer Genomics Proteomics* 4(3): 233-239.
- Mazroui, R., Di Marco, S., Clair, E., von Roretz, C., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Saleh, M., and Gallouzi, I.E. 2008. Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol* 180(1): 113-127.
- Meng, Z., King, P.H., Nabors, L.B., Jackson, N.L., Chen, C.Y., Emanuel, P.D., and Blume, S.W. 2005. The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 33(9): 2962-2979.
- Min, H., Danilenko, D.M., Scully, S.A., Bolon, B., Ring, B.D., Tarpley, J.E., DeRose, M., and Simonet, W.S. 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 12(20): 3156-3161.
- Minoo, P., Su, G., Drum, H., Bringas, P., and Kimura, S. 1999. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in Nkx2.1(-/-) mouse embryos. *Dev Biol* 209(1): 60-71.
- Mollard, R., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. 2000. Stage-dependent responses of the developing lung to retinoic acid signaling. *Int J Dev Biol* 44(5): 457-462.
- Moore, M.J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309(5740): 1514-1518.



- Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Harkins, L., and King, P.H. 2001. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer research* 61(5): 2154-2161.
- Nabors, L.B., Suswam, E., Huang, Y., Yang, X., Johnson, M.J., and King, P.H. 2003. Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res* 63(14): 4181-4187.
- Naiche, L.A. and Papaioannou, V.E. 2003. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* 130(12): 2681-2693.
- Nguyen-Chi, M. and Morello, D. 2008. [Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]. *Med Sci (Paris)* 24(3): 290-296.
- Okubo, T. and Hogan, B.L. 2004. Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J Biol* 3(3): 11.
- Pack, R.J., Al-Ugaily, L.H., and Morris, G. 1981. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132(Pt 1): 71-84.
- Papadaki, O., Milatos, S., Grammenoudi, S., Mukherjee, N., Keene, J.D., and Kontoyiannis, D.L. 2009. Control of thymic T cell maturation, deletion and egress by the RNA-binding protein HuR. *J Immunol* 182(11): 6779-6788.
- Parker, R. and Sheth, U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25(5): 635-646.
- Peng, S.S., Chen, C.Y., Xu, N., and Shyu, A.B. 1998. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* 17(12): 3461-3470.



- Piedboeuf, B., Laberge, J.M., Ghitulescu, G., Gamache, M., Petrov, P., Belanger, S., Chen, M.F., Hashim, E., and Possmayer, F. 1997. Deleterious effect of tracheal obstruction on type II pneumocytes in fetal sheep. *Pediatr Res* 41(4 Pt 1): 473-479.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17(3): 118-126.
- Pullmann, R., Jr., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J.L., Yang, X., and Gorospe, M. 2007. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol* 27(18): 6265-6278.
- Quaggin, S.E., Schwartz, L., Cui, S., Igarashi, P., Deimling, J., Post, M., and Rossant, J. 1999. The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 126(24): 5771-5783.
- Rawlins, E.L. and Hogan, B.L. 2006. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 133(13): 2455-2465.
- Rebane, A., Aab, A., and Steitz, J.A. 2004. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA (New York, NY)* 10(4): 590-599.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11(11): 1640-1647.
- Reynolds, S.D., Giangreco, A., Power, J.H., and Stripp, B.R. 2000a. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156(1): 269-278.
- Reynolds, S.D., Hong, K.U., Giangreco, A., Mango, G.W., Guron, C., Morimoto, Y., and Stripp, B.R. 2000b. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing



- progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(6): L1256-1263.
- Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.M., and White, K. 1988. The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* 242(4885): 1570-1572.
- Robinow, S. and White, K. 1988. The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126(2): 294-303.
- . 1991. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22(5): 443-461.
- Roe, O.D., Anderssen, E., Sandeck, H., Christensen, T., Larsson, E., and Lundgren, S. 2009. Malignant pleural mesothelioma: Genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets. *Lung Cancer*.
- Sachs, A.B., Sarnow, P., and Hentze, M.W. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89(6): 831-838.
- Sakiyama, J., Yamagishi, A., and Kuroiwa, A. 2003. Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development* 130(7): 1225-1234.
- Sarkar, B., Xi, Q., He, C., and Schneider, R.J. 2003. Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol* 23(18): 6685-6693.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et al. 1999. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21(1): 138-141.



- Sheflin, L.G., Zou, A.P., and Spaulding, S.W. 2004. Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* 322(2): 644-651.
- Shuman, S. 2001. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 1-40.
- Simon, E., Camier, S., and Seraphin, B. 2006. New insights into the control of mRNA decapping. *Trends Biochem Sci* 31(5): 241-243.
- Sokolowski, M., Furneaux, H., and Schwartz, S. 1999. The inhibitory activity of the AU-rich RNA element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region correlates with its affinity for the elav-like HuR protein. *J Virol* 73(2): 1080-1091.
- Sommer, S., Cui, Y., Brewer, G., and Fuqua, S.A. 2005. The c-Yes 3'-UTR contains adenine/uridine-rich elements that bind AUF1 and HuR involved in mRNA decay in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97(3): 219-229.
- Sparanese, D. and Lee, C.H. 2007. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 35(4): 1209-1221.
- Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., and Willis, A.E. 1998. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16(3): 423-428.
- Suzuki, M., Iijima, M., Nishimura, A., Tomozoe, Y., Kamei, D., and Yamada, M. 2005. Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence. *FEBS J* 272(15): 3975-3987.
- Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G., Rosenfeld, M., Wong, E., Henson, J., Posner, J.B., and Furneaux, H.M. 1991. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67(2): 325-333.



- Tange, T.O., Nott, A., and Moore, M.J. 2004. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 279-284.
- Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F. et al. 1996. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4(5): 445-454.
- Tefft, D., Lee, M., Smith, S., Crowe, D.L., Bellusci, S., and Warburton, D. 2002. mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(4): L700-706.
- van der Giessen, K., Di-Marco, S., Clair, E., and Gallouzi, I.E. 2003. RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 278(47): 47119-47128.
- van der Giessen, K. and Gallouzi, I.E. 2007. Involvement of transportin 2-mediated HuR import in muscle cell differentiation. *Mol Biol Cell* 18(7): 2619-2629.
- Varani, G. and Nagai, K. 1998. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 27: 407-445.
- Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., and Nebreda, A.R. 2007. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 39(6): 750-758.
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., and Brewer, G. 1998. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48(2): 195-202.



- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H., and Gorospe, M. 2000a. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* 19(10): 2340-2350.
- Wang, W., Fan, J., Yang, X., Furer-Galban, S., Lopez de Silanes, I., von Kobbe, C., Guo, J., Georas, S.N., Fougere, F., Hardie, D.G. et al. 2002. AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Molecular and cellular biology* 22(10): 3425-3436.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. 2000b. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20(3): 760-769.
- Wang, W., Yang, X., Kawai, T., Lopez de Silanes, I., Mazan-Mamczarz, K., Chen, P., Chook, Y.M., Quensel, C., Kohler, M., and Gorospe, M. 2004. AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1: involvement in the nuclear import of RNA-binding protein HuR. *The Journal of biological chemistry* 279(46): 48376-48388.
- Weaver, M., Batts, L., and Hogan, B.L. 2003. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Dev Biol* 258(1): 169-184.
- Weaver, M., Yingling, J.M., Dunn, N.R., Bellusci, S., and Hogan, B.L. 1999. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* 126(18): 4005-4015.
- White, A.C., Xu, J., Yin, Y., Smith, C., Schmid, G., and Ornitz, D.M. 2006. FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains. *Development* 133(8): 1507-1517.
- Wilson, G.M., Lu, J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, S., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E.C., Ysla, R.M., Charles, S., and Brewer, G. 2003a. Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-



- destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J Biol Chem* 278(35): 33039-33048.
- Wilson, G.M., Lu, J., Sutphen, K., Sun, Y., Huynh, Y., and Brewer, G. 2003b. Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. *J Biol Chem* 278(35): 33029-33038.
- Wilusz, C.J., Wormington, M., and Peltz, S.W. 2001. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature reviews* 2(4): 237-246.
- Withers, D.A., Harvey, R.C., Faust, J.B., Melnyk, O., Carey, K., and Meeker, T.C. 1991. Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol* 11(10): 4846-4853.
- Woenckhaus, M., Merk, J., Stoehr, R., Schaeper, F., Gaumann, A., Wiebe, K., Hartmann, A., Hofstaedter, F., and Dietmaier, W. 2008. Prognostic value of FHIT, CTNBN1, and MUC1 expression in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 39(1): 126-136.
- Woo, H.H., Zhou, Y., Yi, X., David, C.L., Zheng, W., Gilmore-Hebert, M., Kluger, H.M., Ulukus, E.C., Baker, T., Stoffer, J.B. et al. 2009. Regulation of non-AU-rich element containing c-fms proto-oncogene expression by HuR in breast cancer. *Oncogene* 28(9): 1176-1186.
- Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H. et al. 2007. Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice. *J Clin Invest* 117(10): 2929-2940.
- Yao, X.L., Ikezono, T., Cowan, M., Logun, C., Angus, C.W., and Shelhamer, J.H. 1998a. Interferon-gamma stimulates human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): L864-869.



- Yao, X.L., Levine, S.J., Cowan, M.J., Logun, C., and Shelhamer, J.H. 1998b. Tumor necrosis factor-alpha stimulates human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4): 629-635.
- Ye, Q., Fujita, M., Ouchi, H., Inoshima, I., Maeyama, T., Kuwano, K., Horiuchi, Y., Hara, N., and Nakanishi, Y. 2004. Serum CC-10 in inflammatory lung diseases. *Respiration* 71(5): 505-510.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., and Brewer, G. 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol* 13(12): 7652-7665.
- Zou, T., Liu, L., Rao, J.N., Marasa, B.S., Chen, J., Xiao, L., Zhou, H., Gorospe, M., and Wang, J.Y. 2008. Polyamines modulate the subcellular localization of RNA-binding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1. *Biochem J* 409(2): 389-398.
- Zubiaga, A.M., Belasco, J.G., and Greenberg, M.E. 1995. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 15(4): 2219-2230.

