



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διερεύνηση του ρόλου μεταμεταγραφικών παραγόντων στην
ανοσοβιολογία και την ανάπτυξη των ΙΦΝΕ με χρήση διαγονιδιακών
συστημάτων επιλεκτικής αφαίρεσης**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΜΑΡΙΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2009





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διερεύνηση του ρόλου μεταμεταγραφικών παραγόντων στην
ανοσοβιολογία και την ανάπτυξη των ΙΦΝΕ με χρήση διαγονιδιακών
συστημάτων επιλεκτικής αφαίρεσης**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΜΑΡΙΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2009



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321964



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Δημητρίου Μάριου : 28-11-2005

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

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παπαμαρκάκη Θωμά Επικουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-12-2005

*«Διερεύνηση του ρόλου μεταγραφικών παραγόντων στην ανοσοβιολογία και την ανάπτυξη των
ΙΦΝΕ με χρήση διαγονιδιακών συστημάτων επιλεκτικής αφαίρεσης»*

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

Γαλάρης Δημήτριος

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιάνος Επαμεινώνδας

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φώτση Θεόδωρος

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κοντογιάννης Δημήτριος

Ερευνητής Β' Ινστιτούτου Ανοσολογίας του
Ε.ΚΕ.Β.Ε «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Λαζαρίδης Ιωάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπαμαρκάκη Θωμά

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φριλίγγος Ευστάθιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Γραμματέας της Σχολής

[Handwritten signature]



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πριν από 4 περίπου χρόνια χωρίς ακόμη να έχω τελειώσει το βασικό μου πτυχίο στη Μοριακή Βιολογία και Γενετική προκυρήχθηκαν θέσεις εκπόνησης πτυχιακών εργασιών σε όλη την Ελλάδα. Διαβάζοντας το κείμενο του Κ^{ου} Κοντογιάννη με τις ερευνητικές του ενασχολήσεις κατάλαβα αμέσως ότι αυτό ήταν το θέμα με το οποίο θα ήθελα να ασχοληθώ. Είχα την χαρά και την τιμή να επιλεχθώ σε πρώτη φάση για την εκπλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας που με έφερε σε επαφή με το πεδίο έρευνας του μετα-μεταγραφικού ελέγχου. Η πολυπλοκότητα του, οι καινοτομικές θεωρήσεις για την ροή της γενετικής πληροφορίας και η σημαντικότητα του για την ομοιόσταση ενός οργανισμού αποτελούσε μια πρόκληση από την αρχή της ενασχόλησης μου. Ήταν συνεπώς για μένα ένα λογικό επακόλουθο η εκπόνηση της παρούσας διατριβής

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο μετα-μεταγραφικού ελέγχου του Κ^{ου} Κοντογιάννη στο ερευνητικό κέντρο Αλέξανδρος Φλέμινγκ και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 770. Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Κ^ο Κοντογιάννη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διατριβή αυτή στο εργαστήριο του. Πάνω από όλα ήταν ένα μέντορας για μένα ο οποίος μοίραζε την γνώση του και την εμπειρία του βοηθώντας σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής αυτής. Όλα αυτά τα χρόνια ήταν κοντά μου και με κατεύθυνε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο ώστε κάθε μας επιστημονική συζήτηση να οδηγεί σε χρήσιμα και σημαντικά συμπεράσματα. Ως ένα μεγάλο δάσκαλο λοιπόν του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Ακόμη ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα και τα οποία συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην εργασία αυτή. Η προσαρμογή μου στο εργαστήριο ξεκίνησε με την Αθηνά αλλά και με τους Σταύρο, Βίκυ και Ολυμπία τους οποίους ευχαριστώ για την όποια θεωρητική αλλά και τεχνική βοήθεια μου προσέφεραν. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη Σοφία για την άψογη συνεργασία και επικοινωνία. Η εμπλοκή της στο πειραματικό αλλά και θεωρητικό κομμάτι ήταν μεγάλη καθώς αποτέλεσε το άτομο με το οποίο συνεργάστηκα περισσότερο ιδιαίτερα στα τομέα της αιμοποιητικής και κυτταρομετρικής ανάλυσης. Ευχαριστώ τον Νίκο ο οποίος εκτός από καλός συνεργάτης είναι και καλός φίλος μέσα, αλλά και έξω από τον επιστημονικό χώρο, στηρίζοντας με στις όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα κατά την διάρκεια των χρόνων. Η Ανθή λειτούργησε υποστηρικτικά από τότε που πρωτο-



επικοινωνήσαμε και την ευχαριστώ για την ικανότητα της και της διάθεση της να βοηθά σε όποιο τομέα χρειάστηκε. Ακόμη ευχαριστώ μέλη του εργαστηρίου που είχαν μικρότερη παρουσία στο εργαστήριο αλλά συνέβαλαν με διαφορετικό τρόπο ο καθένας και αυτοί ήταν οι Πέπη, Άκης, Αναστασία, Γιάννης και Φλώρα.

Επίσης, ευχαριστώ τον τομέα Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων και ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή καθηγητή Κ^ο Φριλίγγο καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κ^α Παπαμαρκάκη, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά και βοήθησαν κατά την συγγραφή του τελικού κειμένου. Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές της επταμελούς επιτροπής μου που βοήθησαν με τις παρατηρήσεις τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, τον πατέρα μου Γιώργο, τη μητέρα μου Ξανθή και τον αδερφό μου Σωτήρη, οι οποίοι στήριξαν την προσπάθειά μου με κάθε τρόπο, μου συμπαραστάθηκαν ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές που αντιμετώπισα και μου προσέφεραν χρήσιμες συμβουλές.

Ένα ξεχωριστό άτομο για την ζωή μου αποτελεί η Ελευθερία και στην οποία οφείλω ένα ξεχωριστό ευχαριστώ. Ίσως και ένα συγγνώμη για την όποια δυσαρέσκεια που μπορεί να της μετέφερα λόγω άγχους και των όποιων δυσάρεστων συνθηκών δημιουργήθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Ωστόσο η ικανότητα της να με «ελευθερώνει» είναι αυτή που συνέβαλε πολύ σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα της ολοκλήρωσης αυτής της διατριβής.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A

AMPK	Adenosine Monophosphate Kinase (Κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης)
APRIL	Acidic protein rich in leucine (Όξινη 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)

C

CARD	Caspase-Recruitment Domain (Περιοχή προσέλκυσης κασπασών)
CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (Σχετιζόμενη με συνενεργοποιητή μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης 1)
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

DNA	Deoxyribonucleic acid (Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
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)
ELAV-like	Embryonic Lethal Abnormal Vision-like (Παρόμοιο με εμβρυικά θνησιγόνο ανωμάλια στην όραση)
ELISA	Enzyme -linked Immunosorbent Assay (Εξαρτημένη από ένζυμο ανοσοπροσροφητική αναλυτική μέθοδος)
ERK	Extracellular-signal -Regulated Kinase (Κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάρια σήματα)
ES	Embryonic Stem cells (Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα)
F	
FBP	Far upstream sequence element Binding Protein (Πρωτεΐνη που προσδένεται στο στοιχείο της μακρινά ανοδικής αλληλουχίας)
FBS	Fetal Bovine Serum (Ορός εμβρύου βοός)
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 (Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 2)
G	
GAP-43	Growth Associated Protein -43 (Πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αύξηση-43)
GAPDH	Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (Αφυδρογονάση της 3- φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης)
GDP/GTP	Guanosine diphosphate/triphosphate (Δι/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)
HHCS	Hereditary Hyperferritinaemia Cataract Syndrome (Σύνδρομο υπερφερριταϊναιμίας και καταρράκτη)
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)
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 β ,2,3,4,6,8,10,12	Interleukin 1 β ,2,3,4,6,8,10,12 (Ιντερλευκίνη 1 β ,2,3,4,6,8,10,12)
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (Επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξειδίου)
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 1 α ,1 β ,2	Macrophage Inflammatory Protein 1 α ,1 β ,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)
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	
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-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης)
PRRs	Pattern Recognition Receptors (Υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων)
R	
R-EMSA	RNA-Electrophoretic mobility shift assay (RNA-Δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας)
R-IP	Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (Ανοσοκατακρύμνηση Ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων)
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Σύμπλοκο αποσίωπησης εξαρτώμενο από RNA)
RNA	Ribonucleic acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
RNP	Ribonucleoprotein complex (Ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο)
RRM	RNA Recognition Motif (Μοτίβο αναγνώρισης RNA)



RT	Reverse transcriptase (Αντίστροφη μεταγραφή)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
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)
snRNPs	small nuclear RNP (μικρά πυρηνικά RNP)
T	
TAK1	TGF-β-Activated Kinase 1 (Κινάση 1 που ενεργοποιείται από TGF-β)
TCA3	T-Cell Activation gene 3 (Γονίδιο ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων 3)
TEPM	Thioglutolate Elicited Peritoneal Macrophages (Μακροφάγα εκλυόμενα από την περιτοναϊκή κοιλότητα)
TGFβ1,β2,β3	Transforming growth factor β1,β2,β3 (Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β1,β2,β3)
TIA-1	T-cell restricted intracellular antigen-1 (Ειδικό των T-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)
TLRs	Toll-like Receptors (Υποδοχείς τύπου Toll)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Παράγοντας νέκρωσης όγκων)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (Υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκων)
Tpl-2/Cot	Tumor Progression locus 2/ cancer osaka thyroid oncogene (Ογκογονικός γενετικός τόπος 2/ογκογονίδιο θυρεοειδούς καρκίνου osaka)
TRAF	Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor (Παράγοντας που αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των υποδοχέων TNF) TRIF-related adaptor molecule
TRAM	(Μόριο προσαρμοστής σχετιζόμενο με την TRIF)
TTP	Tristetraprolin (Τριστετραπρολίνη)
U	
UTR	untranslated region (μη μεταφραζόμενη περιοχή)



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή	1
1.1. Στοιχεία μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης	5
1.1.1. Ο ρόλος των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων στη διαχείριση του RNA	5
1.1.2. Τα στοιχεία ARE και η σχέση τους με την αποδόμηση μορίων mRNA	8
1.1.3. Ριβοβουκλεοπρωτεΐνες που προσδένουν στοιχεία ARE	11
1.1.4. Σύζευξη των μηχανισμών ρύθμισης των ARE με κεντρικούς μηχανισμούς αποδόμησης και μεταφραστικής καταστολής	13
1.2. Οι ARE-BPs Elavl1/HuR και hnRNP/AUF1	17
1.2.1 Η πρωτεΐνη Elavl1/HuR	17
1.2.2 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης HuR	19
1.2.3. Βιολογικές δράσεις της πρωτεΐνης HuR <i>in vivo</i>	23
1.2.4. Η πρωτεΐνη AUF1/hnRNP	25
1.2.4.1. Δομή και χαρακτηριστικά του AUF1	25
1.2.4.2. Βιολογικές δράσεις της πρωτεΐνης AUF1 <i>in vivo</i>	27
1.3. Γονιδιακή έκφραση και έμφυτη ανοσιακή απόκριση	28
1.3.1 Η πολυπαραγοντική βάση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης	28
1.3.2 Οι μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια της μυελοποίησης.	29
1.3.2.1. Η αιμοποίηση.	30
1.3.2.2 Οι κυτταροκίνες ως σήματα μυελοειδικής διαφοροποίησης	30
1.3.2.3 Γονιδιακή ρύθμιση κυττοκινών της μυελοποίησης μέσω ARE.	32
1.3.2.4 Μυελοποίηση και μεταγραφικοί παράγοντες	33
1.3.3 Οι μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια έμφυτων φλεγμονωδών αποκρίσεων	35
1.3.3.1 Βακτηριακοί υποδοχείς	35
1.3.3.2. Φλεγμονωδοσυσχετιζόμενα ARE μονοπάτια.	37
1.3.4. Συσχέτιση παθολογίας και μετα-μεταγραφικού ελέγχου μέσω ARE	39
1.3.4.1 ARE-BPs και μετα-μεταγραφική ρύθμιση σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις	39
1.3.4.2 Τα στοιχεία ARE του TNF κατά την ανάπτυξη φλεγμονώδους παθολογίας	41
1.3.4.3. Οι ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ)	42
1.4. Η μετα-μεταγραφική εμπλοκή της HuR και του AUF1 σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις <i>in vivo</i>.	46
1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης.	50
 2.Υλικά και Μέθοδοι	 51
2.1. Γενικά χημικά και αντιδραστήρια	52
2.1.1 Ειδικά ένζυμα – Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας.	52
2.1.2. Θρεπτικά μέσα – Αντιδραστήρια κυτταροκαλλιέργειας.	52
2.1.3. Ειδικά πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.	53
2.1.4. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.	53
2.2 Τεχνολογίες γονιδιακής τροποποίησης στον ποντικό.	54
2.3. Πειραματόζωα- ποντικοί	56
2.4. Ανάλυση γονοτύπου	56
2.4.1. Ανάλυση γονότυπου με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης	



πολυμεράσης-PCR	57
2.5. Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός υποπληθυσμών.	60
2.5.1 Η χρώση δεικτών επιφανείας για την ταυτοποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.	61
2.5.2. Πειράματα διαχωρισμού κυττάρων	63
2.5.3 Πειράματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων κυττάρων	64
2.5.4 Πειράματα ανίχνευσης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης	64
2.6. Πείραμα εποικισμού και ανταγωνιστικού εποικισμού	64
2.7. Κυτταροκαλλιέργειες ex-vivo	65
2.7.1. Πειράματα σχηματισμού αποικιών <i>in vitro</i> παρουσία κυττοκινών	65
2.7.2. Απομόνωση μακροφάγων από τον μυελό των οστών (MMO)	65
2.7.3. Καλλιέργειες Εκλύομένων Περιτοναϊκών Μακροφάγων (ΕΜΠ)	67
2.7.4. Καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών με τον GM-CSF	68
2.8. Απομόνωση πειραματικού υλικού <i>in vitro</i>	68
2.8.1. Ερεθισμός με προσδέτες των Toll like υποδοχέων	68
2.8.2. Μέτρηση της σταθερότητας του mRNA μέσω της προσθήκης	69
Ακτινομυκίνης D	69
2.8.3 Διαχωρισμός μονοριβοσωμικού και πολυριβοσωμικού κλάσματος mRNA με υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση σουκρόζης.	70
2.8.4 Διάλυμα λύσης παρουσία πρωτεΐνης K για απομόνωση DNA.	70
2.8.5. Laemmly buffer για την απομόνωση πρωτεϊνών.	70
2.8.6 Απομόνωση RNA με Trizol.	71
2.9. Ανάλυση του πειραματικού υλικού με βιοχημικές μεθόδους	71
2.9.1. Στύπωμα κατά Western	71
2.9.2. Ανίχνευση εκκρινόμενων κυττοκινών με την μέθοδο του ανοσοθορισμού	76
2.9.3. Ανάλυση RNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).	77
2.10. <i>In vivo</i> μοντέλα ανάπτυξης παθολογίας	79
2.10.1 Το μοντέλο της πειραματικής σηπτικής καταπληξίας με LPS.	79
2.10.2. Το μοντέλο ανάπτυξης χημικά επαγόμενης φλεγμονώδης κολίτιδας με DSS.	80
2.10.3 Το μοντέλο ανάπτυξης χρόνιας ΙΦΝΕ, ο γεννητικά τροποποιημένος <i>TNF^{ΔARE}</i> ποντικός.	82
2.10.3.1 Ιστολογική και ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της φλεγμονής στους <i>TNF^{ΔARE}</i> ποντικούς	82
2.11. Μέθοδοι απομόνωσης και ανάλυσης του <i>In vivo</i> πειραματικού υλικού	83
2.11.1 Ιστολογική ανάλυση	83
2.11.2. Απομόνωση ορών του αίματος από τους <i>TNF^{ΔARE}</i> ποντικούς και από ποντικούς που έχει χορηγηθεί LPS.	84
2.12. Στατιστική ανάλυση	84
3. Αποτελέσματα	85
3.1. Ο ρόλος της HuR στη μυελοποίηση και την ανάπτυξη των κυττάρων της έμφυτης ανοσολογικής αντίδρασης	86
3.1.1. Τα επίπεδα έκφρασης της HuR αυξάνονται κατά τη μυελοποίηση και το σύνολο της αιμοποίησης	86
3.1.2. Συστήματα αιμοποιητικής και μυελοειδικής απαλοιφής	



της πρωτεΐνης HuR	88
3.1.3. Η φαινοτυπική ανάλυση του HuR ^{-/-} εμβρυικού ήπατος, αποκαλύπτει μειωμένα προγονικά κύτταρα και σημαντική απώλεια ερυθροκυττάρων.	89
3.1.4 Η πρωτεΐνη HuR είναι απαραίτητη για την μυελοειδική διαφοροποίηση <i>in vitro</i>	92
3.1.5. Τα αρχέγονα κύτταρα που υπολείπονται της HuR παρουσιάζουν μειωμένο αιμοποιητικό δυναμικό <i>in vivo</i> .	94
3.1.6. Τα HuR ^{-/-} αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά κυττάρων στην μιτωτική φάση του κυτταρικού κύκλου.	97
3.1.7 Παρουσία των κυττοκινών M-CSF, GM-CSF και φλεγμονώδων ερεθισμάτων αντιστρέφεται η μυελοποιητική ανεπάρκεια των HuR ^{-/-} κυττάρων.	100
3.2. Ο ρόλος της HuR στην έμφυτη φλεγμονώδη απάντηση	103
3.2.1. Ποντικοί που υπολείπονται της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ενδοτοξαιμία	103
3.2.2. Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας επηρεάζει τη έκφραση δικτύων γονιδίων κυτταροκινών και ενδοκυττάρων σημάτων της φλεγμονής	105
3.2.3 Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας δεν επηρεάζει την έκφραση και την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR	107
3.2.4. Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας προκαλεί αλλαγές στη βιοσύνθεση των κυτταροκινών	107
3.2.5. Διαχωρισμός των μετα-μεταγραφικών δράσεων της HuR: Το παράδειγμα του TNF.	111
3.3. Ο ρόλος της έμφυτης HuRn στην ρύθμιση της εντερικής φλεγμονής	114
3.3.1 Η HuR δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας που εμπλέκονται στην ανάπτυξη οξείας ΙΦΝΕ	114
3.3.2 Συσχέτιση των δράσεων της HuR με το TNF 3' ARE προς τη βιοσύνθεση του TNF και ως προς την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονώδους ΙΦΝΕ επαγόμενης από τον TNF	119
3.4. Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της hnRNP/AUF1 στην έμφυτη ανοσιακή απόκριση.	122
3.4.1 Δημιουργία συστήματος μυελοειδικής απαλοιφής της RBP hnRNP/AUF1	122
3.4.2 Ποντικοί που υπολείπονται της AUF1 από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι ελαφρά ανθεκτικοί στην ενδοτοξαιμία	125
3.4.3 Ο AUF1 δεν επηρεάζει τη βιοσύνθεση του TNF σε μακροφάγα κύτταρα	125
 4. Συζήτηση	 129
4.1 Η HuR ως ρυθμιστής της μυελοποίησης.	130
4.2 Η HuR ως ρυθμιστής της έκφρασης των δικτύων των κυτταροκινών	134
4.3 Η HuR ως ρυθμιστής φλεγμονωδών αποκρίσεων	138

5. Περιλήψεις	141
----------------------	------------

6. Βιβλιογραφία	147
------------------------	------------

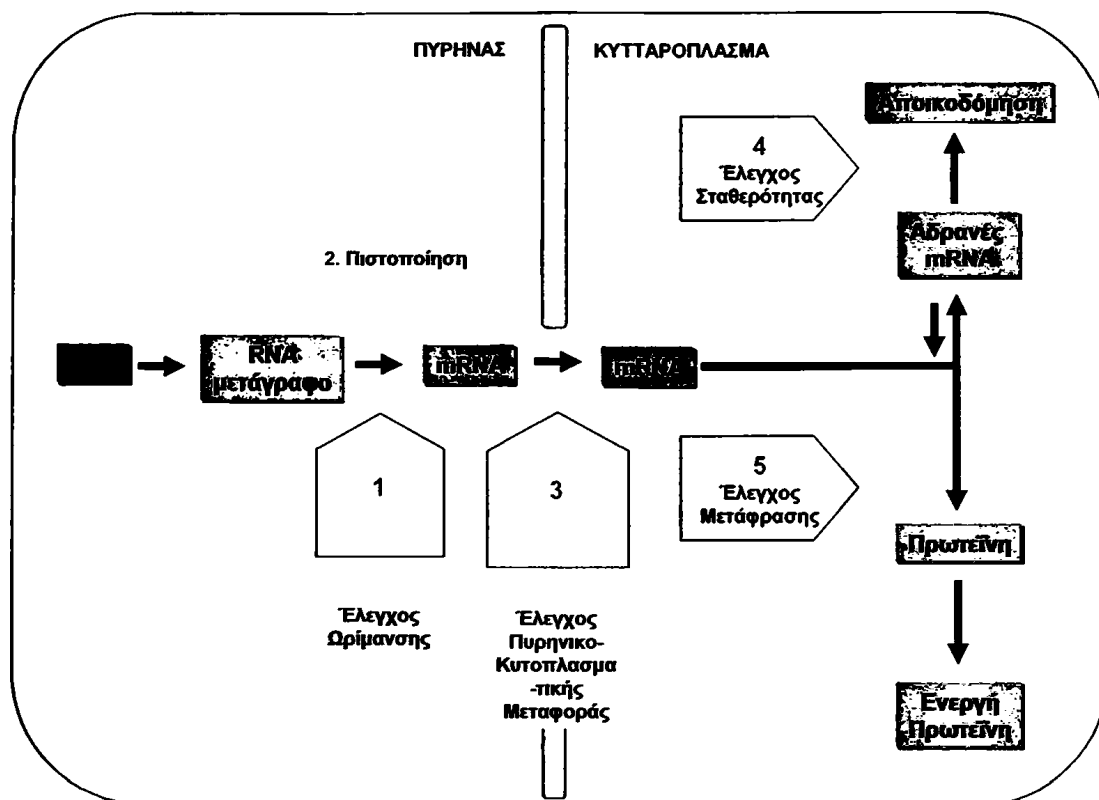


1. Εισαγωγή



Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης τελείται σε διάφορα στάδια τα οποία καθορίζουν την ταυτότητα και τη χρήση της γονιδιακής πληροφορίας. Οι επιγενετικοί και μεταγραφικοί μηχανισμοί καθορίζουν το είδος και εν μέρη το ποσό της γονιδιακής πληροφορίας η οποία μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί από ένα κύτταρο για τις αντιδράσεις του. Η λειτουργική απόφαση για τη χρήση της γονιδιακής πληροφορίας - με τη μορφή μορίων RNA - βασίζεται στο σύνολο μετα-μεταγραφικών διεργασιών που ανταποκρίνονται άμεσα σε εξωγενή ερεθίσματα και ενδοκυττάρια σήματα. Οι διεργασίες μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 1.1) αποτελούν ένα πολύ-παραγοντικό σύστημα συντονισμένων διεργασιών το οποίο καθορίζει τη χρήση του RNA και περιλαμβάνει τους πυρηνικούς μηχανισμούς ωρίμανσης πρόδρομου RNA σε mRNA (ιδιότυπο & εναλλακτικό μάτισμα), τους μηχανισμούς πιστοποίησης για την καταστροφή «λανθασμένων» μεταγράφων, τους μηχανισμούς πυρηνικής εξαγωγής και μεταφοράς του mRNA στο κυτταρόπλασμα και τους μηχανισμούς κυτταροπλασματικού ελέγχου όπως η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και η ρύθμιση της μετάφρασης του για την πρωτεϊνοσύνθεση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η μετα-μεταγραφική ρύθμιση προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως (α) την εξοικονόμηση ενέργειας με τη δημιουργία αποθεμάτων RNA πριν από την πρωτεϊνοσύνθεση, (β) τη γρήγορη και συντονισμένη απάντηση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε πολλαπλά κυτταρικά ερεθίσματα, (γ) τη διατήρηση της ομοιότητας και την προστασία των κύτταρων και των ιστών από την παραγωγή δυνητικά επικίνδυνων πρωτεϊνών μέσα από τη δημιουργία «αδρανών αποθεμάτων» RNA και της περιορισμένης, χωροχρονικά, μετάφρασης τους. Δεν είναι τυχαίο ότι ο έντονος μετα-μεταγραφικός έλεγχος είναι ενεργός σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται ή απαντούν άμεσα σε περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα ενώ ασκείται κυρίως σε μόρια mRNA τα οποία κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες διαφοροποίησης, παράγοντες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και παράγοντες απάντησης σε σήματα στρες.





Εικόνα 1.1. Απλουστευμένη γραμμική αναπαράσταση ελέγχου μετα-μεταγραφικών διεργασιών

Ο κρίσιμος ρόλος των μεταμεταγραφικών ρυθμίσεων στις κυτταρικές αντιδράσεις γενικότερα, αλλά και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις ειδικότερα, αναδεικνύεται μέσα από πρόσφατες ολιστικές αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης. 50% του ποσού των πρωτεϊνών που παράγονται κατά το κυτταρικό στρες ή την ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων καθορίζεται στο στάδιο της μετάφρασης των mRNAs τους (Fan et al. 2002; Cheadle et al. 2005). Μία πρόσφατη και πιο εμπεριστατωμένη μελέτη (Hao and Baltimore 2009) απέδειξε ότι τα κύτταρα που αντιδρούν σε βακτηριακά ή φλεγμονώδη ερεθίσματα απαντούν με την ρύθμιση των περισσότερων mRNA τους στο στάδιο της **σταθεροποίησης** και σχετίζεται με την παρουσία μιας ιδιαίτερης κατηγορίας αλληλουχιών/cis-στοιχείων στα 3' μη μεταφραζόμενα άκρα τους τα οποία είναι πλούσια σε βάσεις Αδενίνης/Ουρακίλης (AU-rich elements, AREs). Η απώλεια μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των mRNA που περιέχουν ARE στοιχεία έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη πολλών φλεγμονωδών και νεοπλασματικών νοσημάτων όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, οι Φλεγμονώδεις Εντερίτιδες, ο Ερεθυματώδης Λύκος, η Σηπτική καταπληξία, ο

καρκίνος του παχέως εντέρου και του πνεύμονα (Dixon et al. 2001; Giles et al. 2003; Katsanou et al. 2006).

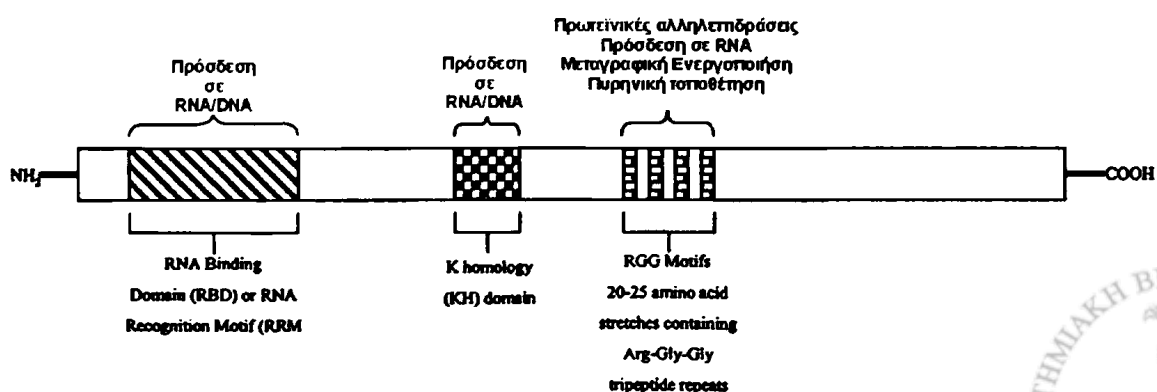
Στην πλειονότητα τους οι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί καθορίζονται από ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες οι οποίες έχουν την ικανότητα άμεσης πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RNA-binding proteins, RBPs) και δρουν σε σύμπλοκα είτε με πρόδρομο mRNA σε ετερογενή ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (σύμπλοκα hnRNP) ή μόνο με ώριμο mRNA σε αγγελιοφόρα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (σύμπλοκα mRNP) (Dreyfuss et al. 2002). Η ριβονουκλεοπρωτεϊνική σύσταση των RNPs ποικίλει ανάλογα με το ερέθισμα και τη χρήση ενώ τα σύμπλοκα περιλαμβάνουν και μικρομοριακά RNA. Τα στοιχεία ARE φαίνεται να απαντούν σε ένα πλήθος από ενδοκυττάρια μονοπάτια του στρες και αναγνωρίζονται από μία ειδική κατηγορία ριβονουκλεοπρωτεϊνών (ARE-binding proteins, AREBPs). Παρά την εκτεταμένη προϋπάρχουσα γνώση σχετικά με τις μοριακές ιδιότητες των AREBPs, η αποσαφήνισή του λειτουργικού τους ρόλου παραμένει ελλιπής.

Η παρούσα ερευνητική εργασία επικεντρώνεται στην ανάλυση του λειτουργικού ρόλου των AREBP HuR και AUF1, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η εφαρμογή μεθοδολογιών καθολικής και ιστοειδικής μετατροπής αυτών των ριβονουκλεοπρωτεϊνών, μας επέτρεψε να αποκαλύψουμε τον πλειοτροπικό τους ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδιακών δικτύων κατά την ανάπτυξη και τη λειτουργία των έμφυτων ανοσολογικών αποκρίσεων και της παθολογικής φλεγμονής. Στα παρακάτω κεφάλαια της Εισαγωγής αναφερόμαστε στην προϋπάρχουσα γνώση σχετικά με την μετα-μεταγραφική ρύθμιση από AREBP καθώς και στον ρόλο της γονιδιακής ρύθμισης στην ανάπτυξη και τη δράση της έμφυτης ανοσίας η οποία αποτέλεσε την αφετηρία των ερευνών μας.

1.1. Στοιχεία μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης

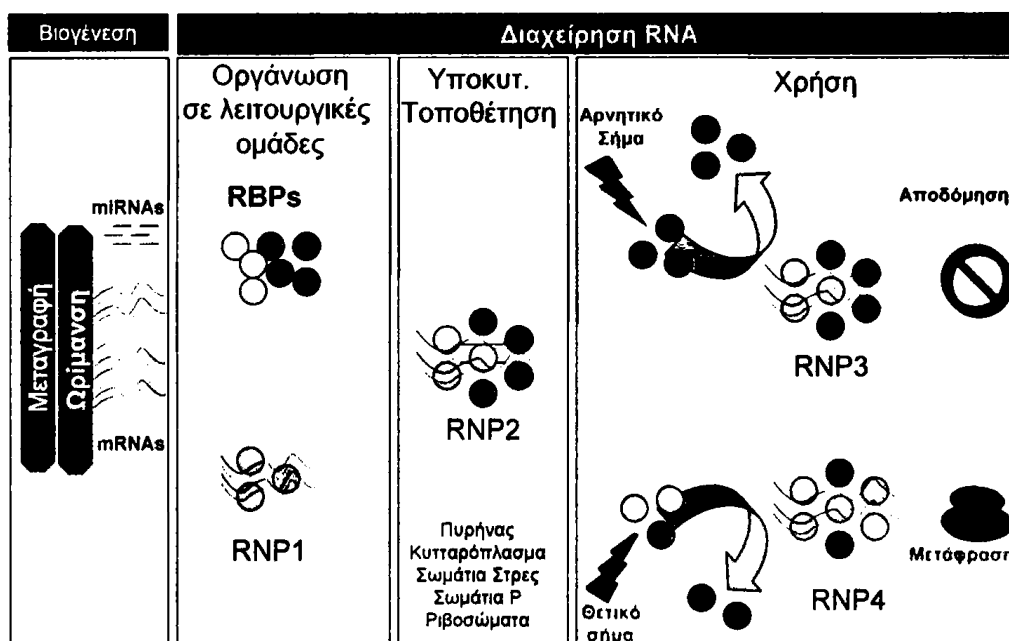
1.1.1. Ο ρόλος των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων στη διαχείριση του RNA

Από την αρχή της βιοσύνθεσης τους μέχρι και την τελική τους αποδόμηση, τα mRNAs μπορούν να συνδέονται με συγκεκριμένες RBPs σταθερά ή να υπόκεινται σε δυναμικές ανταλλαγές με άλλες μέσα σε συγκεκριμένα σύμπλοκα. Έχει υπολογιστεί ότι μόνο στο ζυμομύκητα περίπου 570 διαφορετικές RBPs προσδένονται σε μόρια RNA (Continuo et al., 2001). Οι RBPs προσδένουν μόρια RNA κυρίως μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μοτίβων αναγνώρισης (Εικόνα 1.2). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το πλέον συντηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA παίρνει το όνομα του από αυτή την ιδιότητα του (RNA recognition motif, RRM ή και RNA-binding domain, RBD), και απαντάται σε 500 περίπου διαφορετικές πρωτεΐνες (Maris et al. 2005). Δομικά τα RRM περιέχουν συνήθως δύο συντηρημένες αλληλουχίες (Ribonucleoprotein domain 1, RNP1: Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr-Gly/Ala-Phe/Tyr-Val/Ile/Leu-X-Phe/Tyr και της RNP2: Ile/Val/Leu-Phe/Tyr-Ile/Val/Leu-XAsn-Leu) οι οποίες βρίσκονται στο κέντρο πτυχωτών αλυσίδων β και επιτρέπουν την υψηλής συγγένειας πρόσδεση σε νουκλεϊκά οξέα. Άλλα συντηρημένα μοτίβα αναγνώρισης RNA αποτελούν το μοτίβο KH (επαναλήψεις Ile-Gly-X₂-Gly-X₂-Ile) και τα κουτιά RGG (Arg-Gly-Gly). Τέλος, ειδικά μοτίβα που απαντώνται μονάχα σε συγκεκριμένες οικογένειες είναι και οι δακτύλιοι ψευδαργύρου C₃H των τριστετραπρολινών (tristetraprolins) και το μοτίβο Pumilio των πρωτεϊνών PUF (Messias and Sattler 2004; Stefl et al. 2005).



Εικόνα 1.2. Γραμμική απεικόνιση των πλέον συντηρημένων μοτίβων αναγνώρισης RNA σε ριβονουκλεοπρωτεΐνες.

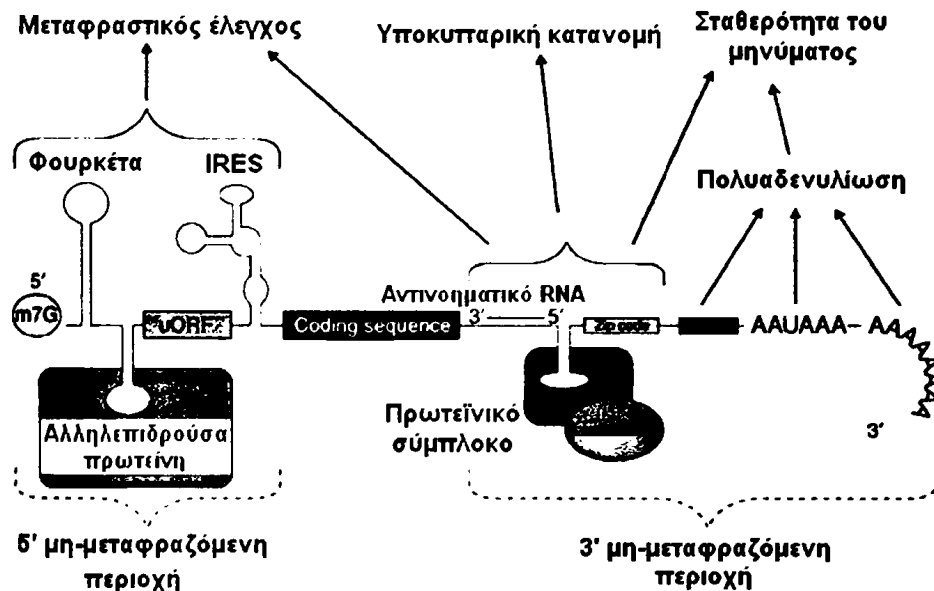
Το σύνολο και ο συνδυασμός των RBPs που συνοδεύουν ένα συγκεκριμένο mRNA, καθώς και η κατανομή τους πάνω στο RNA, καθορίζουν την περαιτέρω χρήση του στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.3). Η σύσταση των mRNPs επιτρέπει την αλληλεπίδραση των mRNAs με εξώ- και ενδο- κυτταρικά σήματα και αποσκοπεί: (α) στην ομαδοποίηση των mRNAs που σχετίζονται με συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες, (β) στη δημιουργία αδρανούς ή ενεργού αποθέματος RNA μέσω της υποκυτταρικής του τοποθέτησης σε συγκεκριμένες δομές και (γ) στην ενεργοποίηση της μετάφρασης ή της αποδόμησής τους.



Εικόνα 1.3. Λειτουργική διαχείριση μορίων RNA από τις RBPs στα Ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Σε αυτό το πλαίσιο κάποιες από τις RBPs δρουν ως ενεργοποιητές συγκεκριμένων μετα-μεταγραφικών διεργασιών, ενώ άλλες καταστέλλουν αυτές τις διεργασίες. Η ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών με διαφορετική δράση σε κάθε mRNA προσδίδει την ευέλικτη απάντηση στα πολυάριθμα μεταβαλλόμενα κυτταρικά ερεθίσματα. Κατά συνέπεια, η οποιαδήποτε μεταβολή στην έκφραση ή πρόσδεση των RBPs αλλάζει την κατανομή τους ως προς τα RNAs με τα οποία έχουν την ικανότητα να προσδεθούν μέσα στα RNPs (Keene and Tenenbaum 2002; Hieronymus and Silver 2004).

Σε μοριακό επίπεδο, η ικανότητα πρόσδεσης των RBPs και η εναλλαγή τους στα RNPs καθορίζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ριβονουκλεϊκών δομών ή αλληλουχιών που βρίσκονται στο σώμα των μορίων RNA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση μορίων mRNA που υπόκεινται σε έντονο μετα-μεταγραφικό έλεγχο με την παρουσία ειδικών ριβονουκλεϊκών στοιχείων που βρίσκονται στα μη μεταφραζόμενα άκρα τους και σε εγγύτητα με τα βασικά στοιχεία καθορισμού σταθερότητας και μεταφρασιμότητας (καλύπτρα, πολύ-A ουρά, IRES) (Εικόνα 1.4) (Ross 1995; Mignone et al. 2002). Συνήθως τα στοιχεία αυτά παρουσιάζονται ως δευτεροταγείς δομές δίκλωνου RNA ή «φουρκέτες» ενώ η δομή τους ενδέχεται να αλλάζει κατά την πρόσδεση των RBPs. Παραδείγματα τέτοιων *cis*-στοιχείων αποτελούν τα στοιχεία αντίδρασης σε σίδηρο (Iron responsive elements; IRE), οι αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα τρινουκλεοτίδια CUG αλλά και τα στοιχεία πλούσια σε βάσεις αδενίνης και ουρακίλης (AU-rich elements, ARE). Τα ARE αποτελούν τα πλέον πολυδύναμα και πολυμελετημένα στοιχεία mRNA και οι αλληλεπιδράσεις τους με τις RBPs που τα αναγνωρίζουν βρίσκεται στο επίκεντρο και των δικών μας μελετών.



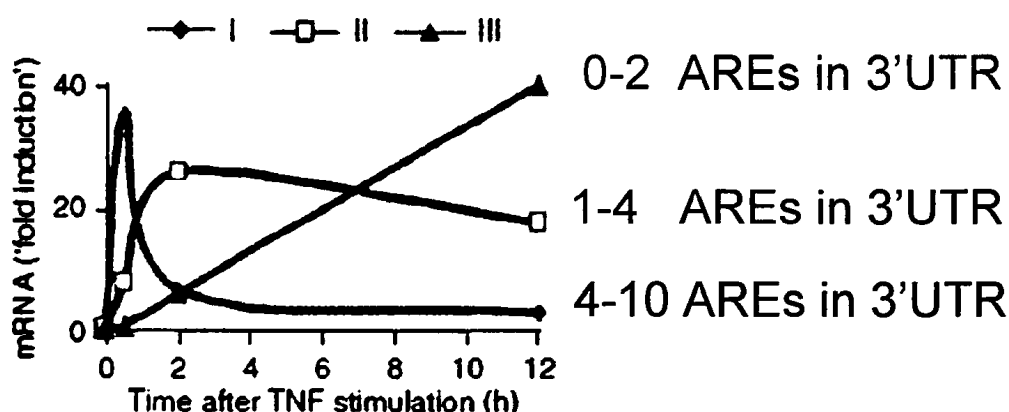
Εικόνα 1.4. Γενική δομή ενός ευκαρυωτικού mRNA. Τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στους μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς ρύθμισης και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση: m7G- μεθυλιωμένη καλύπτρα, uORF- ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ανοδικά της κωδικής αλληλουχίας, IRES- εσωτερικό σημείο εισόδου του ριβοσώματος, CPE- κυτταροπλασματικό στοιχείο πολυαδενυλίωσης, AAUAAA σήμα πολυαδενυλίωσης (από (Mignone et al. 2002)).

1.1.2. Τα στοιχεία ARE και η σχέση τους με την αποδόμηση μορίων mRNA

Η οικογένεια των στοιχείων ARE είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες οικογένειες *cis* ρυθμιστικών στοιχείων, κυρίως λόγω της σπουδαιότητας των πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από τα mRNAs που τα εμπεριέχουν. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα στοιχεία αυτά θεωρούνται δείκτες γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε κυτταρικές αντιδράσεις πολλαπλασιασμού, στρες και θανάτου και ως εκ τούτου παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους.

Η παρουσία των ARE στοιχείων ανιχνεύτηκε αρχικά σε mRNAs που κωδικοποιούν κυτταροκίνες (Caput et al. 1986). Ταυτόχρονα, οι Shaw και Kamen υπέδειξαν την πιθανή αποσταθεροποιητική δράση των ARE. Συγκεκριμένα, όταν εισήγαγαν μια AU αλληλουχία, μεγέθους 51 νουκλεοτιδίων, από το mRNA του GM-CSF του ανθρώπου στο 3'UTR του mRNA της β-σφαιρίνης, παρατήρησαν την αξιοσημείωτη αποσταθεροποίηση αυτού του mRNA (Shaw and Kamen 1986). Σήμερα, τα ARE στοιχεία αντιπροσωπεύουν μια πληθώρα αλληλουχιών, πλούσιων σε βάσεις αδεΐνης και ουρακίλης, μήκους 50-150 νουκλεοτιδίων, χωρίς όμως να ορίζονται από ένα μοναδικό και συντηρημένο πρότυπο μοτίβο (Chen et al. 1995). Αρκετά AREs περιέχουν πολυάριθμα αντίγραφα μιας πενταμερούς (AUUUA) ή επταμερούς (UAUUUAU) αλληλουχίας, μαζί με μία ή περισσότερες αλληλουχίες πλούσιες σε ουρακίλη αν και η ελάχιστη αποσταθεροποιητική αλληλουχία φαίνεται να είναι η επταμερής (Lagnado et al. 1994; Chen et al. 1995; Zubiaga et al. 1995). Παρά ταύτα, είναι πλέον σαφές ότι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών είναι ανάλογος με το ρυθμό της αποσταθεροποίησης των mRNA που τα περιέχουν. (Lagnado et al. 1994; Zubiaga et al. 1995). Για παράδειγμα, το mRNA του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) περιέχει ένα απομονωμένο μοτίβο AUUUA στο 3'UTR του (Kabnick and Housman 1988; Balmer et al. 2001) και παραμένει σταθερό ενώ το mRNA του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) περιέχει 4-6 αλληλεπικαλυπτόμενα ARE και είναι ιδιαίτερα ασταθές. Η συσχέτιση του αριθμού των ARE με την αποσταθεροποιητική τους δράση φαίνεται και στην φλεγμονώδη απάντηση. Η ολιστική ανάλυση της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης, σε κύτταρα που ερεθίζονται από προ-φλεγμονώδη σήματα (Hao and Baltimore 2009), έδειξε ότι η απάντηση ακολουθεί 3 κινητικές συσσωρεύσεις των mRNAs ως αποτέλεσμα του ρυθμού αποσταθεροποίησης τους και σε σχέση με τον αριθμό των στοιχείων ARE (από τα περισσότερα στα λιγότερα): I- γρήγορη σταθεροποίηση και

αποδόμηση, II- γρήγορη σταθεροποίηση και αργή αποδόμηση και III- αργή σταθεροποίηση και αργή αποδόμηση (Εικόνα 1.5). Αξιοσημείωτη είναι η ολιστική βιοπληροφορική ανάλυση των mRNAs που περιέχουν ARE για τη δημιουργία μίας συγκριτικής βάσης δεδομένων, της ARED (<http://rc.kfshrc.edu.sa/ared>). Σύμφωνα με τα στοιχεία της ARED, υπολογίζεται ότι περίπου 8% των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν λειτουργικά RNAs περιέχουν ARE (Bakheet et al. 2001) και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 διακριτές υποομάδες σε σχέση με την αλληλουχία της πρωτοταγής τους δομής και την αποσταθεροποιητική τους ικανότητα (Πίνακας 1.1).



Εικόνα 1.5. Κατηγορίες κινητικής της μετα-μεταγραφικής απάντησης για mRNA που εκφράζονται μετά από φλεγμονώδη ερεθισμό (από Hao & Baltimore, 2009)

Στην κατηγορία I ανήκουν τα ARE στοιχεία τα οποία ελέγχουν την κυτταροπλασματική αποαδενυλίωση των mRNAs αποικοδομώντας την πολύ(A) ουρά με μια σταθερή αναλογία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδιάμεσων mRNAs με πολύ(A) ουρές μήκους 30-60 νουκλεοτιδίων οι οποίες αποικοδομούνται τελείως στη συνέχεια. Η παρουσία ενός ή περισσότερων αντίγραφων του πεντανουκλεοτιδίου AUUUA δίπλα σε μια περιοχή πλούσια σε ουρακίλες είναι το δομικό χαρακτηριστικό των ARE στοιχείων της κατηγορίας αυτής. Τέτοια στοιχεία απαντώνται κυρίως σε mRNAs τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο *c-fos* και ο *c-myc* καθώς και στο mRNA ορισμένων κυτταροκινών όπως η IL-4 και η IL-6. Τα ARE στοιχεία της κατηγορίας II και των υποκατηγοριών IIA-IIIE χαρακτηρίζονται από την παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που περιέχουν τόσο το πενταμερές μοτίβο AUUUA όσο και μια περιοχή πλούσια σε αδερίνη και ουρακίλη, η οποία βρίσκεται συνήθως πριν από τα επαναλαμβανόμενα

πεντανουκλεοτίδια, και αποαδενυλιώνουν τα mRNAs με ασύγχρονο τρόπο. Αναλυτικότερα, ανάλογα με το μεταγράφημα, η πολύ(Α)ουρά αποικοδομείται σε διαφορετικό ποσοστό κάθε φορά και τελικά δημιουργούνται mRNAs χωρίς καθόλου πολύ(Α) ουρά.

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση των στοιχείων ARE		
Ομάδες	Αλληλουχία	Παραδείγματα
I	WAUUUAW και περιοχή με πολλά U	c-fos, c-myc
IIA	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF, TNF
IIB	AUUUAUUUAUUUAUUUA	IFN-α
IIC	WAUUUAUUUAUUUAUW	Cox-2, IL-2, VEGF
IID	WWAUUUUAUUUAUWW	FGF2
IIE	WWWWAUUUUAUWWWW	u-PA receptor
III	Περιοχή με πολλά U, χωρίς AUUUA	c-jun

Παραδείγματα mRNAs τα οποία περιέχουν ARE στοιχεία αυτής της κατηγορίας αποτελούν αυτά των TNF, GM-CSF, IL-2, INFα και COX2. Τέλος, τα mRNAs τα οποία περιέχουν ARE στοιχεία της κατηγορίας III, όπως αυτό που κωδικοποιεί το *c-jun*, δεν περιέχουν το πενταμερές μοτίβο AUUUA και χαρακτηρίζονται μονάχα από την παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε ουρακίλη. Ο τρόπος με τον οποίο αποαδενυλιώνουν και αποσταθεροποιούν το mRNA είναι παρόμοιος με αυτόν των ARE στοιχείων της κατηγορίας I. Παρόλο που η κατηγοριοποίηση των ARE mRNAs δεν γίνεται με βάση το βιολογικό τους ρόλο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το είδος των ARE σχετίζεται με την σημασία των αντίστοιχων mRNAs σε αιφνίδιες και παροδικές αποκρίσεις, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο τονισμός του καρδιαγγειακού συστήματος, οι ανοσολογικές αποκρίσεις και η απάντηση σε περιβαλλοντικό στρες. Για παράδειγμα, οι κυτταροκίνες που αποτελούν βασικούς διαμεσολαβητές της ανοσολογικής απάντησης κωδικοποιούνται κυρίως από mRNAs τα οποία περιέχουν ARE στοιχεία της κατηγορίας II, ενώ οι

μεταγραφικοί παράγοντες και οι πρωτεΐνες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου περιέχουν AREs της κατηγορίας I και μερικές φορές της κατηγορίας III.

Πέραν όμως της αποσταθεροποίησης μεταγράφων, τα ARE εμπλέκονται και σε ένα σύνολο μετα-μεταγραφικών διεργασιών όπως η ρύθμιση της μετάφρασης και της υποκυτταρικής τοποθέτησης. Αυτός ο ρόλος των ARE προκύπτει τόσο από τις δράσεις των RBPs που τα προσδένουν όσο και από λειτουργικές αναλύσεις όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

1.1.3. Ριβονουκλεοπρωτεΐνες που προσδένουν στοιχεία ARE

Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα ARE αποτελούν ένα ξεχωριστό υποσύνολο των RBPs (ARE-binding proteins; ARE-BPs). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον 17 ARE-BPs (Barreau et al. 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν ορισμένες ριβονουκλεοπρωτεΐνες με έντονη πυρηνική κατανομή (hnRNP A1, hnRNP C και hnRNPD ή AUF1), RBPs με ενζυμική δραστηριότητα (GAPDH και AUH), τα μέλη της ELAV-like οικογένειας (Hel-N1, HuC, HuD και HuR), τις τριστετραπρόλινες (TTP, BRF1, BRF2), την TIA-1 και την KSRP. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι πλέον μελετημένες AREBPs και τα πιθανά λειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Καθώς αποκαλύπτεται η λειτουργικότητα και η βιολογική σημασία των AREBPs, αναδεικνύονται ως θεμελιώδη ρυθμιστικά μόρια στους μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς ελέγχου και οργάνωσης της γονιδιακής έκφρασης (Shyu and Wilkinson 2000; Keene 2001). Οι AREBPs εμπλέκονται σε όλα σχεδόν τα στάδια του κύκλου ζωής των μορίων RNA που φέρουν ARE και αρκετές από αυτές ρυθμίζονται από τα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σημάτων. Η ποικιλότητα των ARE αντικατοπτρίζει και τις πολυπαραγοντικές αλληλεπιδράσεις τους με περισσότερες από μία AREBPs και αντίστροφα, πολλές από τις AREBPs έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε πολλαπλά mRNAs χωρίς αυτά να περιέχουν ARE στοιχεία της ίδιας κατηγορίας. Αυτό φαίνεται και από την ποικιλότητα των δομικών χαρακτηριστικών των AREBPs οι οποίες μπορεί να περιέχουν: (α) μοτίβα RRM (RNA Recognition Motif); όπως οι πρωτεΐνες TIA-1, TIAR, CUGBP2, HuR και AUF1, (β) δακτυλίους ψευδαργύρου (C3H zing-finger) όπως οι TTP, BRF1 και BRF2, και (γ) περιοχές KH όπως η πρωτεΐνη KSRP (Varani and Nagai 1998; Wilusz et al. 2001; Dreyfuss et al. 2002).



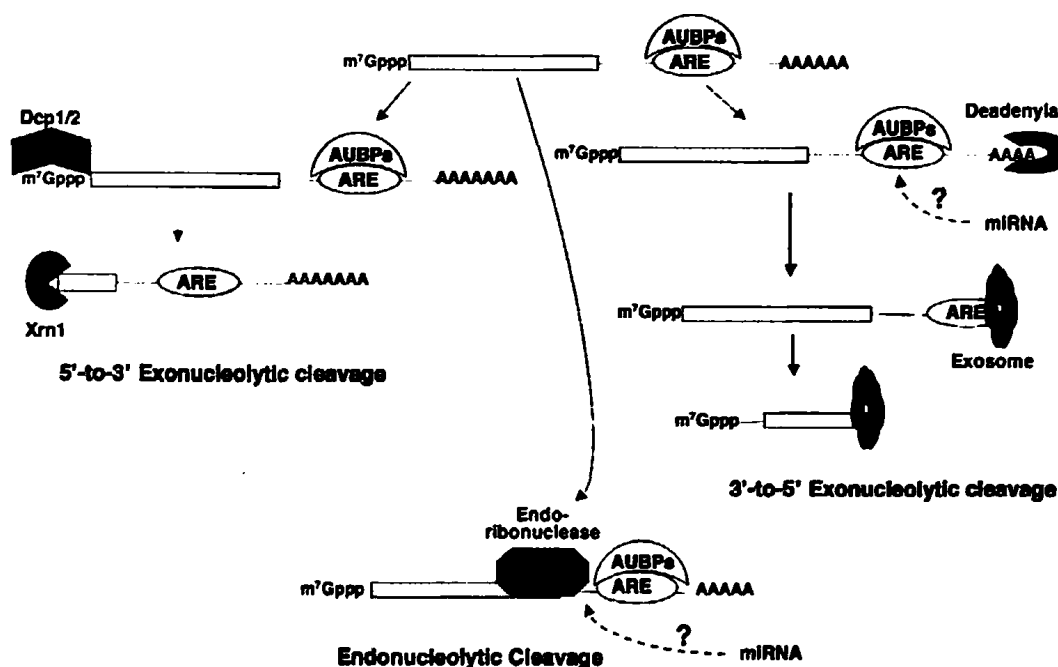
Πίνακας 1.2. Παραδείγματα AREBP και των πιθανών δράσεων τους

Πρωτεΐνη	Κατανομή	Πιθανή επίδραση στη βιοσύνθεση του mRNA	Αναφορές
AUF1/hnRNP D 4 ισομορφές	p15, p42 πυρήνας p37, p40 κυτταρόπλασμα	Αποσταθεροποίηση	(Laroia et al. 1999; Wilson and Brewer 1999; Ming et al. 2001; Wilson et al. 2001)
HuR/HuA	Πυρήνας/Κυτταρόπλασμα	Ρύθμιση σταθερότητας, μετάφρασης	(Brennan and Steitz 2001; Kullmann et al. 2002; Mazan-Mamczarz et al. 2003)
HuB, HuC, HuD	Κυτταρόπλασμα	Σταθεροποίηση	(Brennan and Steitz 2001)
TTP	Πυρήνας/Κυτταρόπλασμα	Αποσταθεροποίηση	(Taylor et al. 1996; Carballo and Blackshear 2001; Mahtani et al. 2001)
KSRP	Πυρήνας/Κυτταρόπλασμα	Αποσταθεροποίηση	(Chen et al. 2001)
TIA-1/TIAR	Πυρήνας/Κυτταρόπλασμα	Μεταφραστική καταστολή	(Kedersha et al. 2000; Piecyk et al. 2000)
AUH	Κυτταρόπλασμα	Ενζυματική δράση	(Nakagawa et al. 1995)
hnRNPA1	Πυρήνας	Αποσταθεροποίηση	(Hamilton et al. 1993)
hnRNPC	Πυρήνας	Αποσταθεροποίηση	(Hamilton et al. 1993)
GAPDH	Πυρήνας/Κυτταρόπλασμα	Ενζυματική δράση	(Nagy and Rigby 1995)
AUBF	Κυτταρόπλασμα		(Malter and Hong 1991)
AU-A, AU-B, AU-C	AU-A Πυρήνας, AU-B, AU-C Κυτταρόπλασμα	Αποσταθεροποίηση	(Bohjanen et al. 1991; Bohjanen et al. 1992)

Ο ρόλος των AREBPs στην χρήση των mRNAs που περιέχουν ARE δεν είναι σαφής. Παρά ταύτα, πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν τις πολλαπλές αλληλεπιδράσεις τους με μηχανισμούς επιλεκτικής αποικοδόμησης και μεταφραστικής ρύθμισης.

1.1.4. Σύζευξη των μηχανισμών ρύθμισης των ARE με κεντρικούς μηχανισμούς αποδόμησης και μεταφραστικής καταστολής

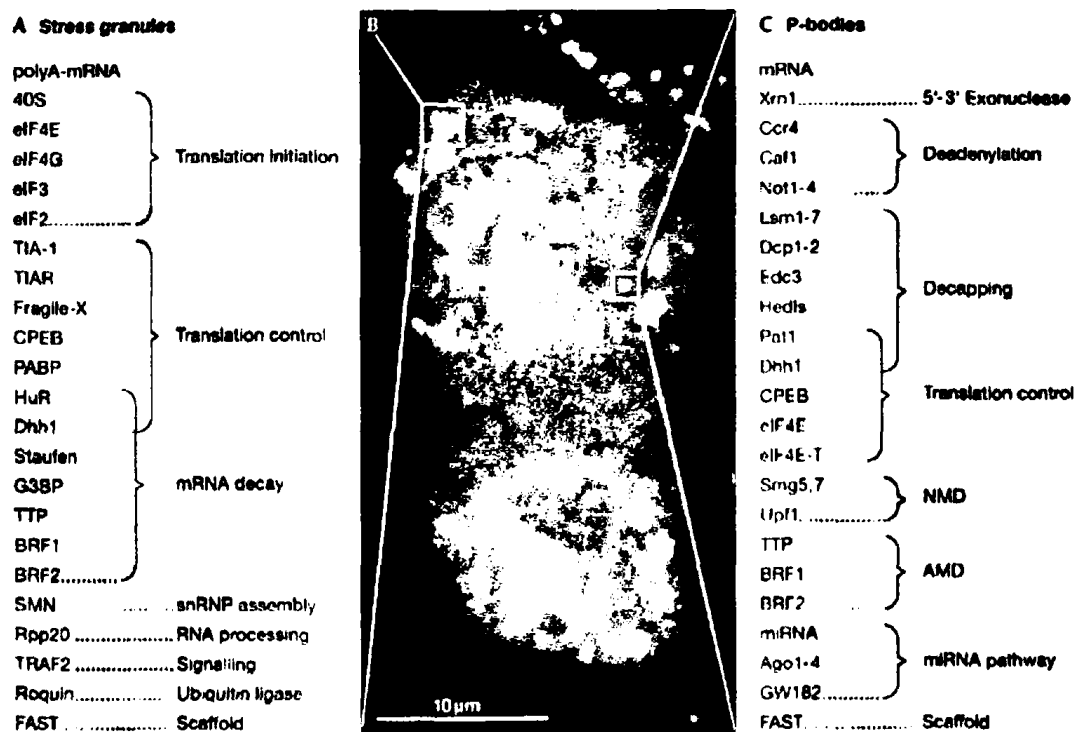
Πρόσφατες μελέτες σε φλεγμονώδη mRNA αποκάλυψαν ότι οι AREBPs καθορίζουν τη χρήση των mRNA με ARE μέσα από τη συνεργία τους με υποκυτταρικές δομές και σύμπλοκα ρύθμισης αποδόμησης και μετάφρασης. Αναφορικά με την αποδόμηση, η διαφορική αποαδενυλίωση των mRNA με ARE σχετίζεται με την καθοδήγηση τους σε δύο κυτταρικές οντότητες με εξωνουκλεολυτική δράση: το εξώσωμα (exosome) και τα σωμάτια P (Processing bodies) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Μοντέλο AMD (Αποικοδόμηση μέσω ARE). Βασιζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, έχουν προταθεί τρία κύρια μονοπάτια με τα οποία εκτελείται η AMD αποικοδόμηση. Στο πρώτο μονοπάτι, οι AU προσδενόμενες πρωτεΐνες που προωθούν την αποικοδόμηση (όπως η TTP) μπορεί να προσδένονται στα ARE του mRNA βοηθώντας την στρατολόγηση ενζύμων απομάκρυνσης της καλύπτρας, όπως οι Dcp1/2. Μετά την απομάκρυνση της 5' καλύπτρας, η 5' προς 3' εξωριβονουκλεάση Xrn1 αποικοδομεί το mRNA. Στο δεύτερο, μονοπάτι οι AU προσδενόμενες πρωτεΐνες μπορούν να στρατολογήσουν ενδοριβονουκλεάσες οι οποίες αποικοδομούν εσωτερικά το mRNA στόχο. Στο τρίτο μονοπάτι, οι AU προσδενόμενες πρωτεΐνες μπορούν να στρατολογήσουν αποαδενυλάσες (όπως η PARN ή η CCR4) με στόχο την απομάκρυνση της πολύ-A ουράς από το 3' τελικό άκρο του mRNA, και η 3' προς 5' αποικοδόμηση μπορεί να συμβεί μέσω εξωσώματος. Τα miRNP σύμπλοκα μπορούν επίσης να εμπλέκονται στην στρατολόγηση του μηχανισμού αυτού. Οι σταθεροποιητικές AU προσδενόμενες πρωτεΐνες, όπως η HuR, μπορούν να εμπλέκονται σε ένα ή περισσότερα μονοπάτια μέσω ανταγωνισμού της πρόσδεσης των αποσταθεροποιητικών πρωτεϊνών ή μέσω αναστολής της αλληλεπίδρασης miRNA και mRNA (von Roretz and Gallouzi 2008).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το εξώσωμα αποτελεί ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Το σύμπλοκο του εξωσώματος περιλαμβάνει έναν δακτύλιο από 6 ριβονουκλεάσες οι

οποίες αλληλεπιδρούν με RBPs, συμπεριλαμβανομένων και AREBPs, όπως η TTP, ο AUF1 και η KSRP. Συνολικά το εξώσωμα δρά ως εξωνουκλεάση με 3'-5' αποικοδομητική ικανότητα στα mRNAs (Butler 2002). Από την άλλη, τα σωμάτια P περιέχουν παράγοντες απομάκρυνσης της καλύπτρας (Dcp1, Dcp2) και εξωνουκλεάσες με δράση 5'-3', όπως η Xrn1, οδηγώντας τελικά σε 5'-3' αποικοδόμηση του mRNA (Kedersha et al. 2005). Σε αυτήν την περίπτωση η αποικοδόμηση μπορεί να περιλαμβάνει και μικρομοριακά RNA (miRNA) μιας και τα σωμάτια P περιλαμβάνουν το σύμπλοκο RISC (RNA Induced Silencing Complex) (Pressman et al. 2007). Η παρουσία διαφόρων AREBP (Εικόνα 1.7), όπως οι TTP και HuR, σε σωμάτια P και οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις τους με τον Αργοναύτη 2 ενισχύουν την πεποίθηση αλληλεπίδρασης μικρομοριακών RNA με τους μηχανισμούς των ARE ως εναλλακτικό τρόπο αποικοδόμησης έναντι του εξωσώματος (Vasudevan and Steitz 2007).



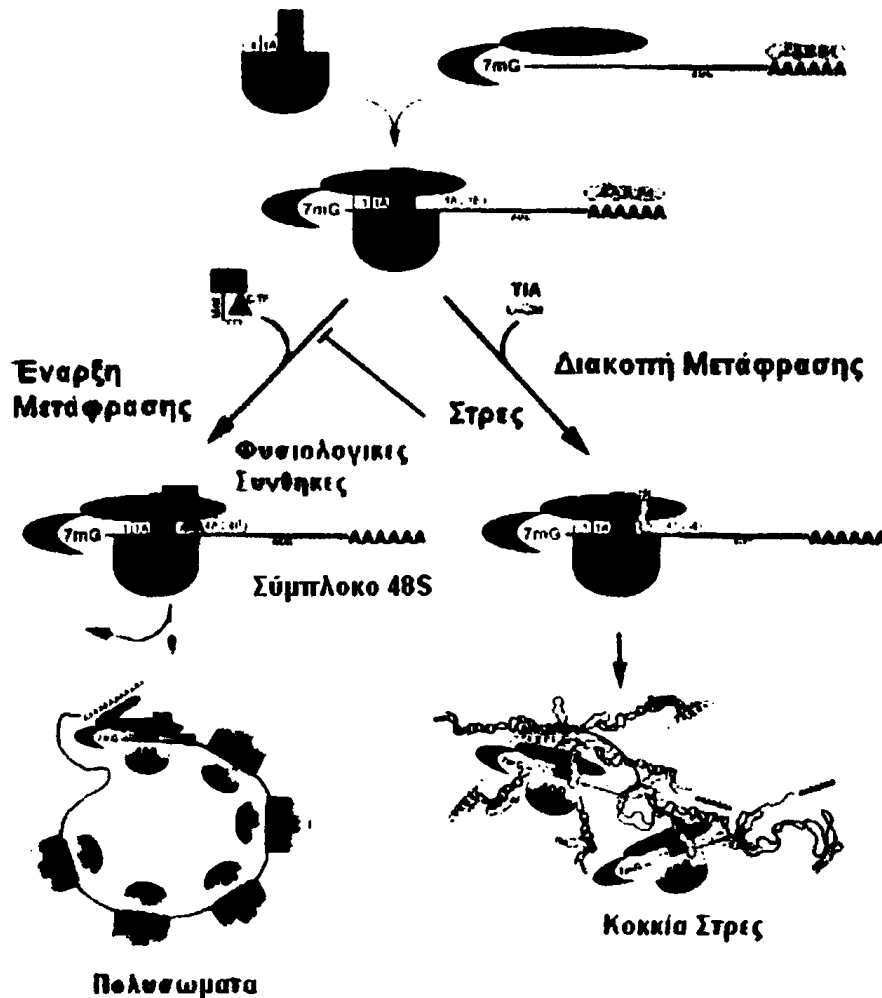
Εικόνα 1.7. Συγκριτική σύσταση των κοκκίων στρες και των σωμάτων P συμπεριλαμβανομένων και των AREBP TIA1, TIA-R, TTP, BRF1, BRF2 και HuR (Newbury et al. 2006)

Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι ορισμένα mRNA με ARE μπορούν να αποικοδομηθούν και ενδονουκλεολυτικά αλλά το εύρος αυτής της δράσης παραμένει να διευκρινιστεί.

Ένα βασικό ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι το πώς οι μηχανισμοί αποικοδόμησης των mRNA με ARE σχετίζονται με τους μηχανισμούς μετάφρασης. Όπως προκύπτει από άλλες μελέτες φαίνεται ότι η αποικοδόμηση έπεται μιας διεργασίας μεταφραστικής καταστολής η οποία μπορεί να τελείται σε άλλες υποκυτταρικές τοποθεσίες όπως τα κοκκία του στρες (Stress Granules, SG). Τα SG δεν περιέχουν ριβονουκλεολυτικά ένζυμα ούτε ένζυμα για την απομάκρυνση της καλύπτρας ή εξωνουκλεάσες, αλλά περιέχουν eIF2/eIF5 πρόδρομα σύμπλοκα έναρξης της μετάφρασης τα οποία είναι μεταφραστικά ανενεργά μαζί με ARE-BPs (Εικόνα 1.7) με κεντρικότερες τις TIA1 και TIAR της οποίας ο ενδεχόμενος ρόλος στην μορφοποίηση αυτών των συμπλόκων (Kedersha and Anderson 2002) περιγράφεται στην Εικόνα 1.8.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι ARE-BPs δρουν ως οργανωτές και καθοδηγητές των mRNAs σε συγκεκριμένα μονοπάτια για να καθορίζουν την χρήση τους ή την αποικοδόμηση τους με βάση την σηματοδότηση. Ως εκ τούτου, η αποικοδόμηση και η καταστολή της μετάφρασης είναι δύο βήματα στο ίδιο μονοπάτι, όπου πρώτα το mRNA διαχωρίζεται από την μεταφραστική μηχανή και στην συνέχεια μεταπίπτει σε ένα μονοπάτι αποικοδόμησης. Η μεταφορά των mRNAs πρώτα στα SG και μετά στα σωμάτια P περιγράφει την κατάσταση αυτή. Εάν ο έλεγχος χαθεί μεταξύ των δύο αυτών βημάτων, τότε κάποια mRNAs θα μπορούσαν να αποσιωπηθούν μεταφραστικά και να μην αποικοδομηθούν. Αντίθετα το μοντέλο αυτό μπορεί να εξηγήσει και το πώς μια ARE-BP μπορεί να ενισχύσει την πρωτεϊνοσύνθεση: αν η πρόσδεση μίας ARE-BP σταθεροποιεί το mRNA στόχο της και επιτρέπει την απομάκρυνση της από σωμάτια μεταφραστικής καταστολής, τότε θα επέλθει σύσταση των ριβοσωμικών μονάδων και των πολυριβοσωμάτων για την έναρξη της μετάφρασης (Barreau et al. 2005). Τα παραπάνω ίσως εξηγούν τόσο την ποικιλότητα των ARE-BPs και την ικανότητα τους να προσδένουν τα πολυάριθμα mRNAs που περιέχουν ARE. Το βασικό ερώτημα που προκύπτει είναι πως οι αλληλεπιδράσεις αυτές οργανώνονται και δρουν στο πλαίσιο μιας σύνθετης κυτταρικής αντίδρασης. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα προϋποθέτει την αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου των ARE-BPs, την ταυτοποίηση των ερεθισμάτων που συγκλίνουν στις δράσεις τους και την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων με τους στόχους τους. Ο στόχος της δικής μας μελέτης αφορά την αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου των ARE-BP, HuR και AUF1 στο πλαίσιο των

σύνθετων αντιδράσεων της έμφυτης ανοσίας. Το επόμενο κεφάλαιο αναφέρεται στην προϋπάρχουσα γνώση σχετικά με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των ARE-BPs.



Εικόνα 1.8. Μοντέλο μεταφραστικής ενεργοποίησης/καταστολής κατά την απουσία ή παρουσία στρες στο κύτταρο. Απουσία συνθηκών οι οποίες προκαλούν στρες στο κύτταρο, το τριμερές σύμπλοκο eIF2-GTP-tRNA^{Met} (πράσινο) δημιουργεί το σύμπλοκο 48 S στο 5' άκρο των mRNAs (πράσινο βέλος) και μόλις αναγνωριστεί το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης από το tRNA^{Met}, ο eIF5 επάγει την υδρόλυση του GTP και οι αρχικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης απομακρύνονται από την 60 S ριβοσωμική υπομονάδα. Στη συνέχεια όλο και περισσότερα ριβοσώματα προσθέτονται στο μεταγράφημα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυσωμάτων. Όταν επικρατούν συνθήκες οι οποίες προκαλούν στρες στο κύτταρο, ο eIF2α φωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα του συμπλόκου eIF2-GTP-tRNA^{Met}, και να αυξάνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης TIA-1 (κίτρινο) στο κυτταρόπλασμα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η TIA-1 συμμετέχει σε ένα μη φυσιολογικό eIF2/eIF5 πρόδρομο σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης το οποίο είναι μεταφραστικά ανενεργό. Η συνάθροιση των μορίων της TIA-1 επάγει τη συσσώρευση των συμπλόκων αυτών σε διακριτά κυτταροπλασματικά κοκκία τα οποία ονομάζονται «κοκκία στρες» (SGs) και περιλαμβάνουν όλα τα συστατικά του πρόδρομου συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης εκτός από τους eIF2 και eIF5 (από Kedersha and Anderson, 2002).

1.2. Οι ARE-BPs Elavl1/HuR και hnRNPd/AUF1

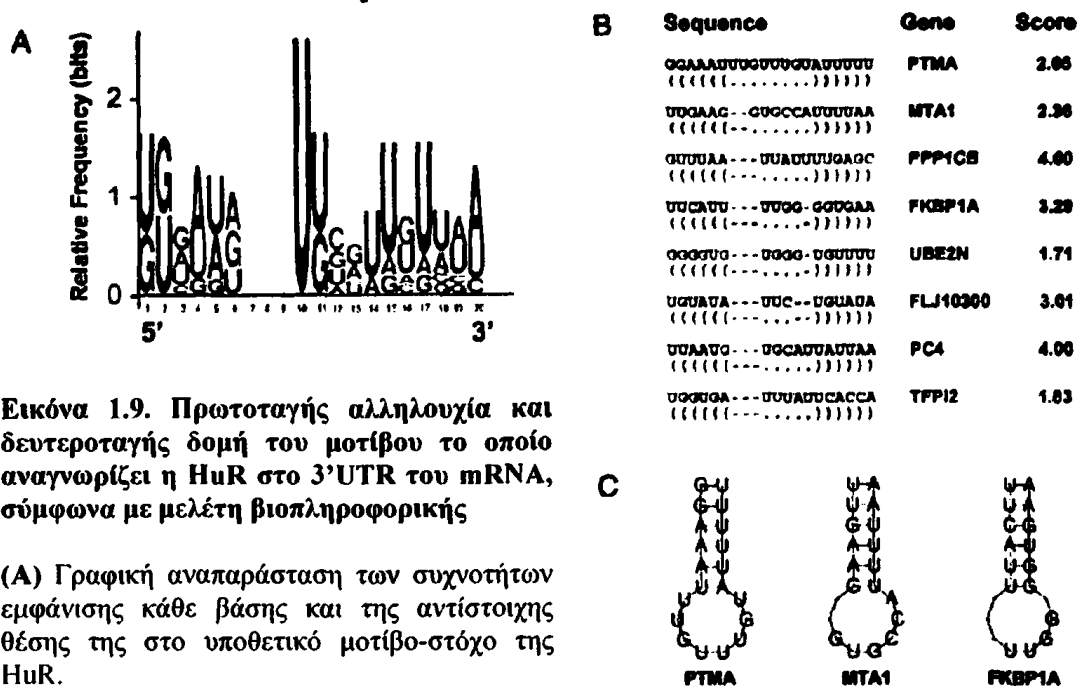
1.2.1. Η πρωτεΐνη Elavl1/HuR

Οι RBPs της οικογένειας Embryonic-Lethal-Abnormal-Vision -like (Elavl)/Hu παίρνουν το όνομα τους τόσο από τον φαινότυπο μεταλλάγών αποσιώπησης της ορθολόγου πρωτεΐνης της *Drosophila melanogaster*, **elav** όσο και από την ταυτοποίηση τους ως αυτοαντιγόνα (Human Antigens, **Hu Antigens**) σε ορούς ασθενών με παρανεοπλαστική εγκεφαλομυελίτιδα. Στα θηλαστικά, η οικογένεια περιλαμβάνει τέσσερα ομόλογα μέλη: την Elavl1/HuA/HuR, η οποία παρουσιάζει καθολικό πρότυπο έκφρασης και τις νευρωνικές πρωτεΐνες Elavl2/HuB/Hel-N1, Elavl3/HuC/PLE21 και Elavl4/HuD. Όλα τα μέλη της οικογενείας περιέχουν τρία RRM και τη συνδετική περιοχή μεταξύ των RRM2 και RRM3 (Szabo et al. 1991; Levine et al. 1993). Όλες οι προαναφερόμενες κυτταροπλασματικές δράσεις των Elav/Hu σχετίζονται με την σταθεροποίηση μηνυμάτων και ως εκ τούτου διαφοροποιούνται από τις δράσεις των υπόλοιπων AREBPs.

Η καθολικότητα της έκφρασης της HuR την καθιστά το πρότυπο μέλος της οικογενείας της. Στα σπονδυλωτά η πρωτεΐνη HuR απαντάται με υψηλό βαθμό συντήρησης, η οποία μεταξύ ανθρώπου και ποντικού είναι 99.7% (Good 1995). Η κύριες δράσεις της HuR, ως προς τα ARE στοιχεία, φαίνεται να επιτελείται μέσω των δύο πρώτων RRM (Fan and Steitz 1998). Το 3^ο RRM είχε αρχικά υποτεθεί ότι αλληλεπιδρά είτε με την πολύ(A) ουρά για να την προστατεύει από την αποαδενυλίωση ή ότι χρειάζεται για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Μια πρόσφατη μελέτη όμως έδειξε ότι το RRM3 μπορεί να έχει ενζυματική δράση αδενοσυλικής τρανσφεράσης για την πυρηνική προσθήκη της πολύ(A) ουράς. Το γεγονός αυτό εμπλέκει τη HuR τόσο στους μηχανισμούς χρήσης όσο και στους μηχανισμούς ωρίμανσης των mRNA με ARE.

Η αλληλουχία πρόσδεσης της HuR σε mRNA έχει πλέον αποσαφηνιστεί (Lopez de Silanes et al. 2005) (Εικόνα 1.9). Η αλληλουχία αυτή έχει μέγεθος 17-20 βάσεις πλούσιες κυρίως σε ουρακίλη και όχι σε αδερίνη και ουρακίλη, όπως παραδοσιακά ορίζονται τα ARE. Αντίθετα, η παρουσία της πενταμερούς αλληλουχίας AUUUA δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη δέσμευση της HuR στο mRNA.



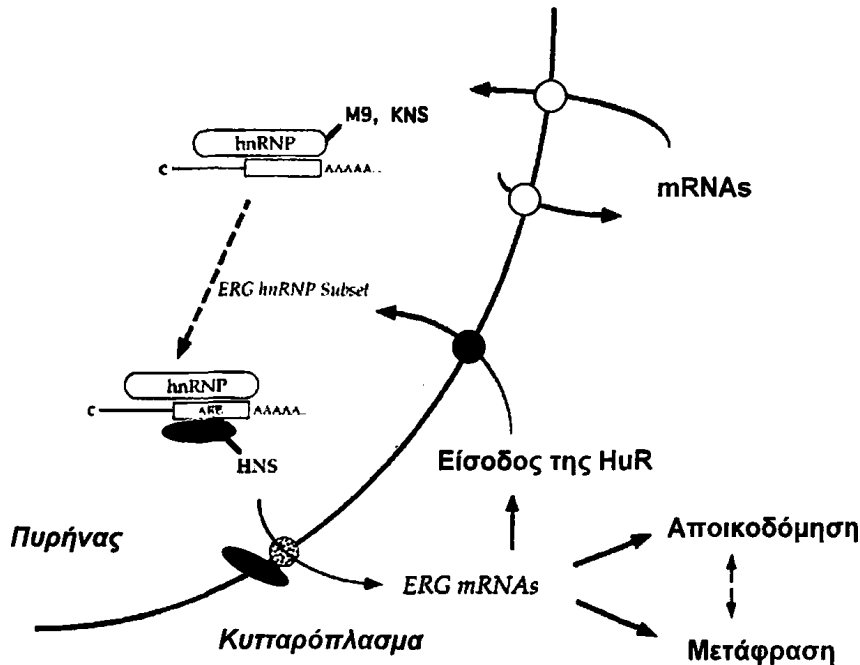


Εικόνα 1.9. Πρωτοταγής αλληλουχία και δευτεροταγής δομή του μοτίβου το οποίο αναγνωρίζει η HuR στο 3'UTR του mRNA, σύμφωνα με μελέτη βιοπληροφορικής

(Α) Γραφική αναπαράσταση των συχνοτήτων εμφάνισης κάθε βάσης και της αντίστοιχης θέσης της στο υποθετικό μοτίβο-στόχο της HuR.

(B) Συγκριτική αντιστοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των υποθετικών μοτίβων αναγνώρισης της HuR σε οхώ mRNAs στα οποία προσδένεται. **(C)** Δευτεροταγής δομή τριών υποθετικών μοτίβων (από Silanes et al., 2004).

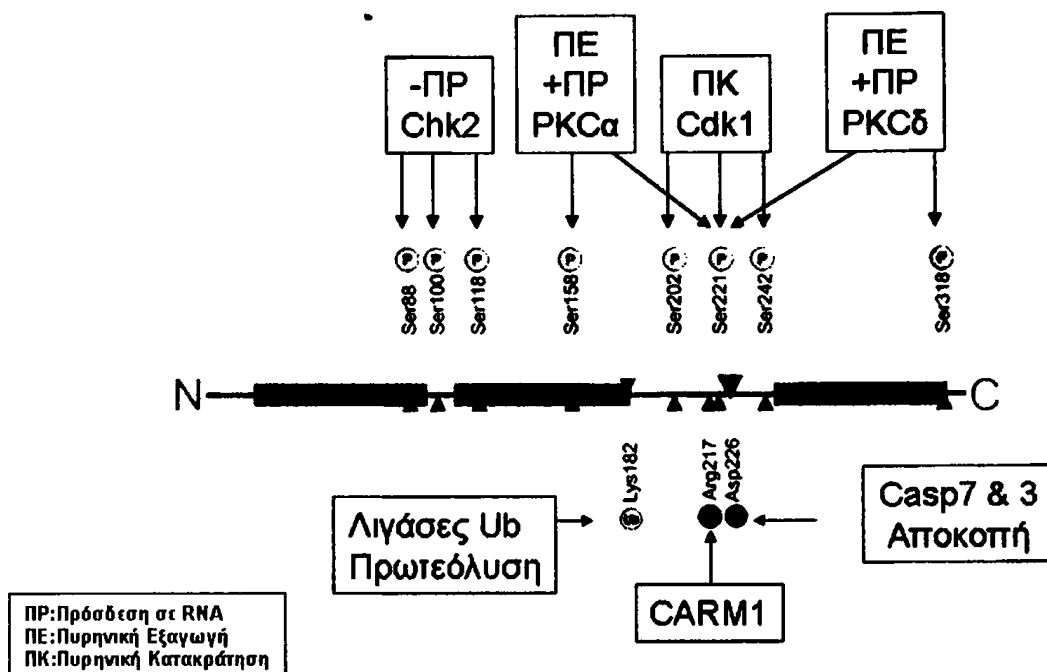
Υποκυτταρικά, η HuR εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, αλλά έχει την ικανότητα να μετατοπίζεται και προς το κυτταρόπλασμα. Η πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά της HuR επιτυγχάνεται μέσω μιας αλληλουχίας, η οποία βρίσκεται στη συνδετική περιοχή μεταξύ των RRM2 και RRM3. Η αλληλουχία αυτή, η οποία απαντάται αποκλειστικά στη HuR, ονομάζεται HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence) (Fan and Steitz 1998) και καθορίζει: (α) την εξαγωγή της HuR από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, βάση των αλληλεπιδράσεων της με τους προσαγωγούς μεταφοράς pp32 και APRIL ή απευθείας μέσω του πυρηνικού υποδοχέα CRM1, και (β) την εισαγωγή της HuR στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα βάση των αλληλεπιδράσεων της με τις transportins 1/2. Θεωρείται ότι η HuR προσδένεται στα mRNAs στον πυρήνα και τα μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα. Εκεί είτε βρίσκουν πρόσβαση στο μεταφραστικό μηχανισμό είτε οδηγούνται σε γρήγορη αποικοδόμηση (Εικόνα 1.10) (Gao and Keene 1996; Antic and Keene 1998)



Εικόνα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς μορίων mRNAs από τη HuR. Η πρωτεΐνη HuR προσδένει mRNAs άμεσης απάντησης (ERG) που κωδικοποιούν πρωτοογκογονίδια και κυτταροκίνες μέσω της ειδικής αλληλουχίας HNS. Στη συνέχεια μεταφέρει τα mRNAs στο κυτταρόπλασμα, όπου και απελευθερώνονται προκειμένου να οδηγηθούν προς μετάφραση ή αποικοδόμηση, ενώ η ίδια είτε επιστρέφει στον πυρήνα είτε αποικοδομείται. Η δυναμική ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών σημάτων εντοπισμού είναι αυτή που τελικά καθορίζει την υποκυτταρική κατανομή της HuR και κατ' επέκταση τα επίπεδα των ERG mRNAs που οδηγούνται προς μετάφραση.

1.2.2. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης HuR

Ο καθορισμός και η ταυτοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν την δράση της HuR αποτελούσε πάντα ένα κομβικό σημείο σύζευξης της δράσης της με εξωγενή ερεθίσματα. Δυστυχώς και για πολλά χρόνια, η ανίχνευση τέτοιων τροποποιήσεων δεν κατέσται δυνατή, προφανώς λόγω των γρήγορων αλληλεπιδράσεων της. Παρά ταύτα, τα τελευταία δύο χρόνια ανακαλύφθηκαν διάφορες πυρηνικές τροποποιήσεις της HuR, που συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.11** και αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 1.11. Σύνοψη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της HuR και των ενδεχόμενων αποτελεσμάτων τους.

Μεθυλίωση

Η πρώτη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ανιχνεύθηκε στη HuR ήταν η μεθυλίωση στην Αργινίνη θέσης 217, η οποία εδρεύει στο HNS ανάμεσα στα RRM2 και RRM3. Η μεθυλίωση αυτή φαίνεται να προστίθεται από την μεθυλοτρανσφεράση CARM1 (coactivator associated arginine methyltransferase και ανιχνεύθηκε κυρίως μετά από τον ερεθισμό μακροφάγων κυττάρων με βακτηριακά αντιγόνα (Li et al. 2002). Η μεθυλίωση δεν αλλάζει το θετικό φορτίο των κατάλοιπων αργινίνης, αλλά μπορεί να αυξάνει την υδροφοβικότητα της HuR επηρεάζοντας έτσι τις πρωτεϊνικές της αλληλεπιδράσεις. Καθώς το βασικό σημείο μεθυλίωσης βρίσκεται στην HNS περιοχή, η αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής αυτής και των προσδετών της μπορεί να επηρεάσει θετικά την κυτταροπλασματική κατανομή της HuR (Gallouzi et al. 2001). Επιπρόσθετα, η μετατροπή αυτή ενδέχεται να ενισχύει την πρόσδεση της HuR στα mRNAs κατά την μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα για να τα προστατεύει από την αποσταθεροποιητική πρόσδεση άλλων ανταγωνιστικών AREBPs, όπως η TTP (Dean et al. 2001). Παρά ταύτα, ο λειτουργικός ρόλος αυτής της μεθυλίωσης σε κυτταρικό επίπεδο παραμένει αδιευκρίνιστος.

Φωσφορυλίωση από την κινάση Chk2

Η Chk2 είναι μια κινάση σερίνης θρεονίνης με σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η δράση της εντοπίζεται στην αναστολή της αντιγραφής του DNA κατά την φάση παύσης του κύκλου στο σημείο ελέγχου S/G2 και φωσφορυλιώνει κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται σε αυτή τη διεργασία όπως τους ογκορρυθμιστικούς παράγοντες BRCA1, E2F1 και p53. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες η Chk2 μπορεί να φωσφορυλιώσει τη HuR στις σερίνες 88, 100 και τη θρεονίνη 118, οι οποίες βρίσκονται σε μοτίβα RRM (Abdelmohsen et al. 2007). Το πλέον σημαντικό είναι ότι αυτές οι φωσφορυλίώσεις επηρεάζουν την πρόσδεση της HuR στο mRNA του ενζύμου αποακετυλίωσης SIRT1 το οποίο και αποδομείται. Ο ρόλος του SIRT1 στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στο στρες και τη γήρανση αναδεικνύει τον ρόλο των φωσφορυλίσεων της HuR στις διαδικασίες κυτταρικής επιβίωσης.

Φωσφορυλίωση από τις κινάσες PKC.

Οι κινάσες PKC είναι μια ομάδα κινασών σερίνης/θρεονίνης με σημαντικό ρόλο στη μετάδοση διάφορων μεταβολικών σημάτων. Η PKCα ενεργοποιείται από το ATP και η PKCδ ενεργοποιείται από την αγγειοτενσίνη II, και φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη HuR. Η αλλαγή στα επίπεδα φωσφορυλίωσης καθορίζει την πρόσδεση και την πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά της HuR και των mRNAs στα οποία έχει προσδεθεί (Doller et al. 2007). Η φωσφορυλίωση της HuR από την PKCα στις σερίνες 158, 221 και από την PKCδ στις σερίνες 221, 318 οδηγεί στην αυξημένη πρόσδεση της στο mRNA της COX-2 και κατά συνέπεια την εξαγωγή του από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από αυξημένη μεταφραστικότητα λόγω αυξημένης παρουσίας του mRNA της COX-2 σε πολυσωμικούς ριβοσωμικούς σχηματισμούς κατά την διαδικασία της μετάφρασης (Doller et al. 2007) (Doller et al. 2008)

Φωσφορυλίωση από την κινάση cdk1.

Η κινάση cdk1 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης απαραίτητη για την μετάβαση από την φάση G2 του κυτταρικού κύκλου στην φάση M. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την HuR στο κατάλοιπο σερίνης 202, οδηγώντας την σε αυξημένη πρόσδεση με την πρωτεΐνη 14-3-3θ. Η πρόσδεση αυτή κατακρατά και αποτρέπει την έξοδο της HuR από τον πυρήνα (Abdelmohsen et al. 2008). Συνεπώς, η

φωσφορυλίωση αυτή έχει αρνητικό αντίκτυπο στον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της HuR και θεωρείται σήμα αναστολής της δράσης της HuR σε αποπτωτικές διαδικασίες.

Κυτταροπλασματική αποκοπή μέσω κασπασών 3 και 7.

Κάτω από συνθήκες τοξικού στρες η HuR μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με έναν μηχανισμό ο οποίος εμπλέκει τον ενεργοποιητή του αποπτώσωματος pp32/PHAP-I (Gallouzi et al. 2001). Το αποπτώσωμα περιλαμβάνει ένα μόριο στήριξης (Araf-1), το οποίο μέσω της επερχόμενης ενεργοποίησης από το κυτόχρωμα c, οδηγεί στην ενεργοποίηση της προ-κασπάσης 9. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την τελική ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 7 οι οποίες επάγουν των πρωτεϊνικό καταβολισμό και την απόπτωση (Zou et al. 1997). Πρόσφατη μελέτη (Mazroui et al. 2008), έδειξε ότι η HuR αλληλεπιδρά με την pp32/PHAP-I και η αποκοπή της από τις κασπάσες 3 και 7 δημιουργεί έναν ρυθμιστικό μηχανισμό ο οποίος συνεισφέρει σε μια ενισχυμένη αποπτωτική αντίδραση. Επιπλέον, η απαλοιφή της έκφραση της pp32/PHAP-I, με μεθόδους RNAi, οδηγεί στη μείωση της κυτταροπλασματικής συσσώρευσης της HuR με αποτέλεσμα την καθυστερημένη αποπτωτική αντίδραση.

Πρωτεόλυση μέσω ουβικουτινίωσης σε συνθήκες θερμικού σοκ.

Σε συνθήκες θερμικού σοκ (Heat Shock, HS) η HuR μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αλλάζοντας την ικανότητα ρύθμισης των mRNA στόχων της. Το θερμικό σοκ μειώνει την σταθερότητα της πρωτεΐνης HuR μέσω του συστήματος ουβικουτινίωσης και πρωτεασώματος, χωρίς όμως να την επηρεάζει σε επίπεδο mRNA ή στην μετάφραση της (Abdelmohsen et al. 2009). Το κατάλοιπο λυσίνης 182 ταυτοποιήθηκε ως υπεύθυνο για την πρωτεόλυση της HuR μέσω αποικοδόμησης, ενώ στις συνθήκες HS, η φωσφορυλίωση από την κινάση Chk2 έδειξε να προστατεύει απέναντι στην απώλεια της HuR. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι το HS μειώνει παροδικά τα επίπεδα της HuR με αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων σε τέτοιες συνθήκες.

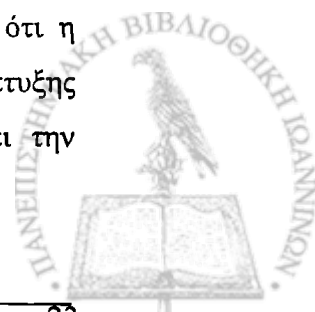
Οι θεωρήσεις αυτές υποδηλώνουν έναν οργανωτικό ρόλο της HuR στα πλαίσια του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού. Είναι φανερό ότι χωρίς την επερχόμενη συμβολή της HuR για την έξοδο αυτών των mRNAs από τον πυρήνα, δεν θα ήταν

δυνατή η σωστή ρύθμιση τους. Ακόμη, η HuR μπορεί ταυτόχρονα κατά την διαδικασία της μεταφοράς να ανταγωνίζεται και άλλες RBPs, οι οποίες προάγουν την αποικοδόμηση του mRNA, όπως τα μέλη της οικογένειας των τριστετραπρολινών και των hnRNP και τα ένζυμα αποικοδόμησης του εξοσώματος (Chen et al. 1995; Mukherjee et al. 2002). Επιπρόσθετα, η επιρροή της HuR στην μετάφραση εξαρτάται και από την πιθανή αλληλεπίδραση της με τα μέλη της οικογένειας των RBP πρωτεϊνών TIAs (Katsanou et al. 2005).

1.2.3. Βιολογικές δράσεις της πρωτεΐνης HuR *in vivo*

Το πειραματικό υλικό στο οποίο εφαρμόστηκε η πλειοψηφία των ερευνών διερεύνησης του ρόλου της πρωτεΐνης HuR αναφέρεται σε *in vitro* συνθήκες. Παρόλα αυτά, ο χαρακτηρισμός του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης HuR, σε επίπεδο κυτταρικού στρες, κυτταρικής διαίρεσης, πολλαπλασιασμού και σε έμφυτες και επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις, δεν είναι εφικτός χωρίς την χρήση *in vivo* συστημάτων μελέτης που αποσκοπούν στην απαλοιφή ή την υπερέκφραση της, τόσο καθολικά όσο και ιστοειδικά.

Μια πρώτη μελέτη που συσχέτισε την πρωτεΐνη HuR με αναπτυξιακές διαδικασίες, ήταν η *in vivo* υπερέκφραση της HuR στα κύτταρα της γαμετικής σειράς του ποντικού. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε τον σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στην ορθή διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων και τη σπουδαιότητα των επιπέδων έκφρασης της για την παραγωγή λειτουργικών γαμετών (Levadoux-Martin et al. 2003). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη HuR ελέγχει την κατάλληλη χρονική έκφραση σημαντικών mRNAs κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των αρσενικών γαμετικών κυττάρων, μέσω της κατάλληλης αποθήκευσης και μετέπειτα προώθησης στα πολυσώματα των κρίσιμων αυτών mRNAs (Nguyen Chi et al. 2009). Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη η οποία αφορά την πλήρη απαλοιφή της HuR από το γονιδίωμα του ποντικού, αποκάλυψε την εμπλοκή της και σε άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες. Ο διαγονιδιακός αυτός ποντικός παρουσιάζει καθυστερημένη εμβρυική ανάπτυξη και τελικά εμβρυικό θάνατο στο στάδιο της γαστριδίωσης. Με την βοήθεια διαγονιδιακών ιστοειδικών συστημάτων, η απαλοιφή της HuR είτε σε εμβρυονικά είτε σε ενδοθηλιακά συστατικά αποκαλύπτει ότι η εμβρυονική θνησιμότητα αποτελεί συνέπεια της μη φυσιολογικής ανάπτυξης εξτραεμβρυονικού πλακούντα. Συγκεκριμένα, η απουσία της HuR βλάπτει την



αντιστροφή των αλλαντοϊκών τριχοειδών στη ζώνη των χοριονικών τροφοβλαστών και την διαφοροποίηση των συνκυττιοτροφοβλαστικών κυττάρων, που ελέγχουν την μορφογένεση και την αγγειογένεση του πλακουντιακού λαβυρίνθου κατά την εμβρυική υποστήριξη. Τα έμβρυο με απαλοιφή της HuR μόνο σε εμβρυονικά κύτταρα παρακάμπτουν το πρόβλημα του πλακούντα. Παρά ταύτα, προχωρώντας στα αναπτυξιακά στάδια, τα έμβρυα παρουσιάζουν ανωμαλίες στην σκελετική οστεοπλασία, συγχωνεύσεις στα σωματικά άκρα, και ασπληνία (Katsanou et al. 2009).

Εκτός του *in vivo* αναπτυξιακού ρόλου της HuR, μελέτες ιστοειδικής απαλοιφής της HuR στα T-λεμφοκύτταρα ποντικού αποκάλυψαν την εμπλοκή της σε επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις *in vivo*. Οι ποντικοί με την πρόιμη διαγραφή της HuR από τα θυμοκύτταρα έχουν διογκωμένους θύμους αλλά ταυτόχρονα παρουσιάζουν σημαντική έλλειψη των T κυττάρων στην περιφέρεια. Οι φαινότυποι αυτοί είναι αποτέλεσμα της εμπλοκής της HuR και του ελέγχου που ασκεί: α) σε εγγενή σήματα ελέγχου που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο των ανώριμων θυμοκυτταρικών προγονικών κυττάρων β) σε αντιγονικά σήματα που μπορούν να προωθήσουν την ενεργοποίηση και την θετική επιλογή των ώριμων θυμοκυττάρων, γ) σε αντιγονικά σήματα και σήματα κυτταρικού θανάτου που προωθούν την διαγραφή των θυμοκυττάρων και τέλος δ) σε σήματα χημοκινών που μπορούν να οδηγήσουν τα τελικώς επιλεγμένα θυμοκύτταρα στην περιφέρεια. Αυτές οι διαδικασίες χαρακτηρίζονται από τον έλεγχο που ασκεί η HuR στην έκφραση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, καθώς και σε μόρια τα οποία συμμετέχουν στη μεταβίβαση μηνυμάτων μέσω των υποδοχέων θανάτου (Papadaki et al. 2009)

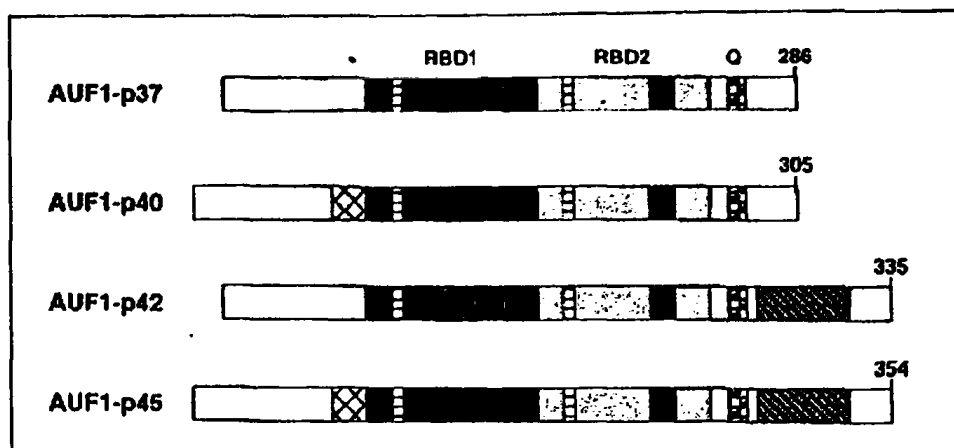
Τέλος, η *in vivo* μελέτη ιστοειδικής υπερέκφρασης της πρωτεΐνης HuR σε κύτταρα της μυελώδους σειράς, διερεύνησε τον ρόλο της σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η συνεργική λειτουργική αλληλεπίδραση της HuR με τις άλλες κατασταλτικές ARE-BPs οδήγησε σε μειωμένη βιοσύνθεση κυττοκινών και μεσολαβητών φλεγμονής. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν για την HuR, όπως θα αναλυθεί εκτενώς στο κεφάλαιο 4, έναν κεντρικό οργανωτικό ρόλο της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

1.2.4. Η πρωτεΐνη AUF1/hnRNP

Το γονίδιο του AUF1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στο γονιδιακό τόπο q21 και το προϊόν που κωδικοποιεί ανήκει στο σύμπλοκο των ετερογενών ριβονουκλεοπεπτιδίων (hnRNPs) και έχει καθολική έκφραση. Αναγνωρίστηκε ως ARE-BP, λόγω της ιδιότητας του να προσδένεται στο 3' UTR των mRNAs του c-myc και του GM-CSF και να προκαλεί την ταχεία *in vitro* αποικοδόμηση τους, σε κύτταρα της σειράς K562 (ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας) (Brewer 1991). Έκτοτε, ο AUF1 μελετήθηκε εκτενέστερα και αναδείχθηκε ο σημαντικός του ρόλος στον μετά-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής ρύθμισης.

1.2.4.1. Δομή και χαρακτηριστικά του AUF1

Ο AUF1 είναι ένα πλειοτροπικό μόριο, γεγονός που απεικονίζεται και στην ιδιαίτερη δομή του. Η πρωτεΐνη του AUF1 απαντάται σε τέσσερεις ισομορφές μεγέθους 37 (p37), 40 (p40), 42 (p42), και 45 (p45) kDa, οι οποίες παράγονται λόγω της προσθήκης ή όχι δυο πεπτιδικών ενθεμάτων. Τα πεπτιδικά ενθέματα από 19 και 49 αμινοξέα αντίστοιχα 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 πεπτίδιο των 19 αμινοξέων το οποίο βρίσκεται εντός του RRM, έχουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης σε ARE αλληλουχίες σε σχέση με τις ισομορφές p42 και p45, που φέρουν το πεπτίδιο στο μόριο τους. Αντίστοιχα, το πεπτίδιο 40, 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 σε ARE αλληλουχίες (Wagner et al. 1998) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής των ισομορφών του AUF1.

Ο AUF1 φέρει δύο ταυτόσημα μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRM). Προς το C-τελικό άκρο περιλαμβάνει μία περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη (Q domain), η οποία επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης του RNA. Από εναλλακτικό μάτισμα του pre mRNA προκύπτουν 4 ισομορφές (p37, p40, p42, p45) της πρωτεΐνης AUF-1.

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 (Εικόνα 1.12). Μάλιστα, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι τα δύο αυτά λειτουργικά στοιχεία του AUF1 εκτός από το γνωστό μοτίβο αναγνώρισης των AREs, αναγνωρίζουν επίσης και μονόκλωνες αλληλουχίες τελομερικού DNA στις οποίες και προσδένεται (Katahira et al. 2001; Enokizono et al. 2005). Παρόλα αυτά, *in vitro* μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα μόρια του AUF1 με τροποποιημένα καρβοξυτελικά ή/και αμινοτελικά άκρα, έδειξαν ότι ενώ τα δύο στοιχεία RRM είναι απαραίτητα για την ικανότητα πρόσδεσης του AUF1 στο mRNA, δεν επαρκούν. Συγκεκριμένα η παρουσία δύο στοιχείων εκατέρωθεν των RRM καθορίζει την ικανότητα πρόσδεσης του. Προς το αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται μια περιοχή 28 αμινοξέων πλούσια σε αλανίνη, υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες μέσω του διμερισμού 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. 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 (DeMaria et al. 1997).

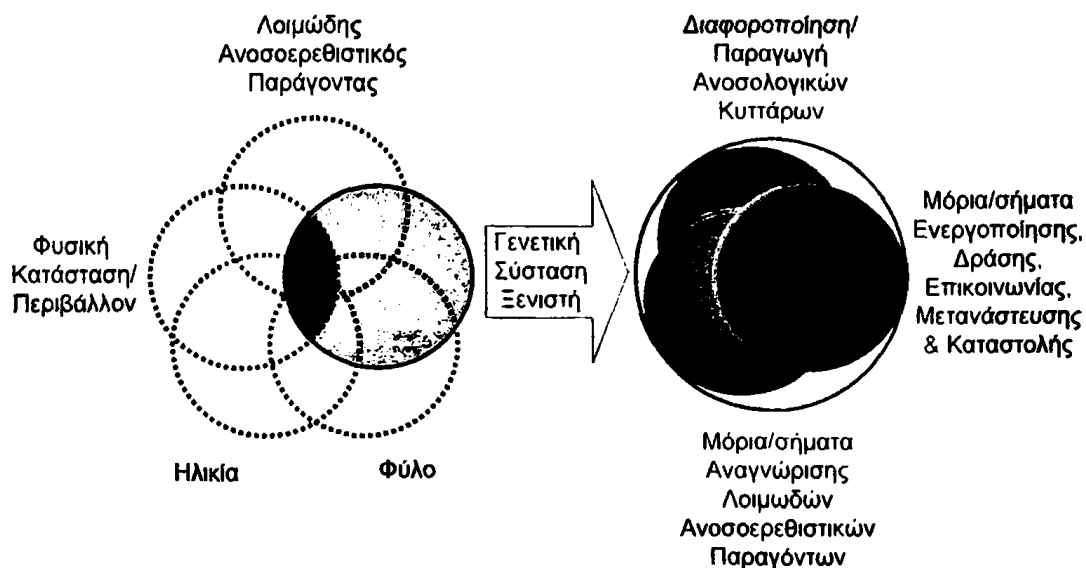
1.2.4.2. Βιολογικές δράσεις της πρωτεΐνης AUF1 *in vivo*

Ο διαγονιδιακός ποντικός με πλήρη απαλοιφή της πρωτεΐνης AUF1, αποκάλυψε την εμπλοκή της σε διαδικασίες ρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης. Ο ποντικός αυτός εμφάνισε μικρή αναπτυξιακή καθυστέρηση αλλά και υψηλή ευαισθησία σε ένα μοντέλο πειραματικής ενδοτοξαιμίας (Lu et al. 2006). Αυτή η αντίδραση οφείλεται σε αυξημένη σταθερότητα των mRNA του TNF και της IL1b σε μακροφάγα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια σαφής ένδειξη ότι ο AUF1 δρα με αντί-φλεγμονώδη τρόπο. Η υπερέκφραση των δύο αυτών κυττοκινών είναι ειδική και η πρωτεϊνική υπερπαραγωγή τους οφείλεται στην ανικανότητα αποικοδόμησης των mRNAs τους μετά από φλεγμονώδη ερεθισμό (Lu et al. 2006). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι ποντικοί με απώλεια του AUF1, καθώς προχώραγε η ηλικία τους, παρουσίασαν δερματίτιδα με την χαρακτηριστική εμφάνιση κνησμού και ξηρότητας στο δέρμα. Ιστολογικά παρουσιάζεται επιδερμική ακάνθωση και σπογγίωση παρουσία αυξημένου αριθμού φλεγμονωδών κυττάρων, όπως μακροφάγων, ουδετερόφιλων και T-λεμφοκυττάρων. Τα φλεγμονώδη αυτά κύτταρα παρουσίασαν αυξήσεις στα επίπεδα των κυττοκινών TNF, IL2 και IL1b, οι οποίες είχαν σαν τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας χρόνιας μορφής δερματίτιδας (Sadri and Schneider 2009). Οι *in vivo* αυτές μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη AUF1 είναι ένας απαραίτητος παράγοντας στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση κυττοκινών και καθορίζει φλεγμονώδεις αποκρίσεις οξείας και χρόνιας μορφής.

1.3 Γονιδιακή έκφραση και έμφυτη ανοσιακή απόκριση

1.3.1. Η πολυπαραγοντική βάση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης

Η ανάπτυξη και οι πολύπλοκες δράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στη λοίμωξη και στην ιστική βλάβη καθορίζονται τόσο από τη γενετική σύσταση του οργανισμού όσο και από επιστατικές, περιβαντολλογικές και άλλες εξωγενείς παραμέτρους. Το σύνολο αυτών των παραμέτρων έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης για να καθορίσει την παραγωγή και τη δράση των ανοσολογικών κυττάρων (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Οι παράμετροι που καθορίζουν τη φλεγμονώδη ανοσολογική απάντηση -π.χ. στην ιστική βλάβη ή τη λοίμωξη- βασίζονται στη γενετική σύσταση του οργανισμού η οποία κατευθύνει τη παραγωγή, την ενεργοποίηση και τη δράση των κυττάρων της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας.

Με δεδομένη τη συσχέτιση των μετα-μεταγραφικών παραγόντων με τις αποκρίσεις της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης, εστιάζουμε παρακάτω κυρίως στο σύστημα αυτό. Η έμφυτη ανοσία έχει πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή βάση και αποτελεί την συνισταμένη τριών διακριτών διαδικασιών:

1. Την αυτόματη ή επαγωγίμη δημιουργία κυττάρων με ανοσοβιολογική δράση μέσα από τις διαδικασίες διαφοροποίησης των προγονικών αιμοποιητικών

βλαστοκυττάρων σε κύτταρα της μυελώδους σειράς, όπως τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα/ηοσινόφιλα και δενδριτικά κύτταρα μαζί με τα ερυθροκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται και καθοδηγείται από σήματα διάφορων αυξητικών παραγόντων/κυττοκινών, που επηρεάζουν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες διαφοροποίησης.

2. Την αναγνώριση των λοιμωδών ή ιστικών προϊόντων και την αντίδραση ενεργοποίησης των κυττάρων μέσω επαφής ή φαγοκυττάρωσης, με σκοπό την παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων (κυτταροκινών, χημειοτακτικών παραγόντων και πεπτιδίων οξείας φάσης). Στην συνέχεια ακολουθεί η μετανάστευση και ο εποικισμός στο σημείο ερεθισμού, η πρώτη εκκαθάριση προσβεβλημένων κυττάρων και η ανοσονενίσχυση προς υποστήριξη της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης μέσω της αντιγονοπαρουσίασης. Οι αντιδράσεις αναγνώρισης και ενεργοποίησης καθοδηγούνται από υποδοχείς αναγνώρισης βακτηριακών/ιικών προτύπων, όπως οι υποδοχείς Toll-like (TLRs), καθώς και από υποδοχείς κυτταροκινών της οικογένειας του TNF, ιντερλευκινών, ιντερφερονών και χημειοτακτικών παραγόντων.
3. Την ομοιοστατική διαμόρφωση της αντίδρασης, δηλαδή την ενίσχυση της ή την καταστολή της, η οποία εξαρτάται από το ισοζύγιο προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων, τόσο από τα ίδια τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας όσο και από τα κύτταρα της επίκτητης αλλά και τους ιστούς.

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η έμφυτη ανοσία βασίζεται σε πολλά δίκτυα γονιδίων, όπως παρουσιάζεται στα παρακάτω κεφάλαια και ότι η οποιαδήποτε απόκλιση στη ρύθμιση τους ενδέχεται να προκαλέσει τη βάση για την ανάπτυξη είτε ανοσοκαταστολής ή χρόνιας φλεγμονώδους παθολογίας.

1.3.2. Οι μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια της μυελοποίησης.

Η γονιδιακή έκφραση κυττοκινών και μεταγραφικών παραγόντων μπορούν να καθοδηγούν τις αιμοποιητικές και μυελοποιητικές διαδικασίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οντογένεση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας.



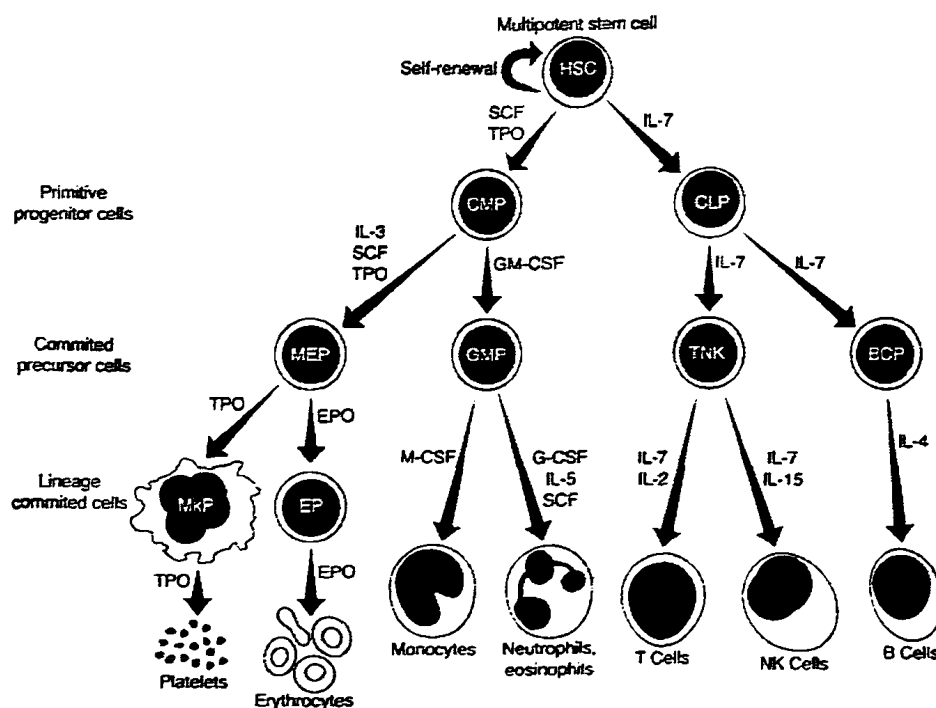
1.3.2.1 Η αιμοποίηση.

Η αιμοποίηση αναφέρεται στην δημιουργία και ανάπτυξη του συνόλου των διαφοροποιημένων κυττάρων του αίματος. Στα ενήλικα θηλαστικά, ο μυελός των οστών αποτελεί το βασικό αιμοποιητικό όργανο, όπου κάθε λειτουργικά εξειδικευμένο ώριμο αιμοποιητικό κύτταρο προέρχεται από ένα κοινό αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο (HSC) ακολουθώντας μία ιεραρχημένη διαδικασία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Τα HSCs διαιρούνται με σκοπό να δημιουργήσουν περισσότερα HSCs (αυτό-ανανέωση) ή διαιρούνται και διαφοροποιούνται σε πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (MPPs), από τα οποία θα προκύψουν οι πληθυσμοί προγονικών κυττάρων με γενεολογικό περιορισμό. Με αυτόν το τρόπο προκύπτουν αρχικά δύο σειρές, η λυμφοειδής και η μυελοειδής. Η λεμφοειδής σειρά αρχίζει από τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα (CLPs) και καταλήγει σε T, B και NK κύτταρα. Η μυελοειδής σειρά αρχίζει από τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα (CMPs) συνεχίζει στα προγονικά κύτταρα ουδετερόφιλων και μακροφάγων (GMPs) ή στα προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων (MEPs) και καταλήγει στα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (ουδετερόφιλα ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) και μονοκύτταρα/μακροφάγα, ή ερυθροκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα αντίστοιχα (Iwasaki, H. 2007). Τέλος τα δένδριτικά κύτταρα μπορούν να προέλθουν τόσο από το μυελοειδικό όσο και από το λεμφοειδικό μονοπάτι (Traver et al. 2000; Manz et al. 2001). Σε κατάσταση φυσιολογικής ομοιόστασης, τα HSCs του μυελού των οστών παραμένουν αδρανή και διαιρούνται σπάνια με σκοπό να διατηρήσουν μια επαρκή ποσότητα διαφοροποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων χωρίς να εξαντλήσουν τη δεξαμενή των HSCs (Cheshier et al. 1999).

1.3.2.2 Οι κυτταροκίνες ως σήματα μυελοειδικής διαφοροποίησης

Η παραγωγή ώριμων, διαφοροποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων ρυθμίζεται από την δράση κυττοκινών στα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, όπως περιγράφεται στο Εικόνα 1.14 (Robb 2007). Οι κυτταροκίνες αναγνωρίζονται από κατάλληλους υποδοχείς και το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι η ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μεταγωγής σημάτων, τα οποία επιτρέπουν την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων σε συγκεκριμένες γενεολογικές κατηγορίες ώριμων κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα επαγόμενα από κυτταροκίνες

μονοπάτια φαίνεται να προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική βιωσιμότητα των διάφορων προγονικών υποπληθυσμών ενώ οι διαδικασίες της γενεολογικής δέσμευσης φαίνεται να είναι ανεξάρτητες από εξωγενή σήματα και να καθορίζονται από ένα πρόγραμμα μεταγραφικών παραγόντων, όπως περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο (Orkin 2000; Robb 2007).



Εικόνα 1.14 Οι καθοριστικές κυτταροκίνες της αιμοποίησης. Τα HSCs δέχονται σήματα από τις κυττοκίνες SCF και TPO για διαφοροποίηση προς CMP ή την IL-7 για διαφοροποίηση προς CLP. Στην συνέχεια από τα CLP προς ώριμα λεμφοκύτταρα επικρατεί και πάλι η IL7, όπου με την συμβολή της IL2 παράγονται T κύτταρα, με την συμβολή της IL15 παράγονται NK κύτταρα και με την συμβολή της IL4 παράγονται B κύτταρα. Αντίθετα από τα CMP προς την παραγωγή αιμοπεταλίων απαιτείται TPO, προς την παραγωγή ερυθροκυττάρων EPO και για την παραγωγή GMP προγονικών κυττάρων ο GM-CSF. Τέλος από προγονικά GMP κύτταρα απαιτείται M-CSF για την παραγωγή μονοκυττάρων ενώ για την παραγωγή ουδετερόφιλων και εωσινόφιλων απαιτείται κυρίως G-CSF αλλά και IL5 και SCF (Robb 2007).

Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στην μυελοειδική διαφοροποίηση και παραγωγή μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων στην οποία, κεντρικό ρόλο έχουν οι κυττοκίνες GM-CSF, G-CSF και M-CSF. Η επίδραση του GM-CSF στα αιμοποιητικά

προγονικά κύτταρα καθοδηγεί την ανάπτυξη μονοκυττάρων και μακροφάγων, ουδετερόφιλων, εωσινόφιλων και βασεόφιλων. Η επίδραση του M-CSF καθοδηγεί την ανάπτυξη μόνο μονοκύτταρων και μακροφάγων ενώ η επίδραση του G-CSF καθοδηγεί την ανάπτυξη ουδετερόφιλων, εωσινόφιλων και βασεόφιλων. Οι δράσεις τους αφορούν υψηλή κυτταρική επιβίωση ή/και πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση αλλά και ενεργοποίηση. Αν και διάφοροι μυελοειδικοί πληθυσμοί αντιδρούν στους παράγοντες GM-CSF και M-CSF, μόνο τα κύτταρα της σειράς των μακροφάγων αποτελούν κοινό στόχο και των δύο. Η παρουσία M-CSF σε κύτταρα μυελού των οστών *in vitro* οδηγεί, τελικά, μόνο σε κύτταρα που προσομοιάζουν φαινοτυπικά και λειτουργικά με τα μακροφάγα αφού αναπτύσσουν φαγοκυτταρική δυνατότητα. Από την άλλη η παρουσία του GM-CSF *in vitro*, μπορεί να παράγει όλους τους τύπους μυελοκυττάρων και μονοκυττάρων χωρίς όμως να δίνει λειτουργικά μακροφάγα (Hashimoto et al. 1999).

1.3.2.3 Γονιδιακή ρύθμιση κυττοκινών της μυελοποίησης μέσω ARE.

Η κυττοκίνη GM-CSF αποτελεί ένα από τα καλύτερα περιγεγραμμένα παραδείγματα μετα-μεταγραφικής ρύθμισης μέσω των στοιχείων ARE στην μυελοποίηση. Διάφορες *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει το σημαντικό ρόλο των ARE στην σταθεροποίηση του GM-CSF mRNA και κατά συνέπεια στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης του. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση σε ποντικούς διαγονιδίου GM-CSF αλλά και διαγονιδίου GM-CSF από το οποίο έχει επιλεκτικά αφαιρεθεί το στοιχείο ARE (GM-CSF/ARE⁻) οδηγεί σε σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα και θνησιμότητα. Ανάλυση των ποντικών αυτών, κατά την εμβρυική ανάπτυξη, έδειξε συσσώρευση του διαγονιδιακού GM-CSF/ARE⁻ στην εμβρυική ηλικία 14 ενώ η συσσώρευση του διαγονιδιακού GM-CSF παρατηρήθηκε μετά την εμβρυική ηλικία 18. Η διαφορά αυτή υποδεικνύει ότι η απουσία του ARE οδηγεί στην πρόωρη και ανεξέλεγκτη συσσώρευση του GM-CSF μεταγράφου. Παρά ταύτα, τόσο η συσσώρευση διαγονιδιακού GM-CSF/ARE⁻ όσο και η συσσώρευση διαγονιδιακού GM-CSF οδήγησε σε σοβαρές αιμοποιητικές αλλαγές όπως ο αυξημένος πολλαπλασιασμός μακροφάγων και ουδετερόφιλων και η αύξηση των προγονικών τους κυττάρων (Houzet et al. 2001).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η μετα-μεταγραφική ρύθμιση του GM-CSF κατά την μυελοποίηση, επίσης επηρεάζεται και απουσία της AREBP πρωτεΐνης TTP.

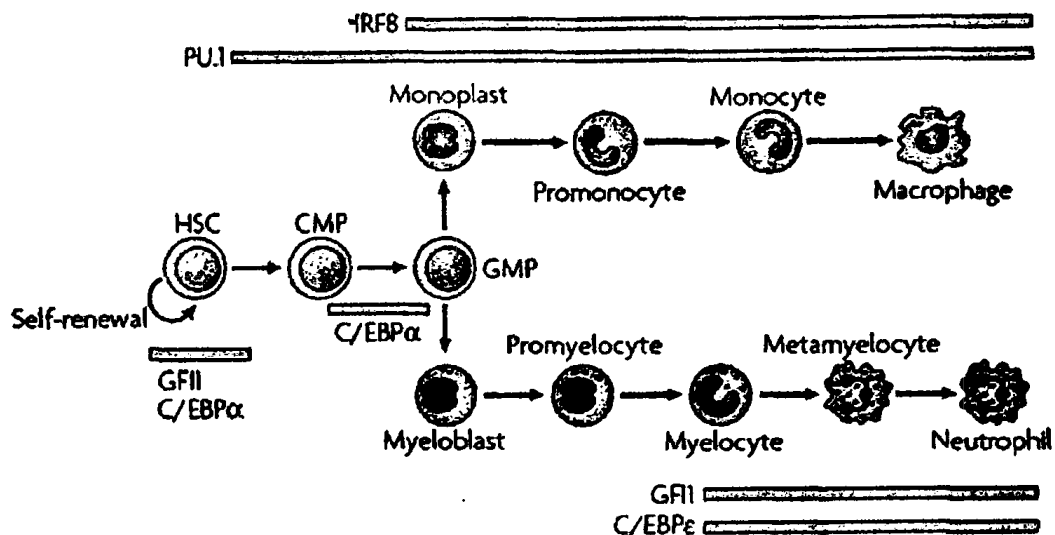
Ο ποντικός με την πλήρη απαλοιφή της TTP, ενώ είναι φυσιολογικός έως την γέννηση του, σύντομα παρουσιάζει, μεταξύ άλλων, μυελικές και εξωμυελικές υπερπλασίες (Taylor et al. 1996), οι οποίες φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της επιρροής της TTP στο mRNA του GM-CSF (Carrick et al. 2004). Μοριακά έχει δειχθεί, ότι η πλήρης απαλοιφή της TTP έχει ως αποτέλεσμα την ανεπιτυχή αποαδενυλίωση του GM-CSF mRNA και κατ' επέκταση την ανεπιτυχή αποικοδόμηση του οδηγώντας έτσι στην σταθεροποίηση του mRNA του (Carballo et al. 2000; Carrick et al. 2004).

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι σαφές, ότι αλλοιώσεις σε μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης κυττοκινών, όπως ο GM-CSF, μπορούν να έχουν αντίκτυπο σε αναπτυξιακές διαδικασίες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

1.3.2.4 Μυελοποίηση και μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων. Κάθε μία από αυτές τις πυρηνικές πρωτεΐνες επάγει την έκφραση συγκεκριμένων, γενεολογικά δεσμευμένων ομάδων γονιδίων-στόχων με σκοπό την καθοδήγηση προγονικών κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα διαφοροποίησης (Rosenbauer and Tenen 2007). Ταυτόχρονα μπορεί να επηρεάζει και κατασταλτικά την δράση αντιτιθέμενων μεταγραφικών παραγόντων (Orkin 2000).

Όπως έχουν δείξει διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών (Tenen 2003; Rosenbauer and Tenen 2007), η δημιουργία των μυελοειδικών κυττάρων ενορχηστρώνεται από ένα σχετικά μικρό αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι περιγράφονται στο **Εικόνα 1.15**.



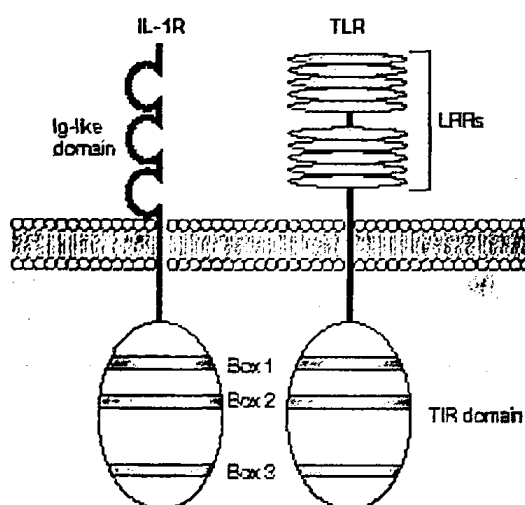
Εικόνα 1.15: Οι μεταγραφικοί παράγοντες της μυελοειδικής διαφοροποίησης. Η παραγωγή μακροφάγων εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες PU.1 και IRF8. Σε αυτή την διαδικασία, ο PU.1 φαίνεται να είναι απαραίτητος για όλα τα ενδιάμεσα στάδια διαφοροποίησης ξεκινώντας από τα HSCs, ενώ ο IRF8 φαίνεται να παίζει ρόλο σε μεταγενέστερους προγονικούς υποπληθυσμούς. Σε αντίθεση, ο C/EBPα είναι απαραίτητος για την μετάβαση από το στάδιο των CMPs στο στάδιο των GMPs, τα οποία στην συνέχεια μέσω των μεταγραφικών παραγόντων GFI1 και C/EBPε θα ρυθμίσουν την παραγωγή ουδετερόφιλων. Τέλος, τόσο ο GFI1 όσο και ο C/EBPα είναι απαραίτητοι για την αυτο-ανανέωση των HSCs (Rosenbauer and Tenen 2007).

Η απαίτηση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, σε συγκεκριμένες ποσότητες, που μπορούν να διασφαλίσουν την ιεραρχημένη μυελοειδική διαφοροποίηση υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης τους πρέπει να υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο. Ένα παράδειγμα πιθανής μετα-μεταγραφικής ρύθμισης μεταγραφικών παραγόντων μυελοποίησης, μέσω ARE, έρχεται από την *in vitro* ανάλυση της αλληλεπίδρασης του C/EBPβ και της HuR. Ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBPβ φαίνεται να εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ώριμα μακροφάγα. Σε κύτταρα εμβρυικών ινοβλαστών, η απαλοιφή από τον υποκινητή του γονιδίου C/EBPβ, του *cis* στοιχείου πρόσδεσης της πρωτεΐνης HuR είχε σαν αποτέλεσμα την μετακίνηση από τον πυρήνα και την υπερσυσσώρευση του mRNA του στο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά, όπως ήταν αναμενόμενο, έδειξαν αυξημένη ικανότητα διαφοροποίησης προς λιπώδη ιστό (Cherry et al. 2008).

1.3.3. Οι μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια έμφυτων φλεγμονωδών αποκρίσεων

1.3.3.1 Βακτηριακοί υποδοχείς

Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας έχουν εξελιχθεί, έτσι ώστε να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες «δομές», που έχουν διατηρηθεί σε ποικίλους μικροοργανισμούς. Οι δομές αυτές καλούνται «παθογόνο-σχετιζόμενα μοριακά πρότυπα» (Pathogen-Associated molecular patterns-PAMPs). Τα περισσότερα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας εκφράζουν «υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων» (Pattern recognition receptors-PRRs), για την άμεση αντίδραση στα PAMPs. Τα PAMPs μπορούν επίσης να αναγνωριστούν και από διαλυτούς PRRs για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Στο σύνολο τους, οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας αναγνωρίζουν περίπου 10^3 PAMPs. Η πιο χαρακτηριστική οικογένεια υποδοχέων τύπου PRR είναι η οικογένεια των υποδοχέων Toll like (TLRs), οι οποίοι αναγνωρίζουν μικροβιακά συστατικά πολλών μικροοργανισμών. Η ενεργοποίηση διαφορετικών TLRs επάγει διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα στόχους, με ικανότητα ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, αλλά και της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης.



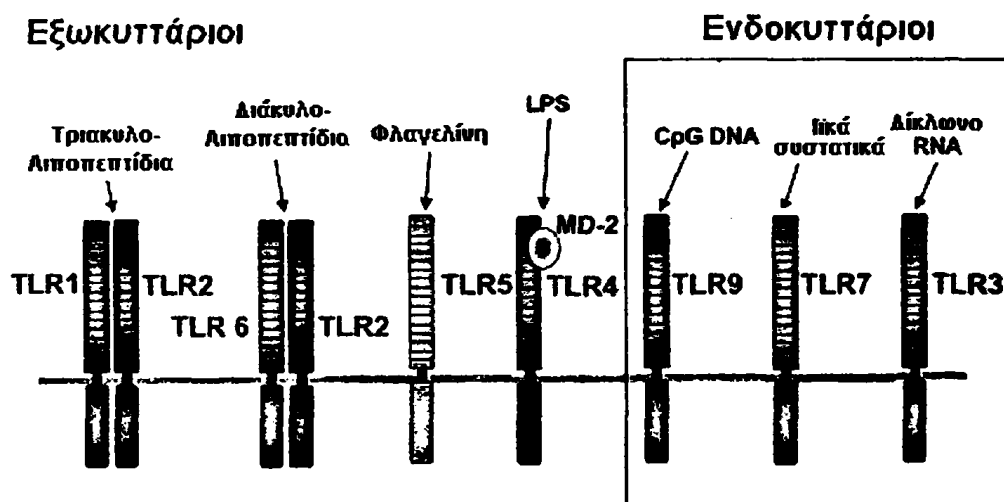
Εικόνα 1.16. Στοιχεία της δομής των TLR (Akira and Takeda 2004)

Οι TLRs είναι τύπου 1 διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και με βάση την ομοιότητα τους στην κυτταροπλασματική περιοχή, ανήκουν στην ευρύτερη



οικογένεια που περιλαμβάνει τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης 1 (IL-1Rs). Οι TLRs στην εξωκυτταρική τους περιοχή, έχουν μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (Leucine Rich Repeat, LRR) ενώ η εξωκυτταρική περιοχή των IL-1Rs περιλαμβάνει περιοχές αντίστοιχες με αυτές των ανοσοσφαιρινών (Akira and Takeda 2004) (Εικόνα 1.16). Το εξωκυττάριο τμήμα των TLRs περιλαμβάνει 19-25 LRRs, μήκους 24-29 αμινοξέων το καθένα. Θεωρείται ότι η περιοχή LRR αναγνωρίζει και προσδένει συγκεκριμένα PAMPs (Bell et al. 2003) μικροοργανισμών τα οποία παραμένουν σταθερά για κάθε τάξη, προσδίδοντας παράλληλα την υψηλή εξειδίκευση απέναντι στην πληθώρα των παθογόνων οργανισμών που χαρακτηρίζει τους TLRs, όπως σχηματικά παρουσιάζεται και στο Εικόνα 1.17.

Ωστόσο, παρά τη διάφορα τους στα εξωκυττάρια τμήματα, τόσο οι TLRs όσο και IL-1Rs έχουν μια συντηρημένη περιοχή 200 αμινοξέων στο ενδοκυττάριο τμήμα τους, η οποία είναι γνωστή ως περιοχή TIR (Εικόνα 1.16). Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου σήματος. Η ειδικότητα του σήματος καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ειδικών μορίων «προσαρμοστών» με τις περιοχές TIR, οδηγώντας στην ενεργοποίηση ποικίλων ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος με σκοπό την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Akira and Takeda 2004).



Εικόνα 1.17. Οι TLRs και οι προσδέτες τους. Η οικογένεια των TLR μπορεί να διακρίνει ειδικά μοτίβα βακτηριακών συστατικών. Συγκεκριμένα, ο TLR2 αναγνωρίζει τα βακτηριακά τριακυλο- και διάκυλο λιποπεπτίδια μέσα από τη συνεργική του δράση με τους TLR1 και TLR6, αντίστοιχα. Ο TLR4 αναγνωρίζει τους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και ο TLR5 τη φλαγελίνη. Τέλος, ο TLR9 είναι ο υποδοχέας αναγνώρισης των DNA νησίδων CpG και ο TLR3 εμπλέκεται στην αναγνώριση του δίκλωνου ιϊκού RNA (Takeda and Akira, 2004).

Η δράση των υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων συνδυάζεται και με τη δράση των φλεγμονωδών υποδοχέων των κυτταροκινών όπως π.χ. των υποδοχέων του TNF (TNF Receptors) ή της IL-1 (IL-1 Receptors). Η συνδυαστική τους ενεργοποίηση ενδέχεται να ενισχύει ή να καταστέλλει το εύρος της φλεγμονώδους απόκρισης. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών υποδοχέων είναι η επιλεκτική και η διαδοχική ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σημάτων, που έχουν ως τελικό αποδέκτη την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φλεγμονωδών μορίων δράσης.

1.3.3.2 Φλεγμονωδοσυσχετιζόμενα ARE μονοπάτια.

Καθώς αποκαλύπτονται οι μηχανισμοί δράσης των TLRs και των υποδοχέων κυττοκινών, γίνεται ξεκάθαρο πλέον ότι τα σήματα τους στοχεύουν μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του κλασσικού TLR4 μονοπατιού σε μακροφάγα πυροδοτεί θετικές μεταβολές σε σταθερότητα και μεταφρασσιμότητα των mRNA των TNF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8 και Cox2 (Kracht and Saklatvala 2002). Μια τάξη πυριδινιλικού ιμιδαζολικού δακτυλίου ταυτοποιήθηκε ότι μπλοκάρει τις μετα-μεταγραφικές αλλαγές, μέσω πρόσδεσης σε μέλη της οικογένειας σερίνης/θρεονίνης της p38 SAPK (πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από σήματα στρες) (Lee and Young 1996). Με την χρήση τέτοιων μικρών μοριακών αναστολέων και διαγονιδιακών συστημάτων, η έρευνα που ακολούθησε αποκάλυψε ότι οι ισομορφές p38α/β ρυθμίζουν την σταθερότητα και την μεταφρασσιμότητα των μορίων των mRNA κυττοκινών που περιέχουν ARE. Η δράση αυτή εξαρτάται πρώτιστα από την κινάση του στρες p38 και την ακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης MAPKAPK-2 ή MK2 και σε μικρότερο βαθμό από την MAPKAP-3, οι οποίες στοχεύουν σε ARE προσδεδεμένες πρωτεΐνες (Gaestel 2006). Οι μεταλλαγμένοι ποντικοί με απαλοιφή της MK2, είναι ανθεκτικοί σε μοντέλα ενδοτοξαιμίας και σε αρθρίτιδα επαγόμενη από κολλαγόνο, ενώ ταυτόχρονα παραμένουν ευαίσθητοι σε ενδοκυτταρικά παθογόνα, καθώς ανταποκρίνονται σε καταστάσεις απώλειας TNF/TNFR (Kotlyarov et al. 1999; Lehner et al. 2002; Hegen et al. 2006). Οι επιδράσεις αυτές έχουν μερικώς χαρακτηριστεί σε περιπτώσεις απώλειας της MK2 ρύθμισης για ARE εξαρτώμενη σταθεροποίηση ή/και μετάφραση mRNA κυττοκινών όπως του TNF και της IL6 (Neininger et al. 2002; Gaestel 2006).



Επιπρόσθετα, TLR σχετιζόμενα σήματα που καταλήγουν σε AREs έχουν περιγράψει και περιλαμβάνουν ισομορφές της (c-jun N terminal kinase) JNK κινάσης, την MAP3K Tpl2/Cot και την (extracellular signal kinase 1/2) ERK 1/2 MAP κινάση αποκαλύπτοντας επιπρόσθετα φαινόμενα στα οποία μεσολαβεί η περιοχή ARE, όπως η πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά του mRNA (Kontoyiannis et al. 1999; Dumitru et al. 2000; Kontoyiannis et al. 2002). Τέλος οι διασταυρώσεις των σημάτων που σχετίζονται με τα ARE απορρέουν από τη συμβολή σημάτων που αναγνωρίζονται από αντί- ή συν- φλεγμονώδεις υποδοχείς. Τέτοιο παράδειγμα είναι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση που προκύπτει από σήματα μεταβιβαζόμενα από TLRs και η ταυτόχρονη ανάδρομη αρνητική μετα-μεταγραφική ρύθμιση από IL10 και ιντερφερόνες η οποία περνά από το μονοπάτι JAK (Ιανών Κινάσων)/ STATs (Signal Transducer and Activation of Transcription) / SOCS (Supressors of Cytokine Signalling) (Kontoyiannis et al. 2001; Rajasingh et al. 2006), αυξάνοντας την πολυπλοκότητα δράσης των μετα-μεταγραφικών μηχανισμών. Αυτά τα ARE φλεγμονωδωσχετιζόμενα μονοπάτια καταλήγουν στις ARE-BPs οι οποίες είναι οι τροποποιητές των κλασσικών φλεγμονωδών μονοπατιών, που καθοδηγούν την μεταγραφή κυττοκινών σε συνθήκες ερεθισμού, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB (Εικόνα 1.18).

Κατηγορία	Παράδειγμα					
Υποδοχείς	Toll-Rs, NODs/CARDs, TNFRs					
Προσαγωγείς	TRAFs	MyD88		IRAKs		
MAP-3 κινάσες	MEKK	TAK1	ASK1	MLK	Tpl2	
MAP-2 κινάσες	MKK7	MKK4	MEK1,2	MKK3	MKK6	
MAP κινάσες	IKK	JNKs	ERK1,2		p38s	
Καταληκτικές κινάσες	IkB	Msk1	p90	Hsp's MAPKAPs		
RBP's	TFs-NFκB	Elavls, hnRNPs, TTPs, TIAs, Nefs				
Μηχανισμοί Γονιδιακής Έκφρασης	Μεταγραφή	Πυρηνική εξαγωγή και μεταφορά στο κυτταρόπλασμα Σταθεροποίηση, Μεταφραστική Ενεργοποίηση				

Εικόνα 1.18. «Καταρράκτες» ενδοκυττάρων σημάτων στη φλεγμονή.

1.3.4 Συσχέτιση παθολογίας και μετα-μεταγραφικού ελέγχου μέσω ARE

Αν και οι ARE-BPs θεωρούνται πολυδύναμα μόρια, η παρούσα διατριβή εστιάζει α) στη δράση τους για την τροποποίηση των φλεγμονωδωσχετιζόμενων γονιδίων, δηλαδή των διάφορων κυττοκινών που περιέχουν ARE, αλλά και β) στο παθολογικό αποτέλεσμα της ρύθμισης τους

1.3.4.1 ARE-BPs και μετα-μεταγραφική ρύθμιση σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Πολλές ARE-BPs έχουν συσχετισθεί με φλεγμονώδεις καταστάσεις και οι δράσεις τους έχουν περιγραφεί μέσω της μελέτης τέτοιων δυναμικών και ταχέων αποκρίσεων σε συνθήκες ερεθισμού (ρύθμιση των ERG mRNAs). Ακόμη, τα περισσότερα πειράματα μεταλλαξιγένεσης των ARE-BPs είχαν ως αποτέλεσμα φλεγμονώδεις παθολογίες.

Το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας αυτής, η TTP, είναι γνωστό ότι επηρεάζει την σταθερότητα συγκεκριμένης υποομάδας mRNAs που περιλαμβάνει τον TNF και τον GM-CSF (Carrick et al. 2004). Η TTP φωσφορυλιώνεται από την MK2 σε μακροφάγα ερεθισμένα με LPS και αυτή η φωσφορυλίωση ανεβάζει τα επίπεδα σταθερότητας της πρωτεΐνης TTP, προσδίδοντας θέσεις αγκυροβόλησης για πρόσδεση με τις πρωτεΐνες της οικογένειας 14-3-3. Αυτή η αλληλεπίδραση αποτρέπει την πρόσδεση της TTP στα mRNA στόχους της και με τον τρόπο αυτό αναστέλλονται οι αποσταθεροποιητικές της επιδράσεις (Gaestel 2006). Ως αποτέλεσμα, η p38/MK2-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση της TTP με την 14-3-3, αποσυμφορίζεται από την φωσφατάση PP2A και η TTP ενεργοποιείται προκειμένου να καταστείλει την πιθανότητα βλαβερή για το ομοιοστατικό σύστημα παραγωγή των μεσολαβητών της φλεγμονής (Sun et al. 2007). Επιπρόσθετα, το mRNA και η πρωτεΐνη της TTP φαίνεται να ρυθμίζονται με σημαντικό τρόπο σε μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, σε περιπτώσεις μελέτης πολλών από τα γονίδια στόχους της (Brook et al. 2006; Hitti et al. 2006). Τα ευρήματα αυτά κατατάσσουν την TTP ως την πρώτη πρωτεΐνη προσδεδεμένη σε RNA, με ειδική συσχέτιση σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ένας παρόμοιος ωστόσο μηχανισμός δράσης έχει προταθεί για ένα δεύτερο μέλος της οικογένειας αυτής, την πρωτεΐνη Zfp361/Brl1, με την διαφορά ότι η πρωτεΐνη αυτή αντιδρά σε σήματα από την πρωτεϊνική κινάση B (PKB) (Schmidlin et al. 2004; Benjamin et al. 2006). Ωστόσο επειδή οι ποντικοί με την πλήρη απαλοιφή



του BRF1 ή του BRF2 από το γονιδίωμα τους πεθαίνουν σε πρώιμα εμβρυονικά στάδια, δεν κατέσται δυνατή η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών τους στη φλεγμονή (Ramos et al. 2004; Stumpo et al. 2004).

Οι πρωτείνες TIA-1 και TIAR από την άλλη αναστέλλουν την μετάφραση των μεταγράφων του TNF στα μακροφάγα. Ο γονιδιακός ποντικός με απαλοιφή της TIA-1 είναι φαινοτυπικά φυσιολογικός, αλλά σε ένα συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο παρουσιάζει ήπια συμπτώματα αρθρίτιδας (Piecnyk et al. 2000; Phillips et al. 2004)., Ακόμη οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε ένα μοντέλο πειραματικής ενδοτοξαιμίας (Piecnyk et al. 2000). Η απαλοιφή της TIA-1 υπερπαράγει TNFα σε μακροφάγα κύτταρα και τα ποσοστά των TNF μεταγράφων που βρίσκονται στα πολυριβωσώματα είναι σημαντικά αυξημένα, προτείνοντας ότι η TIA-1 λειτουργεί ως ένας αποσιωπητής της μετάφρασης (Piecnyk et al. 2000). Οι μηχανισμοί λειτουργίας της TIA-1 έχουν αποκαλυφθεί *in vitro*, με την χρήση κυτταρικών συστημάτων οξειδωτικού στρες, όπου η επαγομένη φωσφορυλίωση του eIF2α, αποτρέπει την πρωτεϊνσύνθεση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η TIA-1 συναρμολογείται με συστατικά του μηχανισμού έναρξης της μετάφρασης τα οποία και σχηματίζουν τα σωμάτια στρες (Anderson and Kedersha 2006).

Αν και αυτά τα μοριακά γεγονότα δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, λόγω της ταχύτητας των αποκρίσεων τους, είναι πολύ πιθανόν να συμβαίνουν με τον ίδιο τρόπο. Κάτι τέτοιο φέρεται ως παράδειγμα σε ποντικούς με ανιχνευόμενη απαλοιφή και για την TIA-1 και για την TTP, όπου παρουσιάζουν μια βαρύτερης μορφής αρθρίτιδα σε σχέση με τους μονούς γονιδιακούς ποντικούς (Phillips et al. 2004). Παρόλα αυτά, το γεγονός αυτό συνοδεύεται με το περίεργο αποτέλεσμα ότι μακροφάγα από κύτταρα με διπλή απαλοιφή και της TIA-1 και της TTP παράγουν μικρές ποσότητες TNF, ενώ η κύρια πηγή υπερέκφρασης του TNF ήταν τα ουδετερόφιλα. Η πληροφορία αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι ενδεχομένως να υπάρχει ένα επιπλέον μόριο με κατασταλτική δράση, το οποίο λειτουργεί στα μακροφάγα. Ένα τέτοιο μόριο ενδεχομένως να είναι ο AUF1. Ιστορικά ο AUF1 ήταν η πρώτη ARE προσδεδεόμενη πρωτεΐνη που κλωνοποιήθηκε αλλά η περισσότερη από την γνώση για το μόριο αυτό δεν σχετίζεται άμεσα με φλεγμονή. Οι μελέτες που έχουν συσχετίσει τον AUF1 με την φλεγμονή έχουν ήδη παρουσιαστεί στο κεφάλαιο 1.2.4. και η εμπλοκή και αυτής της AREBP σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, θεωρείται δεδομένη.

Γενικότερα οι μεταβολές σε οποιεσδήποτε από τις ARE-BPs οδηγούν σε ανισοροπία της ανοσολογικής απόκρισης ως έλλειψη του σημαντικού ομοιοστατικού μηχανισμού, που συντελεί η ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Οι κυττοκίνες απαιτούν αυστηρό έλεγχο προκειμένου καταρχήν να αποκριθούν ή να επαχθούν επαρκώς και σε δεύτερη φάση να ρυθμιστούν ή να κατασταλούν επαρκώς. Έτσι οποιαδήποτε ομοιοστατική απορρύθμιση του ARE μετα-μεταγραφικού μηχανισμού οδηγεί σε φλεγμονώδεις παθολογικές καταστάσεις,

1.3.4.2. Τα στοιχεία ARE του TNF κατά την ανάπτυξη φλεγμονώδους παθολογίας.

Ο TNF παίζει σημαντικό ρόλο σε ένα μεγάλο εύρος ανοσοποιητικών και φλεγμονωδών φαινομένων, εκλύοντας διαφορετικά σήματα τα οποία καθορίζουν την κυτταρική απόκριση. Τα μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης του έχουν συσχετισθεί με διάφορες ανοσοβιολογικές ασθένειες.

Πρωταρχικές *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει ότι η παρουσία συντηρημένης αλληλουχίας ARE στην 3' αμετάφραστη περιοχή στο mRNA του TNF, επηρεάζει την επαγόμενη έκφραση του σε φλεγμονώδη κύτταρα (Caput et al. 1986). Η αντικατάσταση του 3' UTR του TNF με αυτό από το mRNA της β σφαιρίνης ήταν αρκετή να οδηγήσει στην υπερέκφραση του σε διαγονιδιακούς ποντικούς. Η υπερέκφραση αυτή οδήγησε στη δημιουργία διάφορων παθολογιών όπως αρθρίτιδα και φλεγμονή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Douni et al. 1995; Kollias et al. 2002). Ταυτόχρονα, η γενετική ανάλυση ποντικού με ερυθρωματώδη λύκο ανέδειξε ότι μια απλή ανωμαλία σε ένα δινουκλεοτίδιο στο 3' ARE του TNF μειώνει τα επίπεδα βιοσύνθεσης του, υποστηρίζοντας έτσι την ανάπτυξη μιας αυτοάνοσης ασθένειας (Jacob and Tashman 1993). Ωστόσο, η γονιδιακή στόχευση σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα δεν ήταν σε θέση να αναδείξει τον ακριβή ρόλο του TNF 3' ARE. Η ιστοειδική απαλοιφή της αλληλουχίας 69 ζευγών βάσεων από το γονίδιο του TNF, που αντιστοιχεί στο ARE, οδήγησε σε φαινοτύπους βαριάς μορφής πολυαρθρίτιδας και ιδιοπαθής φλεγμονώδους νόσου του εντέρου με μεγάλη ομοιότητα με την ανθρώπινη νόσο του Chrons και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Kontoyiannis et al. 1999; Kontoyiannis et al. 2001). Κατά την απουσία του ARE, η επαγόμενη παραγωγή του TNF από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα ποντικών ήταν υπερβολικά παρατεταμένη υποστηρίζοντας μια συνεχή κατάσταση έμφυτης ενεργοποίησης αλλά



και μια υπερευαισθησία σε μεσολαβητές της φλεγμονής (Kontoyiannis et al. 1999; Kontoyiannis et al. 2001; Kontoyiannis et al. 2002). Επιπρόσθετα, η απαλοιφή αυτή ήταν αρκετή για να οδηγήσει σε εκτοπική έκφραση του TNF σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν παράγουν την κυττοκίνη αυτή, υποδεικνύοντας ότι τα ARE ρυθμίζουν πολλές παραμέτρους της έκφρασης ενός mRNA (Kontoyiannis et al. 1999). Σε μοριακό επίπεδο, τα φαινόμενα αυτά αποδίδονται στην αυξημένη σταθερότητα του mRNA του TNF αλλά και στην απουσία δράσης μηχανισμών μεταφραστικής αποσιώπησης. Επιπρόσθετα, οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν ότι τα AREs μπορούν να αντιδράσουν σε ανοσο-ενεργοποιητικά αλλά και σε ανοσο-κατασταλτικά σήματα. Για παράδειγμα, η απουσία του 3' ARE του TNF καθιστά την κυττοκίνη αυτή ανίκανη να αντιδράσει σε ανοσοκατασταλτικά σήματα όπως η αντί-φλεγμονώδης κυττοκίνη IL10. Αυτή η ανικανότητα της IL10 να ρυθμίσει την βιοσύνθεση του TNF λόγω της απώλειας του ARE του εμφανίζεται ως καθοριστική παράμετρος για την ανάπτυξη φλεγμονώδους ασθένειας, όπως διαπραγματεύθηκε στην περίπτωση της ανάπτυξης ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (ΙΦΝΕ) λόγω υπερέκφρασης TNF (Kontoyiannis et al. 2002).

1.3.4.3. Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ)

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) είναι περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής στην γαστροεντερική περιοχή. Οι κύριες μορφές των ΙΦΝΕ είναι η νόσος του Chron και η ελκώδης κολίτιδα οι οποίες έχουν πολλές ομοιότητες αλλά και σημαντικές κλινικές και παθολογικές διαφορές. Τόσο η νόσος του Chron όσο και η ελκώδης κολίτιδα έχουν ένα ποσοστό 10-20 περιστατικών ανά 100.000 πληθυσμού σε Βόρεια Αμερική και Ευρώπη, με ποσοστό περιστατικών μεγαλύτερο στις αστικές περιοχές. Στην νόσο του Chron, οποιοδήποτε μέρος της γαστροεντερικής περιοχής μπορεί να εμφανίσει φλεγμονώδη παθολογία αλλά κυρίως επηρεάζεται ο τελικός ειλεός, το τυφλό έντερο, η περιτρωκτική περιοχή και το κόλον. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την παρουσία τμημάτων φυσιολογικού εντέρου ανάμεσα στις περιοχές που έχουν επηρεαστεί. Η διασταύρωση των γραμμικών ελκών με περιοχές φυσιολογικού ή οίδηματικού βλεννογόνου μπορούν να σχηματίσουν μια εμφάνιση στρογγυλών πλακών. Η νόσος του Chrons σχετίζεται με υπεραντίδραση των T helper 1 (Th1) κυττάρων και υπερβολική παραγωγή κάποιων κυττοκινών όπως της IL12/IL23 οι οποίες οδηγούν και σε υπερπαραγωγή IFN γ /IL17 από τα CD4 T

λεμφοκύτταρα. Η υπερπαραγωγή των τελευταίων κυττοκινών επηρεάζουν το λεπτό έντερο και το κόλον με ασυνεχείς πληγές και πλήρη πάχυνση του εντερικού τοιχώματος λόγω φλεγμονής με συχνή παρουσία οίδηματικών περιοχών. Ασθενείς έχουν αναφέρει συμπτώματα όπως γαστρικό πόνο, διάρρεια και αίμα στα κόπρανα αλλά και συστηματικά συμπτώματα, όπως απώλεια βάρους, πυρετό και εξάντληση.

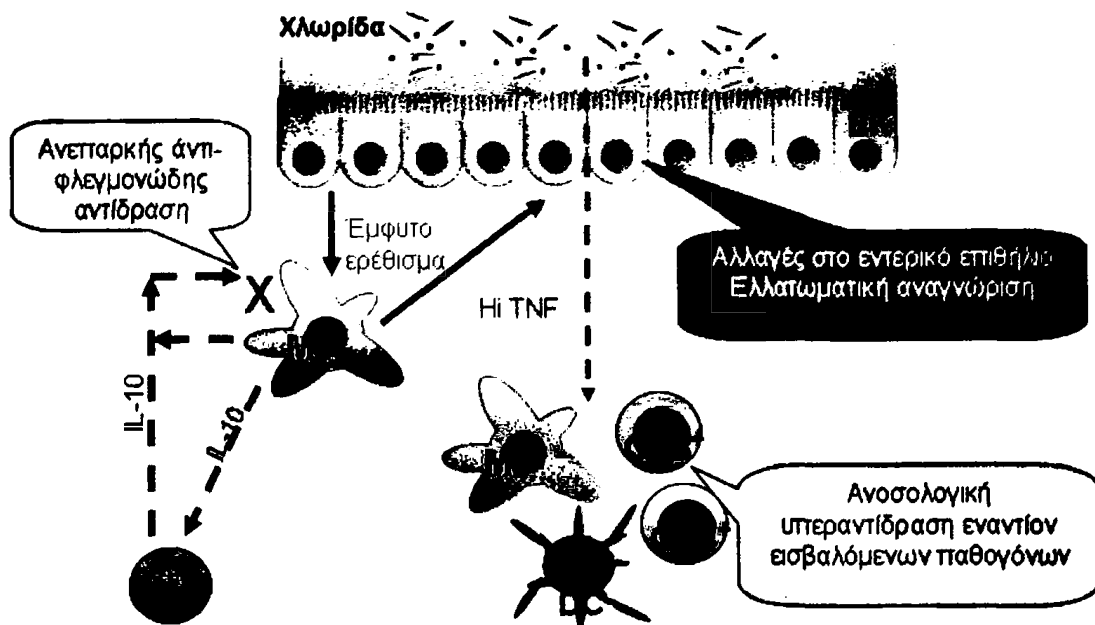
Σε αντίθεση, η ελκώδης κολίτιδα περιορίζεται μόνο στο κόλον και οι φλεγμονώδεις διαδικασίες, εμπλέκουν με διαφορετικό τρόπο (υπεραντιδράσεις τύπου Th2) τις περιοχές του όρθου και χαρακτηρίζονται από συνεχή φλεγμονώδη ανωμαλία χωρίς την παρεμβολή φυσιολογικών περιοχών. Όταν εντοπίζεται μόνο στην περιοχή του πρωκτού χαρακτηρίζεται και ως ελκώδης πρωκτίτιδα. Τα συμπτώματα και των δύο ασθενειών είναι χρόνια και παρουσιάζουν υποτροπίαση ενώ η ελκώδης κολίτιδα είναι θεραπεύσιμη μόνο με χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης του κόλον (Bouma and Strober 2003; Strober et al. 2007).

Μια από τις τρέχουσες θεωρήσεις για την ανάπτυξη των ΙΦΝΕ υποδεικνύει ότι η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα εντείνει το δυναμικό ανάπτυξης των ΙΦΝΕ αλλά το παθολογικό αποτέλεσμα καθορίζεται από γεννητικούς παράγοντες που επηρεάζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες όπως:

α) Την αναγνώριση χλωρίδας από ειδικούς υποδοχείς της φυσικής ανοσίας, όπως αυτούς των οικογενειών CARD/NOD και TLRs: η ελλειμματική ή η υπερβολική αντίδραση των υποδοχέων αυτών προκαλεί την άρρυθμη διέγερση φλεγμονωδών μορίων και των αντίστοιχων μονοπατιών μεταγωγής ενδοκυττάρων σημάτων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονής στο έντερο. Η ανίχνευση των ενδοκυττάρων μορίων που ενεργοποιούνται από TLR και NOD και σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο βιοϊατρικής έρευνας και έχει υποδείξει ένα σύνολο μορίων προσαγωγών όπως MyD88 και TRIF και μορίων μεταγωγών όπως κινασών IRAK και TAK1.

β) Την αντίδραση της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας, μέσα από την ενεργοποίηση κυττοκινών: στο σύνολο τους οι ενδοκυτταρικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από τους βακτηριακούς υποδοχείς αποσκοπεί στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κυττοροκινών, χημειοτακτικών, αυξητικών και αποπτωτικών παραγόντων. Φυσιολογικά το αποτέλεσμα της δράσης αυτού του δικτύου είναι η ενεργοποίηση της έμφυτης απόκρισης (και κατ' επέκταση της επίκτητης απόκρισης) αλλά και ο περιορισμός τους για την αποφυγή της ανάπτυξης χρόνιας φλεγμονής. Σε αντιδιαστολή η ανεπαρκής ρύθμιση της επαγομένης γονιδιακής έκφρασης των

παραπάνω παραγόντων στο βλενογόνο του εντέρου, είναι δυνατό να μετατρέψει μία φυσιολογική και αβλαβή ανοσολογική απόκριση σε μία οξεία φλεγμονή η οποία θα έχει ως τελικό επακόλουθο την καταστροφή του ιστού (Εικόνα 1.19).



Εικόνα 1.19. Θεωρήσεις για την ανάπτυξη της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου.

Ο TNF παρουσιάζεται ως κοινός παρονομαστής στην πλειονότητα των πειραματικών προτύπων των ΙΦΝΕ παρά τα διαφορετικά αιτιοπαθολογικά ερεθίσματα ή τις γενετικές ανωμαλίες που προκαλούν τις ασθένειες αυτές. Οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί όπου εμπλέκεται ο TNF παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Η δημιουργία ενός πιστού πειραματικού προτύπου TNF-επαγόμενης νόσου του Chrons επέτρεψε την ανίχνευση των ειδικών προ-φλεγμονωδών αλλά και ανοσορρυθμιστικών δράσεων του TNF στις ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα και για τη νόσο του Chron, ο TNF καθορίζει τόσο την επαγωγή προ-φλεγμονωδών (Th1) κυττοκινών όσο και την παραγωγή αντι-φλεγμονωδών παραγόντων (πχ. IL10) (Σχήμα 18). Η πλειοτροπική δράση του TNF βασίζεται στην διαφορική ενεργοποίηση των υποδοχέων TNFR55 και TNFR75. Η πρόσδεση του TNF στους υποδοχείς του επάγει πολλά κυτταρικά μονοπάτια μεταβίβασης σημάτων τόσο ενεργοποίησης όσο και κυτταρικού θανάτου. Ο TNFR55 υποδοχέας είναι ο κύριος διαμεσολαβητής των περισσότερων δράσεων του TNF στις ΙΦΝΕ ενώ ο TNFR75 δρα συνεργικά για την αύξηση της φλεγμονώδους αντίδρασης στο εντερικό βλενογόνο. Επιπρόσθετα με τη χρήση διαγονιδιακών συστημάτων και μεταμοσχεύσεων ανοσολογικών κυττάρων

αποδείχθηκε ότι α) ο TNF προκαλεί την εμφάνιση ΙΦΝΕ μέσα από την ενεργοποίηση μιας έντονης αντίδραση των CD8+ λεμφοκυττάρων η οποία ρυθμίζεται σε ένα βαθμό από CD4+ λεμφοκύτταρα, και β) ο TNF επάγει την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης ανεξάρτητα από την δράση του κατά την προσβολή του επιθηλίου, προκαλώντας ΙΦΝΕ μέσα από δύο διαφορετικούς και επικαλυπτόμενους μηχανισμούς.

1.4. Η μετα-μεταγραφική εμπλοκή της HuR και του AUF1 σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις *in vivo*.

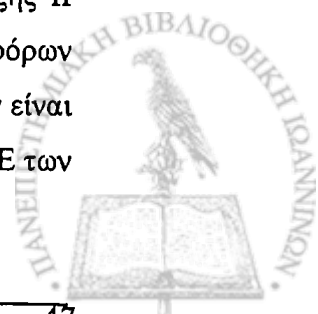
Η μελέτη των μετα-μεταγραφικών μηχανισμών ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης *in vivo* παρουσιάζει ορισμένες βασικές δυσκολίες, λόγω της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει αυτούς τους μηχανισμούς. Είναι γεγονός ότι οι μηχανισμοί αυτοί σε πολλές περιπτώσεις ρυθμίζονται διαφορετικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και συνεπώς η καθολική έκφρασή τους δυσχεραίνει την μελέτη της ιστοειδικής τους δράσης. Οι *in vivo* μελέτες σε αρκετές από τις πρωτεΐνες αυτές, έχουν δείξει ότι εκτός από τον ιστοειδικό τους ρόλο στον ενήλικο οργανισμό, διαδραματίζουν βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Έτσι τυχόν απορρυθμίσεις στην έκφραση τους μπορούν να οδηγήσουν σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει και στην περίπτωση της πλήρους απαλοιφής της HuR, όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 1.2.3., ενώ στην περίπτωση του AUF1 η πλήρης απαλοιφή του γονιδίου αυτού οδηγεί σε φλεγμονώδεις απορρυθμίσεις. Στην περίπτωση της πλήρους απαλοιφής του AUF1 δεν είναι δυνατόν να διευκρινιστεί το κατά πόσον αυτές οι φλεγμονώδεις απορρυθμίσεις προέρχονται από αλλαγές σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και μόνο. Τα γεγονότα αυτά υποδηλώνουν ότι η μελέτη του *in vivo* ρόλου μιας πρωτεΐνης η οποία συμμετέχει σε μεταμεταγραφικές διαδικασίες, όπως είναι η HuR και ο AUF1, απαιτεί την ύπαρξη καθαρών συσχετισμών μεταξύ των μοριακών αλλαγών που προκαλούνται από την πρωτεΐνη αυτή.

Η μεθοδολογία της *in vivo* μελέτης μετα-μεταγραφικών παραγόντων έγκειται σε κάποιο ιστοειδικό σύστημα τροποποίησης κυττάρων της μυελώδους σειράς με σκοπό την ταυτοποίηση των λειτουργικών τους δράσεων, σε φλεγμονώδεις ή παθολογικές καταστάσεις. Η ανάπτυξη των διαγονιδιακών συστημάτων στα οποία επιτρέπεται η γονιδιακή τροποποίηση σε ιστοειδικό ή/και χρονικά καθορισμένο πλαίσιο (συστήματα επιλεκτικής γονιδιακής τροποποίησης-conditional transgenics), αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της μοριακής βιολογίας για τη μελέτη διαφόρων πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών, όπως η εμβρυογένεση, η φυσιολογία και παθοφυσιολογία των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Η επιλεκτική μεταλλαξιγένεση στους ποντικούς έχει γίνει εφικτή, μέσω του συνδυασμού τεχνικών γονιδιακής στόχευσης και μεταλλαξιγένεσης σε συγκεκριμένη θέση. Το σύστημα μεταλλαξιγένεσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το σύστημα

ανασυνδυασμού cre/loxP (Lewandoski 2001). Με βάση το γεγονός ότι η HuR εμπλέκεται σε διαδικασίες ανάπτυξης αλλά και διαφοροποίησης γαμετικών κυττάρων, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1.2.3 τίθεται το ερώτημα αν μια ιστοειδική απαλοιφή μπορεί να ξεπερνά τα αναπτυξιακά προβλήματα. Στην περίπτωση της ιστοειδικής απαλοιφής της HuR λοιπόν από κύτταρα της μυελώδους σειράς, ποια θα ήταν η επίδραση στους μηχανισμούς διαφοροποίησης των μυελοποιητικών κυττάρων από τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα; και κατά πόσον η παραγωγή των μυелоκυττάρων θα ήταν φυσιολογική; Ακόμη για την εξιχνίαση της εμπλοκής της πρωτεΐνης AUF1 (κεφάλαιο 3.2) σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, κρίνεται αναγκαία η δημιουργία κυττάρων με διαγονιδιακή ιστοειδική απαλοιφή της σε μυелоκύτταρα. Η ανάλυση στο πλαίσιο αυτό εξασφαλίζει την ειδικότητα του συστήματος μελέτης του παράγοντα αυτού.

Ο θετικός ρόλος της πρωτεΐνης HuR κατά την βιοσύνθεση κυττοκινών μελετήθηκε μέσω ενός *in vivo* συστήματος επαγόμενης ιστοειδικής υπερέκφρασης της HuR σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μέσω τετρακυκλύνης (Katsanou et al. 2005). Στο μοντέλο της ιστοειδικής υπερέκφρασης της HuR παρατηρήθηκε, ότι ενώ η ενεργότητα της HuR αυξήθηκε, η ικανότητα των ανοσοαπαντήσεων *ex-vivo* και *in-vivo* μειώθηκε, καθώς οι ποντικοί αυτοί παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε πειραματικά μοντέλα ενδοτοξαιμίας και ηπατίτιδας. Αυτή η αντί-φλεγμονώδης αντίδραση του διαγονιδιακού ποντικού με την υπερέκφραση της HuR, σχετίζεται με την μειωμένη παραγωγή μιας ομάδας φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η HuR σχετίζεται άμεσα με μηνύματα mRNA μακροφάγων που κωδικοποιούν τον TNF, Cox-2 και TGFβ1 αλλά και εμμέσως με την IL1b, επηρεάζοντας την βιοσύνθεσή των πρωτεϊνών τους σε περιπτώσεις ενεργοποίησης των διαγονιδιακών αυτών μακροφάγων. Το ερώτημα που προκύπτει σχετικά με την μελέτη αυτή είναι το κατά πόσον η αντιστροφή των επιπέδων της HuR, δηλαδή η ιστοειδική απώλεια της σε μακροφάγα κύτταρα, θα έχει αντίστοιχη επιρροή στα mRNA των κυττοκινών αυτών, οδηγώντας αντίστοιχα σε φλεγμονώδεις υπεραντιδράσεις κάτω από *in vivo* και *ex vivo* φλεγμονώδη ερεθίσματα.

Στο διαγονιδιακό μοντέλο της υπερέκφρασης της HuR μειώθηκε η μετάφραση αυτών των φλεγμονωδών mRNAs, αν και αυξήθηκε η σταθερότητα των τάξης II ARE mRNAs (TNF και Cox-2). Συνολικά από την μελέτη διαφόρων φλεγμονωδωσυσχετιζόμενων γονιδίων θεωρείται ότι οι λειτουργίες της HuR δεν είναι καθορισμένες και ειδικές για όλα τα μηνύματα, εξαρτώνται από τα στοιχεία ARE των



mRNA στόχων της, και καθορίζονται από το συγκεκριμένο μοτίβο πρόσδεσης της HuR το HBM. Έχει ακόμη αποδειχθεί, μέσω της μυελοειδικής υπερέκφρασης, ότι η HuR προσδένεται στο HBM/ARE του TNF, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του μηνύματος και ταυτόχρονα την μείωση της μετάφρασης του σε μακροφάγα επαγόμενα από LPS. Σε πείραμα απαλοιφής της TIA-1 σε μακροφάγα επαγόμενα με LPS, αναιρείτε η μεταφραστική καταστολή, που επιβάλλεται από την υπερέκφραση της HuR στο mRNA του TNF. Μια πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό, είναι ότι υπάρχει κάποια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ TIA-1 και HuR. Για το λόγο αυτό έχει υποτεθεί, ότι η HuR βοηθά στην κατακράτηση της TIA-1 στο ARE του TNF και μάλιστα, απουσία της, δεν μπορεί να ρυθμίσει σωστά το mRNA του TNF. Είναι λοιπόν καθοριστικής σημασίας για την μεταφραστική καταστολή του TNF μέσω TIA-1 η ύπαρξη της πρωτεΐνης HuR. Εάν εκλείψει ιστοειδικά σε μακροφάγα η πρωτεΐνη HuR, τότε αυξάνεται η μεταφραστική ικανότητα λόγω ελλιπούς προσκόλλησης της TIA-1; υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι ή και άμεσοι τρόποι προσέγγισης της TIA-1 στα mRNA πέραν της HuR μεσολαβούμενης αλληλεπίδρασης για το mRNA του TNF; ή η απουσία της HuR μειώνει συνολικά την μεταφορά του mRNA στα πολυσώματα μειώνοντας έτσι την μεταφραστική ικανότητα;

Από την άλλη, σε πείραμα απαλοιφής της TTP σε μακροφάγα επαγόμενα με LPS, το μήνυμα mRNA του TNF αυξάνει σε σταθερότητα (Carballo et al. 1998). Σε τέτοια μακροφάγα η υπερέκφραση της HuR δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση της σταθερότητας, καθώς δεν υπήρξε μεταβολή στην δεξαμενή μορίων mRNA του TNF (Katsanou et al. 2005). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει, ότι είτε η HuR ανταγωνίζεται με τις αποσταθεροποιητικές λειτουργίες της TTP, είτε η επίδραση της HuR στη σταθερότητα του mRNA του TNF, ξεπερνά σε μέγεθος την επίδραση της TTP. Εάν υπάρχει απλά ανταγωνιστική δράση της πρωτεΐνης HuR τότε η έλλειψη της από τα μακροφάγα θα οδηγούσε σε ισχυρότερη πρόσδεση της TTP και άρα μεγαλύτερη αποικοδόμηση των μηνυμάτων mRNA; ή η απώλεια της δεν θα είχε καμία ανιχνεύσιμη διαφορά γιατί ενδεχομένως τα μηνύματα mRNA θα είχαν μικρότερες δυνατότητες να μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα λόγω της έλλειψης της HuR. Ως συμπέρασμα των πειραματικών διαδικασιών από την υπερέκφραση της HuR προκύπτει για τις HuR, TTP και TIA, ότι υπάρχει μια λειτουργική ιεραρχία κατά την ρύθμιση των τύπου II ARE mRNAs. Η HuR με δράση συντονιστική προσδένει τέτοια mRNAs οδηγώντας τα σε μεταφραστική αποσιώπηση μέσω της TIA1, ενώ εν

συνεχία η επερχόμενη δράση της TTP μετά την απομάκρυνση της HuR μπορεί να αποσταθεροποιήσει τα μηνύματα αυτά (Katsanou et al. 2005).

1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάλυση του βιολογικού ρόλου ριβονουκλεοπρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταμεταγραφική ρύθμιση των mRNA που περιέχουν αλληλουχίες αδεΐνης και ουρακίλης (ARE) και που κωδικοποιούν παράγοντες του στρες και της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα η εργασία επικεντρώθηκε στις δράσεις, πρωτίστως της RBP Elavl1/HuR και δευτερευόντως της RBP hnRNP/AUF1, στον καθορισμό της έμφυτης ανοσίας με εφαρμογή: καινοτόμων μεθοδολογιών διαγονιδιακής απαλοιφής των RBP από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα *in vivo*, πειραματικών προτύπων οξείας φλεγμονής και φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου και μελετών γονιδιακής έκφρασης. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, είναι η ανάλυση του λειτουργικού ρόλου των ριβονουκλεοπρωτεϊνών HuR πρωτίστως αλλά και AUF1:

- Στη διαδικασία της μυελοποίησης
- Στις αντιδράσεις των ώριμων κυττάρων της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης
- Στην ανάπτυξη παθολογικών φλεγμονωδών αντιδράσεων όπως οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντεροπάθειες (ΙΦΕ) συναρτήσει και άλλων ανοσιακών και ιστοειδικών αντιδράσεων.

2. Υλικά και Μέθοδοι



2.1. Γενικά χημικά και αντιδραστήρια

2.1.1. Ειδικά ένζυμα – Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας.

<u>Περιγραφή</u>	<u>Προμηθευτής</u>
Ταq πολυμεράση	MBI
MM-LV αντίστροφη μεταγραφάση	Promega
dNTPs	NEB
Πρωτεΐνάση K	Roche
RQ1 DNase	Promega
RNase A	Sigma
Rnase free-DNase	Promega
DNA Phenol (φαινόλη)	Sigma
DNA Chloroform (χλωροφόρμιο)	Sigma
Αγαρόζη	Invitrogen

2.1.2 Θρεπτικά μέσα – Αντιδραστήρια κυτταροκαλλιέργειας.

<u>Περιγραφή</u>	<u>Προμηθευτής</u>
1X RPMI	Invitrogen
10X RPMI	Invitrogen
Γλουταμίνη	Invitrogen
Fetal Calf Serum	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
2-Μερκαπτοαιθανόλη	Sigma
DMSO	Sigma
Thioglycollate Broth	Invitrogen



2.1.3 Ειδικά πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.

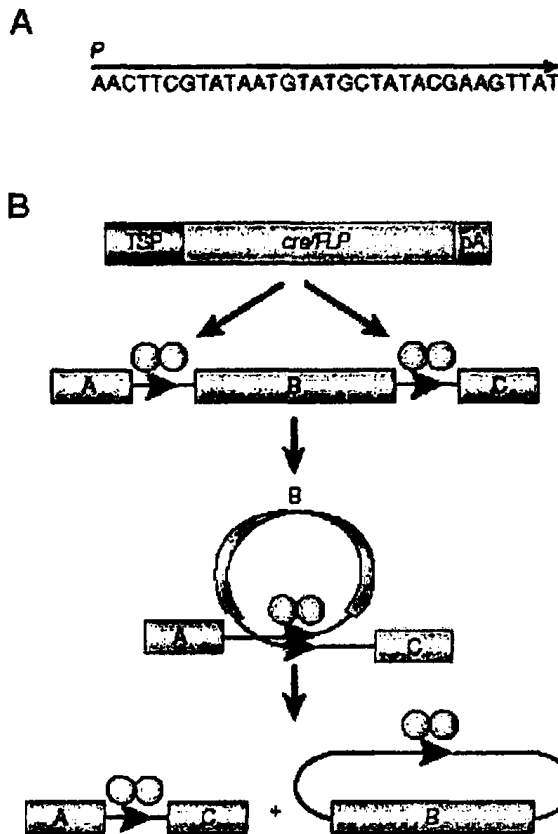
<u>Περιγραφή</u>	<u>Προμηθευτής</u>
Τρυβλία Petri	CORNING
Κωνικοί σωλήνες	FALCON/B&D
Πλάκες 96 φρεατίων	CORNING
Πιπέτες	CORNING
Ειδικά ακρορύγχια	EPPENDORF

2.1.4 Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

<u>Περιγραφή</u>	<u>Προμηθευτής</u>
Φυγόκεντροι	EPPENDORF
Συσκευές ηλεκτροφόρησης	BIORAD
Επωαστικοί κλίβανοι κυτταροκαλλιέργειας	NAPCO
UV transilluminator	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
Κυτταρόμετρο	Coulter
FACS Canto II™	BD biosciences
FACS Vantage SE™	BD biosciences
Real Time PCR	Corbet
Υπερφυγόκεντρος	BECKMAN

2.2. Τεχνολογίες γονιδιακής τροποποίησης στον ποντικό.

Η επιλεκτική μεταλλαξιγένεση στους ποντικούς έχει γίνει εφικτή, μέσω του συνδυασμού τεχνικών γονιδιακής στόχευσης και μεταλλαξιγένεσης σε συγκεκριμένη θέση, χρησιμοποιώντας το σύστημα ανασυνδυασμού cre/loxP, προερχόμενο από τον βακτηριοφάγο P1 (Lewandoski 2001).

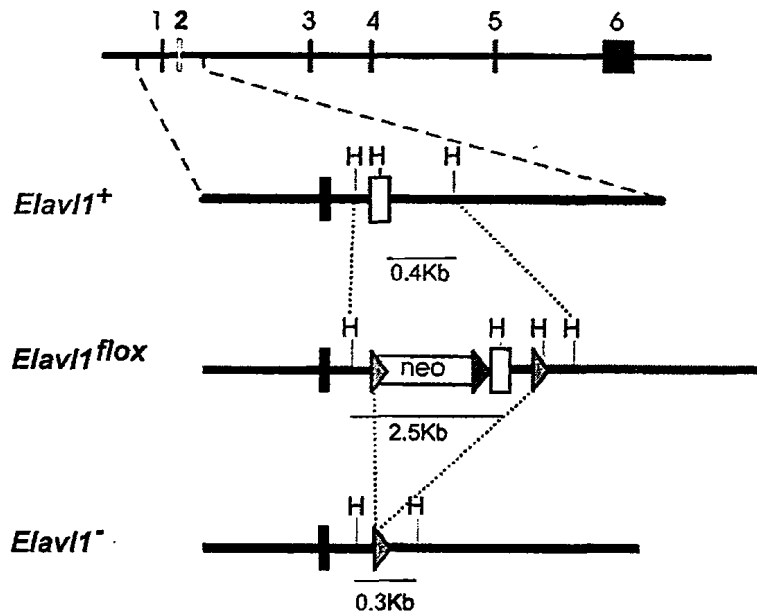


Εικόνα 2.1. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης του ευκαρυωτικού γονιδιώματος με τοποειδικό ανασυνδυασμό- σύστημα Cre/loxP. (A) Η αλληλουχία loxP η οποία έχει συνολικό μήκος 34bp και αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13bp η καθεμία (μαύρο), οι οποίες χωρίζονται από μια κεντρική 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)

Η πρωτεΐνη cre-ρεκομβινάση (Causes Recombination) αποτελεί ένα ανασυνδυαστικό ένζυμο, το οποίο προέρχεται από τον βακτηριοφάγο P1. Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η αποδιάταξη διμερικών πλασμιδίων του φάγου P1, τα οποία δημιουργούνται από «τυχαίο ανασυνδυασμό» κατά την διάρκεια του λυσιγονικού κύκλου του φάγου στα βακτήρια-ξενιστές. Με τον τρόπο αυτό, η Cre επιτυγχάνει τον λειτουργικό διαχωρισμό του φάγου. Ανασυνδυαστικά ένζυμα της κατηγορίας των λιντεγκρασών, όπως η Cre, αναγνωρίζουν και προσδένονται σε ειδικές DNA αλληλουχίες για να πραγματοποιήσουν τον ανασυνδυασμό (Kilby et al. 1993). Στην

περίπτωση της *cre*, οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται loxP (locus of crossing over-x of P1). Ο ανασυνδυασμός επιτυγχάνεται με την εναλλαγή δύο επιμέρους αλυσίδων και την ακόλουθη συγκόλληση τους σε νέα ανασυνδιασμένη μορφή (Shaikh and Sadowski 1997). Οι loxP αλληλουχίες, αποτελούνται από δύο αντίστροφα τμήματα πρόσδεσης της *cre* (13-15 νουκλεοτιδίων) και την κεντρική αλληλουχία σύναψης/αποκοπής (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.2 Η στρατηγική της γονιδιακής στόχευσης *Elavl1* (Katsanou et al. 2009)

Για να επιτευχθεί επιλεκτική απαλοιφή μέσω ανασυνδυασμού του συστήματος *cre/loxP*, οι loxP περιοχές πρέπει πρώτα από όλα να εισαχθούν σε ειδικές θέσεις στο γονιδίωμα του ποντικού, μέσω γονιδιακής στόχευσης (Εικόνα 3.2). Η γονιδιακή στόχευση περιλαμβάνει την εισαγωγή στο χρωμόσωμα 8 του γονιδιώματος του ποντικού, και πιο συγκεκριμένα, πλευρικά του κεντρικού βραχίονα (CA) του γονιδίου *Elavl1* των περιοχών loxP αλλά και του ενζύμου ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (ακετυλοτρανσφεράση της νεομυκίνης) (Katsanou et al. 2009) (Εικόνα 2.2). Επίσης απαιτείται ένθεση του *cre* cDNA, στο ενδογενές M lysozyme γονίδιο του ποντικού ακριβώς στο μεταφραστικό σημείο έναρξης της μετάφρασης, επίσης με τεχνολογία γονιδιακής στόχευσης (Clausen et al. 1999). Μία γενιά ποντικών, θα εκφράσει *cre* σε κύτταρα της μυελώδους σειράς, μέσω της ένθεσης σε συγκεκριμένο σημείο του *cre* cDNA στην ενδογενή M περιοχή (M lysozyme locus) και μέσω της διασταύρωσης τους με ζώα που έχουν την γονιδιακή στόχευση με της περιοχές loxP, προκύπτουν τα επιθυμητά πειραματόζωα. Στα πειραματόζωα αυτά, ταυτόσημη και ειδική ανά

κύτταρικό τύπο έκφραση της *cre* ρεκομβινάσης *in vivo* καθιστά εφικτή την διαγραφή ή την αναστροφή περιοχής που υπάρχει ανάμεσα στις θέσεις loxP. Οι ποντικοί θα εκφράζουν ειδικά την *cre*, κάτω από τον έλεγχο του M γονιδίου της λυσοζύμης σε μονοκύτταρα/μακροφάγα και ουδετερόφιλα, προωθώντας την διαγονιδιακή απαλοιφή της *Elavl1/HuR* στα κύτταρα αυτά.

2.3 Πειραματόζωα- ποντικοί

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.

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες σειρές ποντικών :

<u>Σειρά</u>	<u>Αναφορά</u>	<u>Γενετικό Υπόστρωμα</u>
<i>mf^{ΔARE/+}</i>	Kontoyiannis et al. 1999	C57BL/6
<i>LysM-Cre</i>	Clausen et al. 1999	C57BL/6
<i>Tg632</i>	Katsanou et al, 2005	C57BL/6
<i>Elavl1^{lox/lox}</i>	Katsanou et al, 2009	C57BL/6
<i>Elavl1^{lox/lox}</i>	Katsanou et al, 2009	C57BL/6 129
<i>Sox2Cre - Elavl1^{lox/lox}</i>	Katsanou et al, 2009	C57BL/6
<i>AUF1^{lox/lox}</i>	Sgantzis (unpublished)	C57BL/6

2.4 Ανάλυση γονοτύπου

Η αναγνώριση των διαγονιδιακών ποντικών 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 οι ποντικοί σηματοδοτήθηκαν και από την άκρη της

ουράς κόπηκε 0.5-1 cm όπου προστέθηκαν 0.5 ml διαλύματος TENS και 5 μ l πρωτεΐνάση K. Στην συνέχεια τα δείγματα αναμίχθηκαν ελαφρώς με ανακίνηση και επώαστηκαν για μία ημέρα στους 55°C.

2. Την επόμενη ημέρα προστέθηκε 1 μ l RNase A (10mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.

3. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 500 μ l από την DNA-Phenol και αφού αναδεύτηκαν ισχυρά για 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 13 krpm μέγιστη ταχύτητα. Εν συνεχεία αφαιρέθηκαν περίπου 500 μ l, από την επάνω υδατική φάση με κομμένα ακροϋγχία (tips), για να αποφευχθεί η θραύση του γενομικού DNA. Χωρίς να υπάρξει επαφή με την μεσαία φάση, μεταφέρθηκαν σε καινούργια σωληνάρια.

4. Έπειτα έγινε εκχύλιση με διάλυμα χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1. Προστέθηκαν 350 μ l από χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 σε κάθε σωληνάριο, προκειμένου να αφαιρεθούν τα ίχνη φαινόλης. Αναδεύτηκαν ισχυρά για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στη μικροφυγόκεντρο, με μέγιστη ταχύτητα τα 13 krpm.

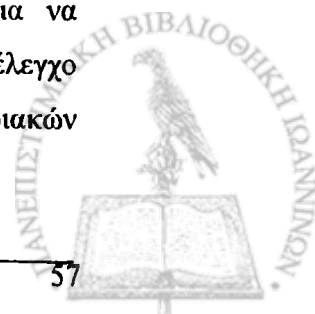
5. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκαν 0.6 όγκοι ισοπροπανόλη. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά μέχρι να σχηματιστεί μια ορατή λευκή μάζα, το DNA, ώστε ήταν δυνατή η απομόνωση με πιπέτες παστέρ.

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 σωληνάρια, που περιέχουν 50-100 μ l 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.

2.4.1. Ανάλυση γονότυπου με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-PCR:

2.4.1.1) Διεκπεραιώθηκε PCR με ειδικούς εκκινητές (LySMS, LySMR) για να ανιχνευθεί η ενσωμάτωση του γονιδίου της ρεκομβινάσης Cre κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της λυσοζύμης (LysMcre⁺), στο γονιδίωμα των διαγονιδιακών

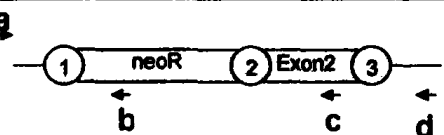


ποντικών. Η πατρική γενιά θα αποτελείται από διασταύρωση ποντικών L^+ με L^- προκειμένου οι απόγονοι να προκύπτουν με ίση πιθανότητα είτε L^+ είτε L^- (πίνακας 2.1).

2.4.2.II) Οι διασταυρώσεις σχεδιάστηκαν ώστε οι γονότυποι της πατρικής γενιάς να είναι $ElavII^{lox/lox}$ με $ElavII^{lox/+}$. Έτσι, στατιστικά το 50% των απογόνων έχουν γονότυπο $ElavII^{lox/lox}$ και το άλλο 50% να έχουν γονότυπο $ElavII^{lox/+}$. Διεκπεραιώθηκε αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction) με ειδικούς εκκινητές (a και d του πίνακα 2.1) για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει το – αλλήλιο (πλήρους απαλοιφής) σε κάποιο από τα ποντίκια. (πίνακας 2.1).

2.4.3.III) Η αντίδραση PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές, αποτελεί μια ημιποσοτική μέθοδο, που είναι σε θέση να αναδείξει όλα τα γεγονότα ανασυνδιασμού του συστήματος $cre/loxP$. Η μέθοδος βασίζεται σε στην επιλογή των κατάλληλων εκκινητών, που στην εικόνα του πίνακα 2.1 αναφέρονται ως a, b, c και d και προσδιορίζεται η θέση τους στην γονιδιακή περιοχή. Τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής δεν αλληλεπικαλύπτονται και για τον λόγο αυτό, μπορούν να παρατηρηθούν όλα τα δυνατά γεγονότα ανασυνδιασμού (πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Αντιδράσεις PCR.

	I) Ανίχνευση της ύπαρξης <i>LysMCre</i> αλληλίου	II) Ανίχνευση του ανασυνδιασμού πλήρους απαλοιφής	III) Ανίχνευση όλων των γεγονότων ανασυνδιασμού
Υλικά και συγκέντρωση	1x PCR buffer 1 mM MgCl 2.5 mM dNTPs mixture 0.5-2 μ M primer set ddH ₂ O 1-5 units Taq polymerase		
Στρατηγική			
Εκκινητές	sense: 5'-CTTGGGCTGCCAG AATTCTC-3' antis: 5'-CAGGTATGCTCA GAAAACGCCT-3'	sense: 5'-GTTCCATGGCTCCC CATATC-3' (a) antis: 5'-TGGCACTCACTGAA CTGGAA - 3' (d)	sense: 5'-GTTCCATGGCTCCCCA TATC-3' (a) antis: 5'-AGCTTTGCAGATTCAA CCTC-3' (c) antis: 5'-TGTCCATCTGCACGAG ACTA-3' (b)

			antis:5'- TGGCACTCACTGAACT GGAA-3' (d)
Πρόγραμμα	LysMcre: 94° C για 1 λεπτό 94° C για 1 λεπτό 50° C για 1 λεπτό 72° C για 1 λεπτό 5 επαναλήψεις 94° C για 30 δεύτερα 45° C για 30 δεύτερα 72° C για 1 λεπτό 25 επαναλήψεις 72° C για 10 λεπτά 16° C για 5 λεπτά Τέλος	KO: 95° C για 5 λεπτά 95° C για 1 λεπτό 56.5° C για 1 λεπτό 72° C για 1 λεπτό και 30 δεύτερα 25 επαναλήψεις 72° C για 10 λεπτά 16° C για 5 λεπτά Τέλος	REC. TOTAL: 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
Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων	Από ζεύγος εκκινητών 74-75: Φυσικού τύπου(L-): 350 bps Μεταλλαγμένο(L+): 350 bps 550 bps	Από ζεύγος εκκινητών a-d: Φυσικού τύπου: 1122 bps Ανασυνδιασμένο: 3214 bps Ανασυνδιασμένο neo-: 1234 bps Πλήρους απαλοιφής(-): 459 bps	Από ζεύγος εκκινητών a-b: Μόνο στα neo: 549 bps Από ζεύγος εκκινητών a-c: Φυσικού τύπου: 442 bps Ανασυνδιασμένο neo-: 485 bps Από ζεύγος εκκινητών a-d: (Όπως περιγράφεται στην αριστερή στήλη.)
Διαχωρισμός προϊόντων	Σε πηκτική αγαρόζης 1,5% *	Σε πηκτική αγαρόζης 1,5% *	Σε πηκτική αγαρόζης 4% *

* Η προετοιμασία της πηκτικής αγαρόζης περιλαμβάνει θέρμανση στερεής αγαρόζης με TBE 1X και την προσθήκη 5% βρωμιούχου αιθιδίου.

Οι ανιχνεύσεις των γονοτύπων των υπόλοιπων γονιδιακά τροποποιημένων ποντικών έγινε με τυποποιημένες συνθήκες PCR όπως έχουν περιγραφεί στις αντίστοιχες δημοσιεύσεις (κεφάλαιο 2.3).

2.5. Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός υποπληθυσμών

Τα κύτταρα επώαστηκαν με δείκτες επιφανείας σε διάλυμα με (PBS +0,2% sodium Azide, +2% FBS) και ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS. Για τους βιοτυνιλωμένους δείκτες επιφανείας ακολούθησε επώαση με δευτερεύοντα αντισώματα στρεπταβιδίνης συζευγμένα με το κατάλληλο φλουορόχρωμα, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Μετά το ξέπλυμα και του δευτερογενούς αντισώματος, όπου υπήρξε χρώση με ενδοκυτταρικά αντιγόνα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με Cytotfix και Cytoperm (BD Biosciences), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για την χρώση με τους δείκτες επιφανείας και τα κύτταρα αναλύθηκαν με το FACS CantoII™. Τα αποτελέσματα αποκτήθηκαν με το λογισμικό FACSDIVA™ (BD Biosciences) και αναλύθηκαν με το FlowJo™ (TreeStar). Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2.2

Πίνακας 2.2 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κυτταρομετρίας

Αντίσωμα	Συζευγμένο Φλουορόχρωμα	Κατασκευαστής	Αραίωση
<i>Lineage (cocktail)</i>	Βιοτίνη (Biotin)	BD Biosciences	1μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>Sca1</i>	A700, FITC	eBiosciensce	1,2μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>c-Kit</i>	PE, PECy7, A750	eBiosciensce	0,6μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD34</i>	PE, FITC	Biolegend, eBiosciensce	2μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD16/32</i>	APC,	eBiosciensce	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>AA4.1</i>	PE	eBiosciensce	0,8μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>IL7R</i>	PECy5	eBiosciensce	0,6μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD45.1</i>	APC-Cy7	eBiosciensce	0,4μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD45.2</i>	A700	eBiosciensce	0,3μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>TER119</i>	APC, Βιοτίνη	eBiosciensce	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD71</i>	PE	Biolegend	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>IgM</i>	FITC	Biolegend	0,2μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD43</i>	Βιοτίνη	Biolegend	0,3μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>Mac1 / CD11b</i>	PE, A648, APC	eBio, BD	0,2μl / 10 ⁶ κύτταρα

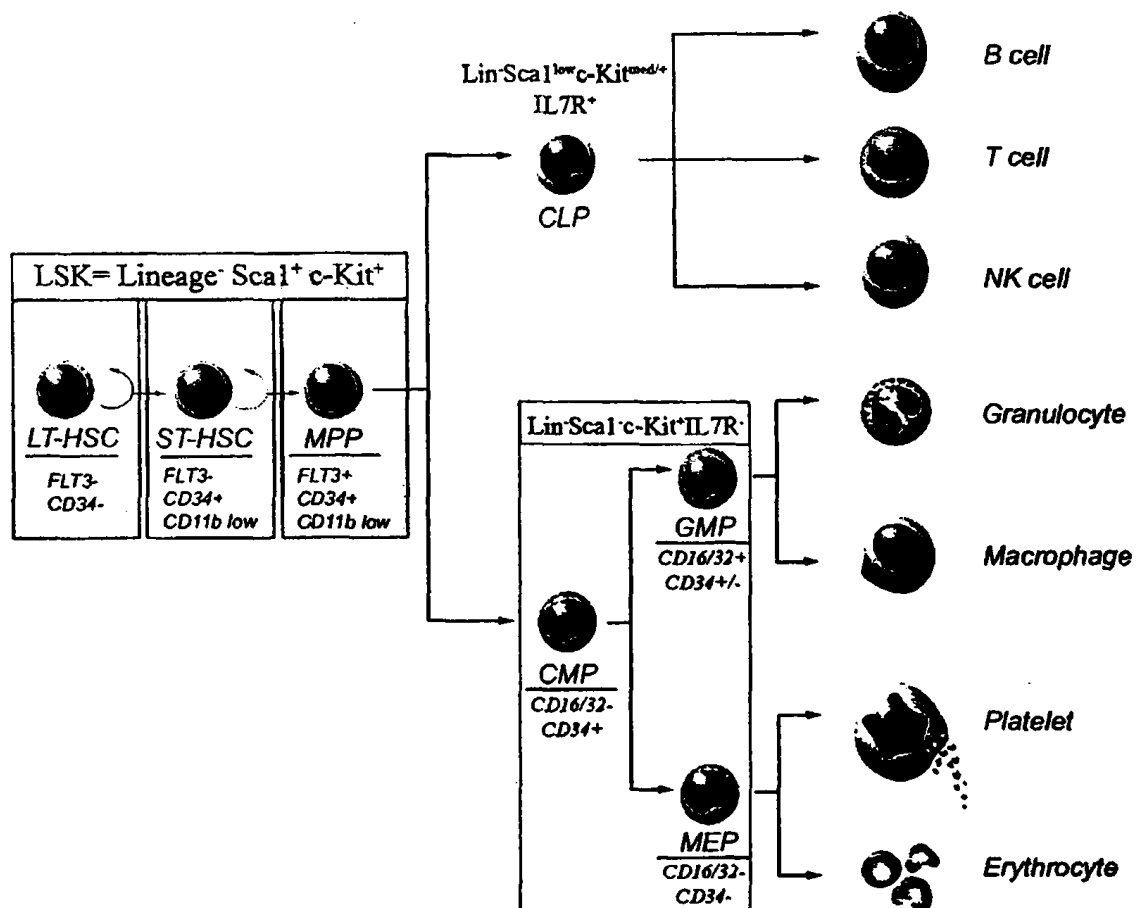
<i>F4/80</i>	FITC	eBiosciensce	0,6μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>Gr1/ Ly6G</i>	PE, PEcy7, FITC	eBio, BD	0,1μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD11c</i>	Βιοτίνη	eBiosciensce	0,3μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>B220</i>	PE-Cy5	BD Biosciences	0,3μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>CD3</i>	APC-Cy7	BD Biosciences	0,3μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>TLR2</i>	APC	eBiosciensce	1μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>TLR3</i>	Polyclonal mIgG	eBiosciensce	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>TLR4</i>	PE-Cy7	eBiosciensce	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>TNF</i>	PE	eBiosciensce	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>HuR</i>	Βιοτίνη	Santa Cruz	0,5μl / 10 ⁶ κύτταρα
<i>AnnexinV</i>	FITC	BD Biosciences	5μl / 10 ⁶ κύτταρα

2.5.1 Η χρώση δεικτών επιφανείας για την ταυτοποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Η πολυδύναμη δράση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων υπάρχει σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του μυελού των οστών, από το οποίο λείπει η έκφραση γενεολογικά σχετιζόμενων δεικτών επιφανείας (Lin ή Lineage) αλλά εκφράζουν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών *Scal* και *cKit* (Ikuta and Weissman 1992; Li and Johnson 1995). Τα *Lin⁻Scal⁺cKit^{high}*, (LSK) κύτταρα αποτελούν το σύνολο των HSCs του μυελού των οστών. Στον πληθυσμό αυτό των LSKs έχουν αναπτυχθεί διάφορα κριτήρια για την απομόνωση υποπληθυσμών πολυδύναμων πρόδρομων κυττάρων. Ο υποπληθυσμός των πρώιμων αυτό-δημιουργούμενων HSCs με μακροπρόθεσμη ενεργότητα αιμοποιητικής επαναδημιουργίας (LT-HSCs) ορίζεται ως το *CD34⁻* κλάσμα του LSK πληθυσμού (Morrison and Weissman 1994). Το κλάσμα *CD34⁺* αντιστοιχεί σε υποπληθυσμούς ικανούς μόνο για παροδική αιμοποιητική επαναδημιουργία και ως εκ τούτου περιέχει HSCs με βραχυπρόθεσμη ενεργότητα αιμοποιητικής επαναδημιουργίας (ST-HSCs) ή πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (MMPs) (Osawa et al. 1996; Randall et al. 1996)

Επειδή ο LSK πληθυσμός περιέχει όλα τα πολυδύναμα προδρομικά κύτταρα περιλαμβάνοντας LT-HSCs, ST-HSCs, και MMPs, προγονικοί πληθυσμοί με γενεολογικό περιορισμό παρατηρούνται μόνο έξω από το κλάσμα LSK. Οι CLP είναι πρώιμοι πληθυσμοί που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 7 (IL-7R),

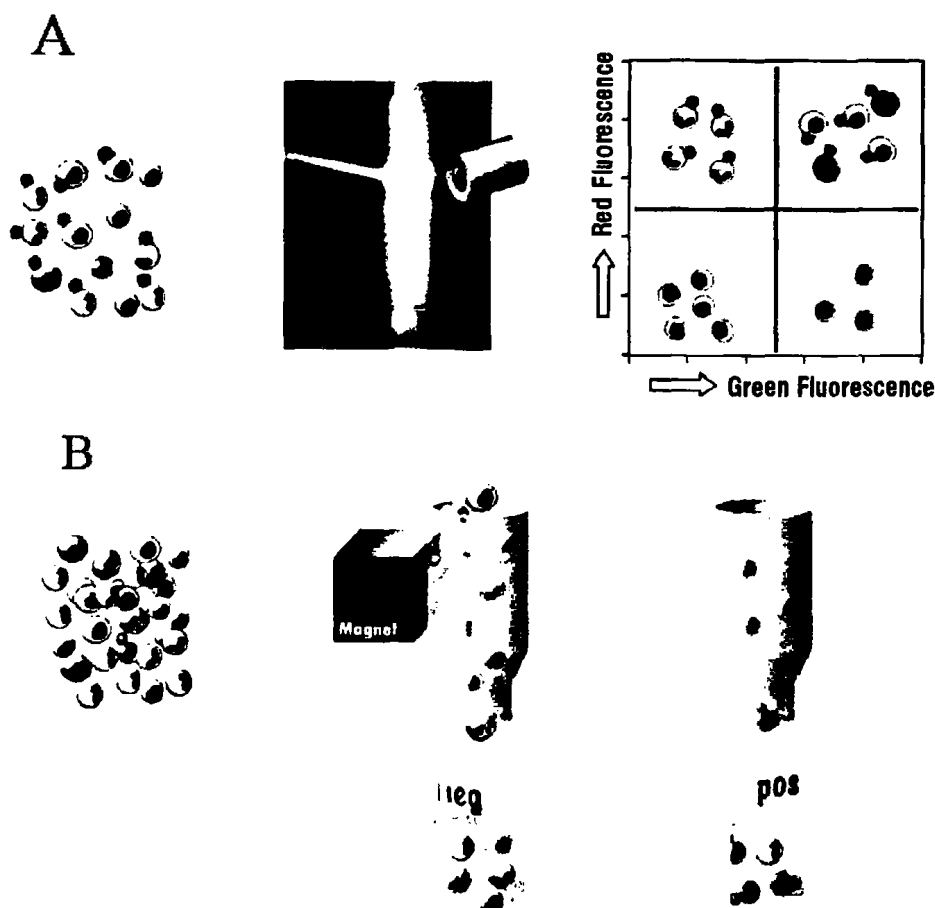
μα κυττοκίνη απαραίτητη για την δημιουργία T και B κυττάρων (Peschon et al. 1994; Bhatia et al. 1995). Το κλάσμα $IL-7Ra^+$ συγκεντρώνει την δυνατότητα δημιουργίας λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών και τα κύτταρα $IL-7Ra^+c-Kit^{lo}Lin^-Sca1^{lo}$ έχουν υψηλή CLP ενεργότητα χωρίς να υπάρχει ενεργή διαφοροποίηση προς μυελοκύτταρα και ερυθροκύτταρα. Τα κύτταρα CMP είναι $IL-7Ra^-$ και δεν αποτελούν μέρος του LSK πληθυσμού. Το κλάσμα $IL-7Ra^-cKit^{+}Lin^{-}Sca1^{-}$, το οποίο κατέχει άνω από 98% του σχηματισμού μυελοειδικών και ερυθροειδικών αποικιών από κύτταρα μυελού των οστών και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με βάση την έκφραση FcγRII και FcγRIII (FcγRII/III) και CD34. Τρεις διακριτοί υποπληθυσμοί μυελοειδικών προγόνων έχουν χαρακτηριστεί: ο $FcγRII/III^{lo}CD34^+$ ως CMPs, ο $FcγRII/III^{lo}CD34^-$ ως προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων (MEPs), και ο $FcγRII/III^{hi}CD34^+$ ως προγονικά κύτταρα ουδετερόφιλων και μακροφάγων (GMPs) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Ο Συνδυασμός των δεικτών επιφανείας με σκοπό την ταυτοποίηση ή/και τον διαχωρισμό, όλων των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

2.5.2 Πειράματα διαχωρισμού κυττάρων

Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα αντιγόνα επιφανείας όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.6.1 και διαχωρίστηκαν με κυτταρομετρεία ροής (Εικόνα 2.4.A) με τη χρησιμοποίηση του FACS Vantage SE™ (BD Biosciences). Τα κύτταρα που επωάστηκαν με το βιοτυνιλωμένο μείγμα αντισωμάτων Lineage που περιλαμβάνει τα αντισώματα (CD3, B220, Mac1, Gr1, TER119) διαχωρίστηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Εικόνα 2.4.B), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BD Biosciences). Στην περίπτωση διαχωρισμού των προγονικών LIN⁻ κυττάρων του εμβρυικού συκωτιού δεν χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα το αντίσωμα Mac1 καθώς η χαμηλή του έκφραση στα προγονικά κύτταρα του εμβρυικού συκωτιού θα εμπόδιζε την ορθή απομόνωση τους.



Εικόνα 2.4 Διαχωρισμός κυττάρων μέσω (Α) Κυτταρομετρείας ροής και (Β) Μαγνητικής απομόνωσης

2.5.3. Πειράματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων κυττάρων

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου *in vivo* χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) σε εγκύους ποντικούς ηλικίας 14 ημερών 200μl 5mg/ml BrdU (Sigma) και τα ζώα θυσιάστηκαν μετά από 4 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν $5-10 \times 10^6$ κύτταρα του εμβρυικού συκωτιού, στα οποία αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι επιθυμητές χρώσεις για τους δείκτες επιφάνειας. Ακολούθησε μονιμοποίηση με Cytotfix (BD) για 1 ώρα στον πάγο (4°C) και επωάστηκαν τελικά με FastImmune αντι-BrdU με DNase (BD) για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά ακολούθησε η χρώση για το DNA, με σκοπό την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, με 7αμινοακτινομυκίνη (7AAD) (5μg/ml, Sigma) και τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Η 7 αμινοακτινομυκίνη δεν ξεπλύθηκε από τα κύτταρα και μετά από 15' επώασης μετρήθηκε σε γραμμικό άξονα.

2.5.4. Πειράματα ανίχνευσης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης

Χρησιμοποιήθηκαν $5-10 \times 10^6$ κύτταρα του εμβρυικού συκωτιού, στα οποία αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι επιθυμητές χρώσεις για τους δείκτες επιφάνειας. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν σε PBS και επωάστηκαν για 30' με το αντίσωμα AnnexinV-FITC (αποπτωτικός δείκτης). Αφού ξεπλύθηκαν, ακολούθησε μονιμοποίηση σε διάλυμα 70% αιθανόλης για τουλάχιστον 2 ώρες στους -20°C . Ξεπλύθηκαν σε PBS 3 φορές και επωάστηκαν με RNase A για την πέψη του RNA εξασφαλίζοντας ότι η επερχόμενη χρώση αφορά μόνο το DNA. Τέλος προστέθηκαν στα κύτταρα 200μl Propidium Iodide (PI) 50μg/ml και αναλύθηκαν για το κυτταρικό τους κύκλο με κυτταρομετρία ροής.

2.6 Πείραμα εποικισμού και ανταγωνιστικού εποικισμού

Κύτταρα μυελού των οστών απομονώθηκαν από το μηρό/κνήμη αρσενικών ποντικών ηλικίας 6-8 εβδομάδων CD45.1 (ανταγωνιστής), αλλά και από CD45.2 εμβρυικό συκώτι από τους *Sox2Cre-Elavl^{flax}* (έμβρυα φυσικού τύπου) και από τους CD45.2 *Sox2Cre-Elavl^{flax/φλαχ}* (έμβρυα με απαλοιφή της HuR). Η αντιπροσώπευση των πρόδρομων κυττάρων μυελού των οστών και εμβρυικού συκωτιού ήταν παρόμοια μεταξύ των γονοτύπων όπως μετρήθηκαν με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Μετά από

την απομόνωση, 10^6 κύτταρα σε αναλογία 1: 2 για τα έμβρυα φυσικού τύπου και 1: 1 για τα έμβρυα με την απαλοιφή της HuR από κάθε γονότυπο ενέθηκαν ενδοφλεβίως σε ακτινοβολημένους (1000 GY) αρσενικούς ποντικούς CD45.1 RAGI^{-/-} αντίστοιχης ηλικίας. Ο έλεγχος της επανασύστασης των αιμοποιητικών οργάνων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι ποντικοί θυσιάστηκαν μετά από την ηλικία των 8 εβδομάδων για την εκτίμηση των ποσοστών CD45.1/CD45.2 στο μυελό των οστών και τα περιφερικά όργανα. Τα αντίστοιχα ποσοστά CD45.2 ομαλοποιήθηκαν σε σχέση με τα CD45.1 και εκφράστηκαν ως αναλογία CD45.2 τεστ/CD45.2ελέγχου.

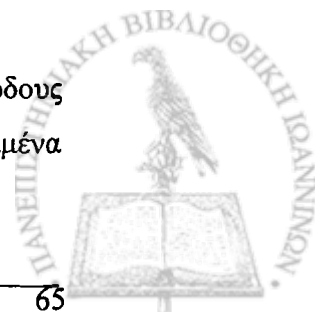
2.7. Κυτταροκαλλιέργειες ex-vivo

- 2.7.1. Πειράματα σχηματισμού αποικιών *in vitro* παρουσία κυττοκινών.

Κύτταρα μυελού των οστών ή του εμβρυικού συκωτιού απομονώθηκαν και αφού διαχωρίστηκαν στους κατάλληλους προγονικούς υποπληθυσμούς ανάλογα με την ανάγκη του πειράματος επώαστηκαν για 12 ημέρες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο μεθυλοσελουλόζης. 1000 περίπου κύτταρα ανά πείραμα επώαστηκαν εις τριπλούν στο θρεπτικό υλικό Methocult της εταιρίας Stem Cell Technologies συμπληρωμένο με τις επιθυμητές κάθε φορά κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Το θρεπτικό μέσο προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η καλλιέργεια στον επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37° C και 5% CO₂, διήρκησε από 10 έως 14 ημέρες, ανάλογα την πυκνότητα των σχηματιζόμενων αποικιών. Οι αποικίες μετρήθηκαν και παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά και για την περίπτωση όπου επανακαλλιεργήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες, μονές αποικίες σηκώθηκαν και επεξεργάστηκαν με την ίδια διαδικασία. Για την ταυτοποίηση του είδους των κυττάρων στις αναπτυσσόμενες αποικίες χρησιμοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής με κατάλληλους δείκτες επιφανείας αλλά και χρώση Giemsa σε Cytospin πλακίδια με τα κύτταρα των αποικιών.

2.7.2. Απομόνωση μακροφάγων από τον μυελό των οστών (MMO)

Ο μυελός των οστών περιέχει ένα πλήθος από πρόδρομα κύτταρα της μυελώδους σειράς, τα οποία παρουσία των κατάλληλων ερεθισμάτων και συγκεκριμένα



παρουσία του παράγοντα CSF-1 ή L-Medium, διαφοροποιούνται και μετατρέπονται σε μακροφάγα. Τα παραγόμενα κύτταρα, αντιπροσωπεύουν ώριμα μακροφάγα των ιστών και της περιφέρειας. Σε αντίθεση με τα ΕΜΠ, η παραγωγή των μακροφάγων δεν επηρεάζεται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών, γίνεται αποκλειστικά *in vitro* (Warren and Vogel 1985) και έτσι δεν επηρεάζεται ούτε από την κατάσταση του ζώου (π.χ. αν αυτό παρουσιάζει φλεγμονή) ούτε βασίζεται στην παρουσία εξωγενών, μη φυσιολογικών ουσιών.

Διαδικασία:

1. Ποντικοί ηλικίας 6-10 εβδομάδων θανατώθηκαν με ασφυξία μέσω ξηρού πάγου. Σχίστηκε το δέρμα των ζώων και κόπηκαν τα πόδια τους. Αφού αφαιρέθηκαν οι μύες από το οστό κόπηκαν τμήματα μηριαίου οστού μήκους 1cm μεταξύ των αρθρώσεων (tibia και femur) και συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά universals με PBS 1X για κάθε γονότυπο.
2. Η διαδικασία συνεχίστηκε, αφού μαζεύτηκαν όλα τα femur και tibia (άνω και κάτω τμήματα των ποδιών του ποντικού), σε θάλαμο νηματικής ροής για να υπάρχουν αποστειρωμένες συνθήκες. Για να αποστειρωθούν τα κομμένα μέρη, αφέθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα σε αποστειρωμένη 70% αιθανόλη και έπειτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο που περιείχε αποστειρωμένο PBS.
3. Χρησιμοποιώντας σύριγγες ινσουλίνης και θρεπτικό μέσο RPMI ασκήθηκε πίεση κατά μήκος του αυλού, μέχρι που ο μυελός ωθήθηκε έξω από τον αυλό. Τα διάφορα τμήματα του μυελού περισυλλέχθηκαν και μετατράπηκαν σε μονοκύτταρο εναιώρημα μετά από πολλαπλά περάσματα μέσα από βελόνες διαμετρήματος 26G. Το εναιώρημα συλλέχθηκε σε σωλήνες κωνικού πυθμένα (15ml) και ο όγκος ανοίχθηκε στα 10 ml.
4. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκαν προσθέτοντας Geys medium με σκοπό την αφαίρεση των ερυθροκυττάρων. Φυγοκεντρήθηκαν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκαν σε RPMI fixed.
5. Επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για πλύση και τέλος επαναδιάλυση σε 20 ml RPMI με 20% L-medium. Ο M-CSF επάγει διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελώδους σειράς σε μακροφάγα. Στρώθηκαν σε τρυβλία βακτηριακού τύπου και τα τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα σε συνθήκες 37° Κελσίου με 5% CO₂ για 2 ημέρες.
6. Κάθε 3 ημέρες το θρεπτικό μέσο αλλάζεται με φρέσκο. Η διαδικασία διαφοροποίησης γίνεται αντιληπτή με την παρουσία προσδεδεμένων κυττάρων

στον πυθμένα των τρυβλίων. Αυτό οφείλεται στην επαγωγή μορίων πρόσδεσης των μακροφάγων κατά την διαφοροποίηση, όπως του μορίου επιφανείας Mac-1. Επειδή η πρόσδεση σε κανονικά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας πολυστηρενίου δεν είναι εύκολα αναστρέψιμη, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία βακτηριακού τύπου (10cm^2). Έτσι όταν τα κύτταρα πλησίασαν σε συνθήκες κορεσμού, διαχωρίστηκαν μηχανικά με απόξεση.

7. Η επώαση διήρκεσε 10-12 ημέρες, μετά το πέρας της οποίας η πλειονότητα των κυττάρων βρισκόταν στην προσδεδεμένη φάση της καλλιέργειας. Τα κύτταρα στην συνέχεια αποκολλήθηκαν μηχανικά. Σε κάθε πιάτο προστέθηκε 5 ml από το διάλυμα αποκόλλησης και αφού επώαστηκαν τα κύτταρα για 5 λεπτά στον επωαστήρα, ανακατεύτηκαν με μηχανικές κινήσεις για να ξεκολλήσουν. Μεταφέρθηκαν σε σωλήνα (falcon) χωρητικότητας 15 ml και προστέθηκαν άλλα 5ml RPMI. Αφού φυγοκέντρηθηκαν και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml RPMI.
8. Ακολούθησε τέλος στρώση των κυττάρων στην κατάλληλη πυκνότητα. Για την απομόνωση υπερκειμένων από καλλιέργειες μακροφάγων για ποσοτικούς προσδιορισμούς πρωτεΐνης, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 24 φρεατίων κυτταροκαλλιέργειας και σε πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα/φρεάτιο. Για την χρήση των κυττάρων για την απομόνωση RNA, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία πολυστηρενίου (10 cm^2) κυτταροκαλλιέργειας και σε πυκνότητα 2×10^7 κύτταρα/τρυβλίο.

2.7.3. Καλλιέργειες Εκλυόμενων Περιτοναϊκών Μακροφάγων (ΕΜΠ)

Τα εκλυόμενα περιτοναϊκά μακροφάγα (elicited-peritoneal macrophages) αποτελούν έναν πειραματικά διαφοροποιημένο κυτταρικό τύπο, ο οποίος αντιπροσωπεύει τα φλεγμονώδη μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά δημιουργούνται μετά από έκθεση περιφερικών μονοκυττάρων σε εξωγενή ερεθίσματα, όπως το βακτηριακό θρεπτικό μέσο Thioglycollate Broth. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά έχουν τη μέγιστη ικανότητα παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών.

Διαδικασία:

1. Παρασκευάζεται διάλυμα 4% Thioglycollate (TG) σε PF-ddH₂O μετά από βρασμό και αποστείρωση. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4° C σε μη διαπερατές από φως φιάλες, διότι είναι φωτοευαίσθητο και διάσπαση των περιεχόμενων ουσιών του



οδηγεί στην απελευθέρωση ριζών οξυγόνου, που μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα.

2. 1 ml TG χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά σε ποντικούς ηλικίας 8 εβδομάδες και άνω.

3. Μετά από 3 ημέρες, οι ποντικοί θανατώνονται και τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας συλλέγονται με έκχυση και απορρόφηση 5 ml θρεπτικού μέσου RPMI-5. Κατά την διαδικασία αποφεύγεται ο τραυματισμός αιμοποιητικών οργάνων (π.χ. σπλήνα και ήπατος), για την αποφυγή διαρροής ερυθροκυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Επιπλέον, αποφεύγεται ο τραυματισμός του γαστρεντερικού σωλήνα, λόγω της πιθανής μόλυνσης με βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου.

4. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 1000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C και κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml RPMI.

5. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας και επωάζονται (σε κλίβανο 37° C, 5% CO₂) για μία ώρα. Το αρχικό περιτοναϊκό έκχυμα εμπεριέχει 90% μακροφάγα, 2%-3% ουδετερόφιλα, 2% εωσινόφιλα, 1% ιστιοκύτταρα και 2% με 3% λεμφοκύτταρα. Κατά την διάρκεια της επώασης μόνον τα μακροφάγα προσκολλούνται στον πυθμένα του τρυβλίου. Μετά το πέρας της επώασης, τα μη προσκολλημένα κύτταρα αφαιρούνται με έκπλυση και η τελική καλλιέργεια εμπεριέχει μακροφάγα σε ποσοστό 99%.

2.7.4. Καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών με τον GM-CSF

Το πρωτόκολλο διαφοροποίησης κυττάρων μυελού των οστών σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα είναι ίδιο και με αυτό του κεφαλαίου 2.7.2 με την μοναδική τροποποίηση ότι αντί για M-CSF από L-medium χρησιμοποιήθηκε recombinant mouse πρωτεΐνη GM-CSF. Ο gmGM-CSF χρησιμοποιήθηκε σε δοσολογία 10ng/ml και μπορεί να δώσει μακροφάγα και ουδετερόφιλα στο τέλος του πειραματικού πρωτοκόλλου απομόνωσης.

2.8. Απομόνωση πειραματικού υλικού in vitro

2.8.1 Ερεθισμός με προσδέτες των Toll like υποδοχέων

Από την συνολική κυτταροκαλλιέργεια στρώθηκαν σε 24αρια πιάτα για συλλογή υπερκειμένων πυκνότητας 5×10^5 κύτταρα/φρεάτιο, σε δάρια πιάτα για πρωτεΐνες

πυκνότητας 1 έως 5×10^6 κύτταρα/τρυβλίο και σε 10 cm^2 πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 1 έως 2×10^7 κύτταρα για την απομόνωση RNA. Σε κάθε πείραμα ερεθισμού που διενεργήθηκε ένα μικρός αριθμός MMO κυττάρων (10^5), χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA, με σκοπό την ταυτοποίηση των επιπέδων απαλοιφής της HuR στα μακροφάγα.

1. Διέγερση των κυττάρων με LPS για την απομόνωση RNA

Προστέθηκαν 100 ng/ml LPS στα πιάτα για RNA και συλλέχθηκαν (με trizol) μετά από 0, 2 και 6 ώρες από την διέγερση. Το χρονικό σημείο μηδέν, συμβολίζει τα κύτταρα που δεν έχουν διεγερθεί καθόλου από LPS αλλά παρέμειναν για 6 ώρες σε απλό θρεπτικό μέσο (RPMI+5%FBS).

2. Διέγερση των κυττάρων με LPS, Zymosan και pI:C για απομόνωση υπερκειμένων.

Προστέθηκαν 100 ng/ml LPS των 10μg/ml Zymosan και 25μg/ml pI:C για χρονικές - επωάσεις 12 ώρες και 24 ώρες, ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και καταψύχθηκαν. Μετά την συλλογή των υπερκειμένων, τα κύτταρα που είχαν μείνει στον πάτο μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη για 15' και αφού βαφτήκαν με την χρωστική Crystal Violet μετρήθηκαν σε φωτόμετρο στα 450nm. Η μέτρηση των κυττάρων συσχετίστηκε με τις μετρήσεις των εκκρινόμενων κυτταροκινών για την διόρθωση των τελικών τιμών της.

3. Διέγερση των κυττάρων με LPS για την απομόνωση πρωτεϊνών.

Προστέθηκαν 100 ng/ml LPS στα 6αρια πιάτα για πρωτεΐνες και συλλέχθηκαν μετά από 0, 30', 2 ώρες και 6 ώρες από την διέγερση. Η συλλογή έγινε απευθείας σε διαλύματα λύσης των κυττάρων που βοηθούν την απομόνωση πρωτεϊνών.

2.8.2. 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 ήδη σχηματιζόμενων mRNA καθώς δεν είναι δυνατόν να παραχθούν καινούργια. Μακροφάγα διαφοροποιημένα *in vitro* από μυελό των οστών χρησιμοποιήθηκαν και ερεθίστηκαν με LPS 100ng/ml για 2 ώρες. Στην συνέχεια 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.

2.8.3. Διαχωρισμός μονοριβοσωμικού και πολυριβοσωμικού κλάσματος mRNA με υπερφυγοκέντρηση σε διαβάθμιση σουκρόζης.

Πολυσωμικό διάλυμα: [15mM Tris pH 7.4, 15mM MgCl₂, 0,3M NaCl, 1% Triton-X 100, 100 µg/ml Cycloheximide (Κυκλοεξαμίδιο), 1ng/ml Heparin (Ηπαρίνη)]

Διαδικασία:

Δημιουργήθηκε η διαβάθμιση σουκρόζης από 20% περιεκτικότητα σουκρόζης έως 50% περιεκτικότητα σουκρόζης σε πολυσωμικό διάλυμα. Αφού παρασκευάστηκαν οι αραιώσεις 20%, 27,5%, 35%, 42,5% και 50% σουκρόζης αναμείχθηκαν προσεκτικά στο σωληνάκι της υπερφυγοκέντρησης με τοποθέτηση 900µl κάθε διαλύματος, ξεκινώντας από το βαρύτερο. Η διαβάθμιση σουκρόζης επιτεύχθηκε μετά από διάχυση των διαλυμάτων αφήνοντας τα για 12 ώρες στους 4° C. 10⁷ έως 3x10⁷ κύτταρα μακροφάγων διαφοροποιημένα από μυελό των οστών χρησιμοποιήθηκαν αφού λύθηκαν στο πολυσωμικό διάλυμα. Μικρό ποσοστό των λυμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση συνολικού RNA ως θετικού πειραματικού μάρτυρα. Μετά από φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm στους 4° C για 10' τα υπερκείμενα (κυτταροπλασματικό κλάσμα) φορτώθηκαν στα σωληνάκια με την διαβάθμιση σουκρόζης. Ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση στις 45.000 rpm για 2 ώρες στους 4° C. Με το τέλος της υπερφυγοκέντρησης προσεκτικά διαχωρίστηκαν 24 κλάσματα από 200µl. Το RNA μετρήθηκε σε 96 well plate reader στα 260nm σε πιάτο UV. Η μέτρηση όπως και ο διαχωρισμός τους σε πηκτή 1,5%αγαρόζης σε TBE αποκάλυψαν τον επιτυχή διαχωρισμό των κλασμάτων. Ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με γουανιδίνιο-HCL και αιθανόλη και τα κλάσματα RNA αναμείχθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο εάν είναι μονοριβοσωμικά ή βρίσκονται δεμένα στα πολυριβοσώματα (πολυριβοσωμικό κλάσμα).

2.8.4. Διάλυμα λύσης παρουσία πρωτεΐνάσης K για απομόνωση DNA.

Η απομόνωση DNA γίνεται με τον ίδιο τρόπο, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.3.1

2.8.5. Laemmly buffer για την απομόνωση πρωτεϊνών.

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

Διαδικασία:

Τα κύτταρα από την κυτταροκαλλιέργεια επεξεργάστηκαν κατάλληλα προκειμένου να απομονωθούν πρωτεΐνες από αυτά.

1. Προστέθηκε διάλυμα για λύση της κυτταρικής μεμβράνης, με 10% β-μερκαπτοαιθανόλη για διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών.
2. Υπέρηχοι (Sonication) 15'' σε πάγο για λύση του DNA.
3. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4° C και μεταφέρθηκε το υπερκείμενο που θα περιείχε τις πρωτεΐνες
4. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20° C.

2.8.6. Απομόνωση RNA με Trizol.

- 1. Προστέθηκε 500μl trizol ανά πηγάδι ή ίζημα κυττάρων και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - 2. Προστέθηκε 100μl χλωροφόρμιο, αναδεύτηκαν με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 με 3 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 12000g στους 4° C
 - 3. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάριο και αφού προστέθηκε 250μl ισοπροπανόλη επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - 4. Φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 12000g στους 4° C
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml 75% αιθανόλης αραιωμένη σε DEPC νερό. Φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 7500g στους 4° C και αραιώθηκαν σε νερό DEPC.

2.9. Ανάλυση του πειραματικού υλικού με βιοχημικές μεθόδους

2.9.1. Στύπωμα κατά Western

Το στύπωμα κατά Western περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτή με SDS και την μεταφορά τους σε φύλλο νιτροκυτταρίνης. Στο στάδιο αυτό ακολουθούν διαδικασίες προσκόλλησης αντισωμάτων στη μεμβράνη μέσω επώασης, με σκοπό την ανίχνευση του σήματος τους με χημικές μεθόδους.



A) Παρασκευή πηκτής SDS-PAGE:

Χρησιμοποιήθηκε περιεκτικότητα της τάξεως του 12%:

Resolving	Stacking
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

B) Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε SDS-page πηκτή.

Ενδεικτική ποσότητα πρωτεϊνών, 5 µl από κάθε δείγμα αναμίχθηκαν με 2 µl βρωμοφαινόλη. Στην συνέχεια τα δείγματα με την βρωμοφαινόλη, πριν φορτωθούν στη πηκτή υπέστησαν διαδικασία βρασμού για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν σε 11000 στροφές για 1 λεπτό στους 4° C. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν για 80 µε 90 λεπτά, στα 120 volt.

Γ) Χρώση της πηκτής με χρωστική (Coomasie blue) για ποσοτικοποίηση.

Η πηκτή τοποθετήθηκε σε πλαστική συσκευασία, που περιείχε μπλε χρωστική (Coomasie Blue) για 20 περίπου λεπτά και έπειτα αφαιρέθηκε και προστέθηκε διάλυμα αποχρωματισμού. Η αντίδραση με την πηκτή πραγματοποιήθηκε για όλο το βράδυ, προκειμένου να συμβεί αποχρωματισμός μόνο της μη ειδικής πρόσδεσης της χρωστικής.

Δ) Μονιμοποίηση της πηκτής.

Την επόμενη ημέρα η πηκτή προσκολλήθηκε σε ένα απορροφητικό χαρτί (wattman), χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή 80° C για μία ώρα. Από την ένταση των ζωνών ποσοτικοποιήσαμε ώστε να φορτωθούν ίσες ποσότητες πρωτεϊνών.

Ε) Μεταφορά πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης.

Η διαδικασία του διαχωρισμού επαναλήφθηκε (διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή SDS), όπως στο κεφάλαιο 2.9.1.B με φορτωμένες σωστά αυτή την φορά τις ποσότητες.



Μόλις τελείωσε το τρέξιμο, η πηκτή μεταφέρθηκε σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) και κόπηκαν μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και απορροφητικά χαρτιά στο μέγεθος της πηκτής. Αφού διαποτίστηκαν με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), τοποθετήθηκαν σε διάταξη σε ειδική συσκευή (semidry blotter), ώστε να είναι εφικτή η μεταφορά στο φύλλο. Η συσκευή απαιτεί τάση της τάξης των 15-20 volt για 30 λεπτά, σύμφωνα με οδηγίες κατασκευαστή. Η μεταφορά των πρωτεϊνών, διαπιστώνεται με χρώση της μεμβράνης με μια κόκκινη χρωστική (poncaeu).

Ζ) Προσκόλληση αντισωμάτων στην μεμβράνη.

Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και προστέθηκε διάλυμα σταθεροποίησης (blocking), αφήνοντας την αντίδραση για τουλάχιστον 1 ώρα. Το διάλυμα σταθεροποίησης αφαιρέθηκε και αφού η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS 1X, προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα, με αραίωση σύμφωνα με το κεφάλαιο 2.9.1.I, 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. Προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα, με αραίωση σύμφωνα με το κεφάλαιο 2.9.1.I, σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA, το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο. Η επώαση έγινε για 1 ώρα και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS 1X, το οποίο περιέχει 0.1% Tween για την απομάκρυνση και του δεύτερου αντισώματος.

Η) 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% υπεροξείδιο υδρογόνου

4.750 ml H₂O

Η διαδικασία της εμφάνισης σε φιλμ πραγματοποιήθηκε απουσία φωτός (στο dark room), 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, αφού τα φιλμ τοποθετήθηκαν κατά σειρά σε ειδικά διαλύματα εμφάνισης και αφού ξεπλύθηκαν με νερό.

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 αυτοραδιογραφία, ήταν το Image Quant 5.0.

Θ) Απομάκρυνση αντισωμάτων.

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 εκτελέστηκαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PBS 1X, 0.1% Tween. Τέλος αφαιρέθηκε το διάλυμα πλύσης και προστέθηκε διάλυμα σταθεροποίησης (blocking), αφήνοντας την διεξαγωγή αντίδρασης για τουλάχιστον 1 ώρα. Με τον τρόπο αυτό η μεμβράνη ήταν σε θέση να εμφανιστεί για διαφορετική πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας φυσικά τα κατάλληλα αντισώματα.

I) Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι αραιώσεις τους:

Πρωτεΐνες	1° αντίσωμα	2° αντίσωμα
HuR	Mouse IgG1 (Santa Cruz - 3A2), σε αραιώση 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
Cox-2	Rabbit IgG (Cayman) σε αραιώση 1:1000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-rabbit IgG (Santa Cruz) σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA

pP38	Rabbit IgG (Cell Signaling – Thr180/182), σε αραιώση 1:1000 σε διάλυμα TBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA	Goat, anti-rabbit IgG (Santa Cruz), 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), σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS 1X με 0.05% Tween, 1% BSA
pJNK	Mouse IgG1 (Santa Cruz – G7), σε αραιώση 1:500 σε διάλυμα TBS 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
JNK	Goat IgG (Santa Cruz), σε αραιώση 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
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), σε αραιώση 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 1:2000 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

2.9.2 Ανίχνευση εκκρινόμενων κυττοκινών με την μέθοδο του ανοσοθοροτισμού

Για τη μέτρηση των επιπέδων του εκκρινόμενου TNF σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών ή σε ορό αίματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος «sandwich» ELISA κατά την οποία η πρωτεΐνη κατακρατείται από μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF και ανιχνεύεται με αντίστοιχο πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση. Η ευαισθητοποίηση της πλάκας 96 οπών πολυστυρενίου γίνεται με 100 μ l/ οπή διαλύματος PBS που περιέχει αντί-TNF αντίσωμα σε συγκέντρωση 3 μ g/ml για την ανίχνευση του TNF ποντικού (TN3, Celltech). Η πλάκα επώάζεται 14-16 ώρες στους 4°C. Ακολουθεί κορεσμός των περιοχών του πλαστικού που δεν έχουν καλυφθεί κατά την ευαισθητοποίηση με αντίσωμα, με διάλυμα 1% BSA (αλβουμίνη βοδιού) σε PBS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τον κορεσμό, αφαιρείται το διάλυμα αλβουμίνης και τοποθετούνται τα δείγματα και διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων αναφοράς ξεκινώντας από συγκέντρωση 10ng/ml και φτάνοντας ως 0.156 ng/ml TNF ποντικού. Οι αραιώσεις των δειγμάτων υπερκείμενων κυτταροκαλλιέργειών γίνονται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και το κάθε δείγμα εκπροσωπείται σε δύο οπές. Η μικροπλάκα επώαστηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλένεται 3 φορές με διάλυμα 0.1% Tween20 σε PBS (και ακολουθεί μία ώρα επώαση με αντίσωμα έναντι του TNF (ανεπτυγμένο σε κουνέλι) σε διάλυμα 0.1% BSA σε PBS και σε συγκέντρωση 1 μ g/ml (Dr W. Buurman, University of Limburg, The Netherlands). Η μικροπλάκα πλύθηκε 3 φορές με 0.1% Tween20 σε PBS (για την ανίχνευση TNF ποντικού μόνο) και η επώαση συνεχίζεται με αντίσωμα έναντι σε ανοσοσφαιρίνες τύπου G (IgG) κουνελιού που έχει αναπτυχθεί σε αίγα και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση σε συγκέντρωση 2 μ g/ml. Η επώαση διαρκεί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλάκα ξεπλένεται 3 φορές με 0.1% Tween20 σε PBS. Σε σκοτεινό μέρος τοποθετούνται 100 μ l ανά οπή διαλύματος φαινυλενοδιαμίνης (OPD) (0.04mg/ml OPD σε κιτρικό διάλυμα 0.05M, pH:5, όπου την τελευταία στιγμή προστίθεται υπεροξείδιο του οξυγόνου (H_2O_2) σε τελική συγκέντρωση 0.03%). Η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος 2N H_2SO_4 (50 μ l/οπή). Η απορρόφηση μετριέται στα 450nm σε φωτόμετρο μέτρησης μικροπλακών.

Για την μέτρηση των εκκρινόμενων επιπέδων των IL6, IL10, TGF β 1 και IL12p70 χρησιμοποιήθηκαν οι τυποποιημένες διαδικασίες του κατασκευαστή eBioscience

2.9.3. Ανάλυση RNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).

Η μοναδική ικανότητα του ενζύμου-πολυμεράσης, αντίστροφη μεταγραφάση RT (reverse transcriptase) να συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA), με βάση ένα RNA καλούπι, επιτρέπει σε συνδυασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), την ανίχνευση και την απομόνωση ειδικών mRNA, ακόμα και όταν η πηγή του RNA είναι περιορισμένη ή το προς εξέταση μεταγράφημα αντιπροσωπεύεται σε χαμηλές ποσότητες στον ολικό πληθυσμό RNA ενός ιστού. Στο παρακάτω πρωτόκολλο χρησιμοποιείται η RT από τον ρετροϊό Moloney Leukaemia (MMLV-RT). Για τις αντιδράσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε διαφορετικά υδατόλουτρα - είτε θερμικός κυκλοποιητής:

1. Σε μικροσωληνίδιο 0.5ml 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 κατακρήμνιση των cDNA προϊόντων με προσθήκη 1/10 5M NaCl και 2 όγκων αιθανόλης

6. Τα ιζήματα επανεωρήθηκαν σε 50-100μlς ddH₂O και ήταν έτοιμα για αντιδράσεις PCR.

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, με την παραπάνω μέθοδο απομονώθηκαν cDNA από ολικό RNA κυττάρων για την ανίχνευση μεταγραφημάτων TNF IL6, IL10, IFN γ , TGF β 1, και COX-2 με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ανιχνεύθηκαν επίσης μεταγραφήματα από τα μη επαγόμενα γονίδια B2M, GAPDH και L32 (πίνακας 2.3).

Η κάθε αντίδραση PCR εμπεριείχε 1-2 μl cDNA, εκκινητές σε συγκέντρωση 0,25 pg και το μείγμα SYBRGreen της εταιρίας INVITROGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για κάθε δείγμα υπήρχαν τουλάχιστον 3 βιολογικά αντίγραφα και για κάθε βιολογικό αντίγραφο 3 τεχνικά αντίγραφα στην αντίδραση.

Πίνακας 2.3 . Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδια	Αλληλουχία Εκκινητή (5' - 3')	*Συνθήκη Υβριδισμού (°C)	Μήκος (bp)
TNF	S: GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG	55	220
	AS: ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG		
IL6	S: CTT CTT GGG ACT GAT GCT GGT GAC	57	337
	AS: TCC AGG TAG CTA TGG TACT CC AGA		
IL10	S: CCA GTA CAG CCG GGA AGA	51	251
	AS: ATT TCT GGG CCA TGC TTC TC		
IFN γ	S: GGG CGG ACT TCA AGA TCC TA TGG	58	231
	AS: GCA GTT GAG GAC GAC ATC TCC CAC		
TGF β 1	S: TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	51	170
	AS: GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC		
COX2	S: TCA GTT TTT CAA GAC AGA TC	51	197
	AS: TCT CT ACCT GAG TGT CTT TG		
B2M	S: TTC TGG TGC TTG TCT CAC TGA	58	180
	AS: CAG TAT GTT CGG CTT CCC ATTC		
GAPDH	S: TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	61	145
	AS: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG		
L32	S: TTA AGC GAA ACT GGC GGA AAC	60	150
	AS: TTG TTG CTC CCA TAA CCG ATG		

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε κοινές συνθήκες *(εκτός της συνθήκης υβριδισμού) με βάση τον ακόλουθο κύκλο επώασης:

1. 50° C για 2 λεπτό
2. 95° C για 10 λεπτά
3. 95° C για 30 δευτερόλεπτα
4. * Συνθήκη Υβριδισμού για 15 δευτερόλεπτα
5. 72° C για 20 δευτερόλεπτα
6. 40 επαναλήψεις ξεκινώντας από το βήμα 3
7. 70° C έως 98° C ανεβαίνοντας κατά 0,5° C κάθε δευτερόλεπτο

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την μέθοδο ΔCt και την χρήση ειδικού λογισμικού ανάλυσης της BIORAD και της Corbet.

2.10. *In vivo* μοντέλα ανάπτυξης παθολογίας

2.10.1. Το μοντέλο της πειραματικής σηπτικής καταπληξίας με LPS.

Η πειραματική σηπτική καταπληξία περιλαμβάνει την συστηματική απελευθέρωση κυτταροκινών, όπως ο TNF και η IL1b, μετά από χορήγηση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών ενδοπεριτοναϊκά. Η απελευθέρωση των κυτταροκινών αυτών προκαλεί διάταση των αγγείων και απώλεια όγκου πλάσματος, που οφείλεται στην αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, οδηγώντας τελικά σε σηπτική καταπληξία (shock). Προκαλεί επίσης διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, οδηγώντας στην δημιουργία μικροθρομβώσεων και την κατανάλωση των πρωτεϊνών της πήξεως, με αποτέλεσμα να χάνεται η ικανότητα πήξης του αίματος. Αυτό με την σειρά του οδηγεί σε βλάβη των ζωτικών οργάνων, όπως οι πνεύμονες, οι νεφροί, το ήπαρ και η καρδιά, τα οποία λόγω ανεπαρκούς αιματικής ροής οδηγούν σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Ziegler-Heitbrock et al. 1995). Το πείραμα αυτό περιλαμβάνει την ένεση δόσης LPS από 0,8mg έως 1,2mg/25g βάρους σε ποντικούς. Χρησιμοποιήθηκε για την αραιώση PBS 1X, ενώ οι ενέσεις έγιναν στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα των ποδιών των ποντικών. Τα ζώα ζυγίστηκαν και υπολογίστηκε η ακριβής ποσότητα LPS ανά 25g βάρους που ενέθηκε. Από την στιγμή της ένεσης υπήρξε παρακολούθηση κάθε 24 ώρες, για το πόσοι και από ποια ομάδα γονότυπου ποντικοί απεβίωσαν. Η παρακολούθηση διήρκεσε 7 ημέρες, καθώς μετά την πάροδο μιας εβδομάδας, οι

οργανισμοί που επιβίωσαν είχαν ξεπεράσει πλήρως την μόλυνση και δεν κινδύνευαν περαιτέρω.

2.10.2. Το μοντέλο ανάπτυξης χημικά επαγόμενης φλεγμονώδης κολίτιδας με DSS.

Η ανάπτυξης χρόνιας φλεγμονής μπορεί να επαχθεί χημικά στο έντερο. Το DSS είναι ένα πολυανιονικό πολυσακχαρητικό παράγωγο της δεξτράνης το οποίο χρησιμοποιείται ως ανοσό-ενισχυτικός παράγοντας και ενεργοποιεί τα Β-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Όταν χορηγείται στο πόσιμο νερό, προκαλεί αλλαγές στο φράγμα του εντερικού επιθηλίου με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μακροφάγων από τη συμβιωτική μικροχλωρίδα του εντερικού αυλού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανοσολογική υπεραντίδραση ενάντια στα εισβαλόμενα παθογόνα από τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας. Η ανεπαρκής αντιφλεγμονώδης δράση προσομοιάζει ιδιοπαθείς φλεγμονώδης νόσους του εντέρου και ιδιαίτερα την ελκώδη κολίτιδα. Αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο και ευρέως διαδεδομένο μοντέλο κολίτιδας στο ποντικό (Okayasu et al. 1990). Η κύρια επίδραση του μοντέλου αυτού ειδικά στις χαμηλότερες δόσεις (1-5%) είναι στο παχύ έντερο ξεκινώντας από το κόλον και προς τα πίσω, όπου παρατηρείται διάβρωση και φλεγμονή. Η ασθένεια έχει δύο φάσεις στο μοντέλο αυτό, την οξεία φλεγμονώδη απόκριση που διαρκεί από την τρίτη μέχρι την έβδομη ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου και την χρόνια απόκριση ή/και τη φάση επανάπλασης στο τέλος της εφαρμογής του πρωτοκόλλου. Η οξεία φλεγμονώδη απόκριση περιλαμβάνει την καταστροφή των κρυπτών και ανάλογα την σοβαρότητα της απόκριση την απώλεια της επιφάνειας του επιθηλίου. Η φάση επανάπλασης αρχίζει μετά την απομάκρυνση του παράγοντα DSS και περιλαμβάνει την επαναδημιουργία του εντερικού βλενογόννου. Εάν δεν καταστεί δυνατή η επανάπλαση τότε παρατηρούνται χαρακτηριστικά της χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης.

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει την χορήγηση DSS στο πόσιμο νερό για 7 ημέρες και την ιστολογική τους παρατήρηση στο τέλος του πρωτοκόλλου την 12^η με 14^η ημέρα. Ο δείκτης ενεργότητας της νόσου υπολογίζεται με μακροσκοπικές παρατηρήσεις των ποντικών, όπως μέτρησης βάρους, σύστασης των κοπράνων και αιμάτωσης των κοπράνων όπως περιγράφεται στον πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4. Δείκτης Ενεργότητας της Νόσου

Δείκτης ενεργότητας της νόσου	Απώλεια βάρους	Σύσταση κοπράνων	Αίμα στα κόπρανα
0	0-1%	Φυσιολογικά	Αρνητικό
1	1-5%		
2	6-10%	Μαλακά	Θετικά
3	11-15%		
4	>15%	Διάρρεια	Αιμάτωση του πρωκτού

Ο ιστολογικός δείκτης υπολογίζεται με ιστολογικές παρατηρήσεις που αφορούν την βαρύτητα της φλεγμονής, την έκταση της, την βλάβη των κρυπτών και την επί τοις εκατό εμπλοκή στο σύνολο του παχέως εντέρου, όπως συνοψίζεται στον πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5. Ιστολογικός Δείκτης

Μέτρηση	Δείκτης	Περιγραφή
Βαρύτητα φλεγμονής	0	ανύπαρκτη
	1	ελαφριά
	2	μεσαία
	3	ακραία
Έκταση φλεγμονής	0	Ανύπαρκτη
	1	Στο βλενογόνο
	2	Στο βλενογόνο και στο υποβλενογόνο
	3	Σε όλο τον ιστό
Βλάβη των κρυπτών	0	Ανύπαρκτη
	1	βλάβη στο 1/3 των κρυπτών
	2	βλάβη στα 2/3 των κρυπτών
	3	Απώλεια κρυπτών / Ανέπαφη επιφάνεια επιθηλίου
	4	Απώλεια κρυπτών / Απώλεια επιφάνειας επιθηλίου
Επί τοις εκατό εμπλοκή	0	0%
	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%
	4	76-100%

2.10.3 Το μοντέλο ανάπτυξης χρόνιας ΙΦΝΕ, ο γεννητικά τροποποιημένος $TNF^{\Delta ARE/+}$ ποντικός.

Στους $tnf^{\Delta ARE/+}$ ποντικούς, η απουσία των AREs οδηγεί σε απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου της έκφρασης του tnf γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν χρόνια υπερπαραγωγή TNF η οποία ανιχνεύεται στον ορό του αίματος (Kontoyiannis et al. 1999). Η χρόνια υπερπαραγωγή TNF οδηγεί στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής ειδικά στον τελικό ειλεό και στην ανάπτυξη φλεγμονώδους αρθρίτιδας. Στους $tnf^{\Delta ARE/+}$ ποντικούς η παθολογία στον τελικό ειλεό εμφανίζεται σε ηλικία μεταξύ 8 και 10 εβδομάδων και φτάνει σε πλήρη ανάπτυξη μετά την ηλικία των 4 μηνών. Τα βασικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την πεπλάτυνση των λαχνών και την ανάπτυξη φλεγμονής στο βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που συγκεντρώνονται στο βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο είναι πολυμορφοπύρρηνα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα τα οποία σχηματίζουν λεμφικές συγκεντρώσεις κυττάρων ή και κοκκιώματα. Η φλεγμονή μπορεί να εξελιχθεί σε διατοιχωματική, διαπερνώντας σε πολλά σημεία του ιστού, με ακανόνιστο και όχι συνεχές πρότυπο, τη μυϊκή στιβάδα του εντέρου (Kontoyiannis et al. 2002). Οι ποντικοί αυτοί αποτελούν πειραματικό μοντέλο ανάπτυξης χρόνιας εντερικής φλεγμονής και προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανθρώπινη νόσο του Crohn με την διηθηματική παρουσία τυπικών οιδημάτων.

2.10.3.1 Ιστολογική και ανοσοιστοχημική εκτίμηση της φλεγμονής στους $TNF^{\Delta ARE}$ ποντικούς

Έντερα από τον $TNF^{\Delta ARE}$ απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε τομές παραφίνης. Μετά από χρώση αιμοτοξυλίνης και εοσίνης βαθμονομήθηκαν για χαρακτηριστικά οξείας και χρόνιας φλεγμονής ξεχωριστά. Μετρήθηκαν σε 8 δυναμικά πεδία (δ.π.) χρησιμοποιώντας μια ημιποσοτική μέθοδο βαθμονόμησης του δείκτη δραμύτητας, όπως περιγράφεται στον πίνακα 2.6

Πίνακας 2.6. Δείκτες δριμύτητας φλεγμονής

Δείκτης Δριμύτητας	Οξεία Φλεγμονή	Χρόνια Φλεγμονή
0	0-1 Πολυμορφοπύρρηνα / δ.π.	0-10 Μονοπύρρηνα Λευκοκύτταρα / δ.π.
1	2-10 Πολυμορφοπύρρηνα / δ.π.	11-20 Μονοπύρρηνα Λευκοκύτταρα / δ.π.
2	11-20 Πολυμορφοπύρρηνα / δ.π.	21-30 Μονοπύρρηνα Λευκοκύτταρα / δ.π.
3	21-30 Πολυμορφοπύρρηνα / δ.π.	31-40 Μονοπύρρηνα Λευκοκύτταρα / δ.π.
4	>30 Πολυμορφοπύρρηνα / δ.π.	>40 Μονοπύρρηνα Λευκοκύτταρα / δ.π.

Στην περίπτωση της οξείας φλεγμονής τα πολυμορφοπύρρηνα παρατηρούνται κυρίως στο εντερικό βλεννογόνο στους χαμηλούς δείκτες, ενώ στους υψηλότερους παρατηρούνται και κάτω από την μυϊκή στοιβάδα του εντέρου. Αντίστοιχα σε χρόνια φλεγμονή τα λευκοκύτταρα παρατηρούνται και κάτω από την μυϊκή στοιβάδα στους υψηλούς δείκτες, ενώ παρατηρούνται και σε θυλακοειδής υπερπλασίες όταν ο δείκτης φθάνει το 4.

2.11. Μέθοδοι απομόνωσης και ανάλυσης του In vivo πειραματικού υλικού

2.11.1 Ιστολογική ανάλυση

Οι ιστοί μονιμοποιούνται σε διάλυμα 10% φορμαλίνης, 0.15 M PBS, pH:7.4, για περισσότερο από 24 ώρες. Ακολουθεί αφυδάτωση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης και εγκλεισμός σε παραφίνη. Κόπηκαν 5-7 μm τομές σε μικροτόμο παραφίνης και προσκολλώνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι τομές τοποθετήθηκαν για 1-4 ώρες σε θερμοκρασία 37°C μέχρι να στεγνώσουν. Η αποπαραφίνωση γίνεται με εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλένιου, δύο φορές για 10 λεπτά και σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτισεις σε διαδοχικά μειωμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (από 100% προς 50%). Ακολούθησε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Οι χρωματισμένες τομές αφυδατώθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, εμβαπτιστήκαν σε ξυλένιο, καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και μονιμοποιήθηκαν με DPX.

2.11.2 Απομόνωση ορών του αίματος από τους $TNF^{ARE/+}$ ποντικούς και από ποντικούς που έχει χορηγηθεί LPS.

Οι ποντικοί με την γεννητική τροποποίηση $TNF^{ARE/+}$ και φυσιολογικοί ποντικοί 90' μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση με LPS *in vivo* θυσιάστηκαν και από την καρδιά τους συλλέχθηκε περίπου 500μl αίματος. Αφού το αίμα έπηξε στους 4° C σε σωληνάκια χωρητικότητας 1,5 ml εισήλθε μια γυάλινη πιπέτα παστέρ, η οποία έσπασε την επιφάνεια από το πηγμένο αίμα. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1200 rpm για 20' στους 4° C και ακολούθησε μια δεύτερη φυγοκέντρηση στα 2000 rpm για 20' στους 4° C. Τα υπερκείμενα (διαφανής ορός του αίματος) συλλέχθηκαν και ψύχθηκαν στους -80° C έως ότου χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανίχνευσης ανοσοφθορισμού.

2.12. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση για την στατιστική διαφορά μεταξύ των τιμών της πρωτεΐνης και του mRNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο *unpaired Student's t-test*. Τα αποτελέσματα με τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικά.

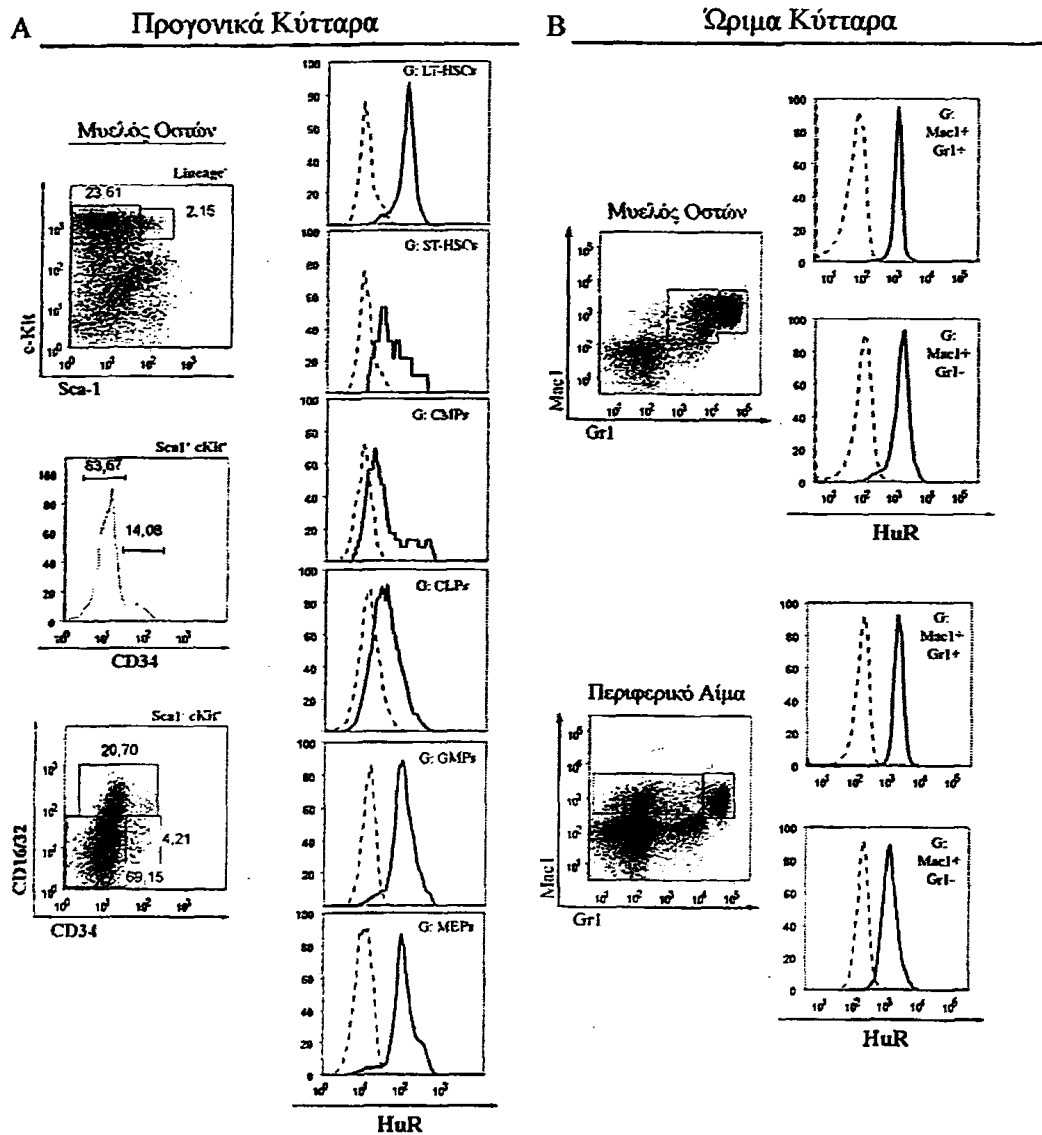
3. Αποτελέσματα

3.1. Ο ρόλος της HuR στη μυελοποίηση και την ανάπτυξη των κυττάρων της έμφυτης ανοσολογικής αντίδρασης

3.1.1 Τα επίπεδα έκφρασης της HuR αυξάνονται κατά τη μυελοποίηση και το σύνολο της αιμοποίησης

Στα ενήλικα θηλαστικά, η αρχική ανάπτυξη των περισσότερων ανοσολογικών κυτταρικών υποπληθυσμών τελείται στον μυελό των οστών. Για να αποσαφηνίσουμε εάν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της HuR και της ανάπτυξης των ανοσολογικών κυττάρων, επιχειρήσαμε να ανιχνεύσουμε διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης HuR κατά την διαδικασία της αιμοποίησης με την εφαρμογή πρωτοκόλλων κυτταρομετρίας ροής. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1Α, τα επίπεδα της HuR είναι υψηλά στα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα που έχουν χαμηλό δυναμικό αυτοανανέωσης (LT-HSC), ενώ μειώνονται κατά τη μετάβαση τους σε πολλαπλασιαζόμενα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (ST-HSC). Τα μειωμένα επίπεδα της HuR διατηρούνται και στο πρώτο κεντρικό στάδιο της διαφοροποίησης, δηλαδή στα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα (CMP) και στα αρχέγονα λεμφικά κύτταρα (CLP), αλλά αυξάνονται στα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης και στα προγονικά δεσμευμένα κύτταρα των σειρών των μονοκυττάρων/κοκκιοκυττάρων (GMP) και μεγακαρυοκυττάρων/ερυθροκυττάρων (MEP). Τέλος στα ώριμα λειτουργικά κύτταρα της μυελοποιητικής σειράς τόσο στον μυελό των οστών όσο και του περιφερικού αίματος τα επίπεδα της HuR παραμένουν υψηλά (Εικόνα 3.1Β). Η ανάλυση μας δεν επεκτάθηκε στα ώριμα κύτταρα της λεμφικής σειράς μιας και αυτά διαφοροποιούνται περαιτέρω στα λεμφικά όργανα και οι αλλαγές στα επίπεδα της HuR σχετίζονται με τις επιμέρους αλλαγές στην ωρίμανση τους (Paradaki et al. 2009).

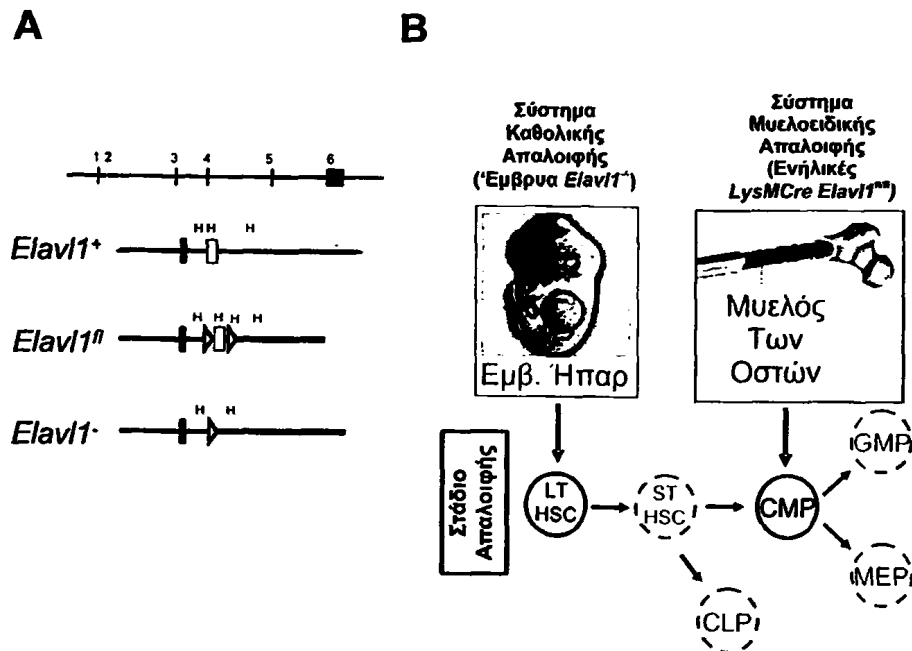
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι περισσότερες αλλαγές στη έκφραση της HuR σχετίζονται με τη μετάβαση από τα αρχέγονα στα προγονικά και στα πρόδρομα κύτταρα. Οι παρατηρήσεις αυτές συνδέουν τις ενδεχόμενες δράσεις της HuR τόσο με τη ρύθμιση της αυτοανανέωσης των αρχέγονων κυττάρων όσο και με την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων, η οποία προκαλείται από την επίδραση αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών.



Εικόνα 3.1. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης HuR σε φυσιολογική κατάσταση. (Α) Ανάλυση κυταρομετρίας ροής σε Lineage⁺ κύτταρα όπου Lin-Sca1+cKit+CD34⁺ ο υποπληθυσμός LT-HSCs, Lin-Sca1+cKit+CD34⁺ ο υποπληθυσμός ST-HSCs, Lin-Sca1-cKit+CD16/32-CD34⁺ ο υποπληθυσμός CMPs, Lin-Sca1-cKit+CD16/32⁺ ο υποπληθυσμός GMPs και Lin-Sca1-cKit+CD16/32-CD34⁺ ο υποπληθυσμός MEPs. Στη δεξιά στήλη απεικονίζονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης HuR σε κάθε έναν από τους αιμοποιητικούς αυτούς προγονικούς υποπληθυσμούς του μυελού των οστών. Η διακεκομμένη γραμμή των ιστογραμμάτων αντιστοιχεί στη χρώση με το ισουτυπικό αντίσωμα της HuR το mIgG1-Biotin **(Β)** Ανάλυση κυταρομετρίας ροής σε ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα της περιφέρειας όπου Mac1+Gr1⁺ τα ουδετερόφιλα, Mac1+Gr1⁻ τα μονοκύτταρα.

3.1.2 Συστήματα αιμοποιητικής και μυελοειδικής απαλοιφής της πρωτεΐνης HuR.

Για να ταυτοποιήσουμε τον πιθανό ρόλο της HuR στην αιμοποίηση, επικεντρωθήκαμε σε συστήματα πειραματικής της απαλοιφής. Στο παρελθόν είχαμε δημιουργήσει διαγονιδιακά συστήματα καθολικής και ιστοειδικής αποσιώπησης του γονιδιωματικού τόπου της HuR στον ποντικό (*Elavl1*) με βάση την αφαίρεση του 2^ο εξωνίου το οποίο περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (Katsanou et al. 2009). Η καθολική απαλοιφή της HuR από το έμβρυο του ποντικού (*Elavl1*^{-/-}) προκαλεί θνητότητα μετά το στάδιο της γαστριδίωσης λόγω προβλημάτων στην ανάπτυξη του πλακούντα, του σκελετού, του πνεύμονα και του σπλήνα, αλλά το βασικό εμβρυϊκό όργανο αιμοποίησης, δηλαδή το εμβρυϊκό ήπαρ, φαίνεται να αναπτύσσεται κανονικά (Katsanou et al, 2009). Συνεπώς η αιμοποιητική ικανότητα των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων μπορούν να μελετηθούν με βάση το εμβρυϊκό ήπαρ. Ταυτόχρονα, η προηγούμενη δημιουργία ενός μεταλλαγμένου γονιδιωματικού τόπου (*Elavl1*^{fl}) επιλεκτικής τροποποίησης με χρήση του συστήματος τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP (Katsanou et al. 2009; Papadaki et al. 2009) επιτρέπει την απαλοιφή της HuR σε συγκεκριμένα στάδια της αιμοποιητικής διαδικασίας. Επειδή: (α) η μυελοποίηση αποτελεί μια διαφοροποιητική διαδικασία η οποία ολοκληρώνεται ως επί το πλείστον στις αρχικές θέσεις αιμοποίησης και δεν απαιτείται μετανάστευση όπως στην περίπτωση των λεμφοποιητικών κυττάρων και (β) τα κύτταρα της μυελώδους σειράς αποτελούν τη βάση των κυττάρων της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης και για το λόγο αυτό επιλέξαμε να εφαρμόσουμε και ένα σύστημα μυελοειδικής απαλοιφής μέσα από τη διασταύρωση των ποντικών *Elavl1*^{fl} με ποντικούς που εκφράζουν διαγονιδιακά το ένζυμο ανασυνδυασμού Cre στα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα υπό την καθοδήγηση του υποκινητή της Λυσοζύμης M (*LysM-Cre*, Clausen et al. 1999; Ye et al. 2003). Για την απλοποίηση των συντημήσεων των γονοτύπων, στην συνέχεια της παρούσας διατριβής οι πειραματικοί ποντικοί *LysMCre Elavl1*^{fl} θα αναφέρονται ως *MCre*⁻ ενώ οι ετερόζυγοι ποντικοί μάρτυρες *LysMCre Elavl1*^{fl/+} ως *MCre*⁺. Η σύγκριση των δύο συστημάτων μας επιτρέπει να διαφοροποιήσουμε το ρόλο της HuR στα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα έναντι των μυελοειδών κυττάρων (Εικόνα 3.2).



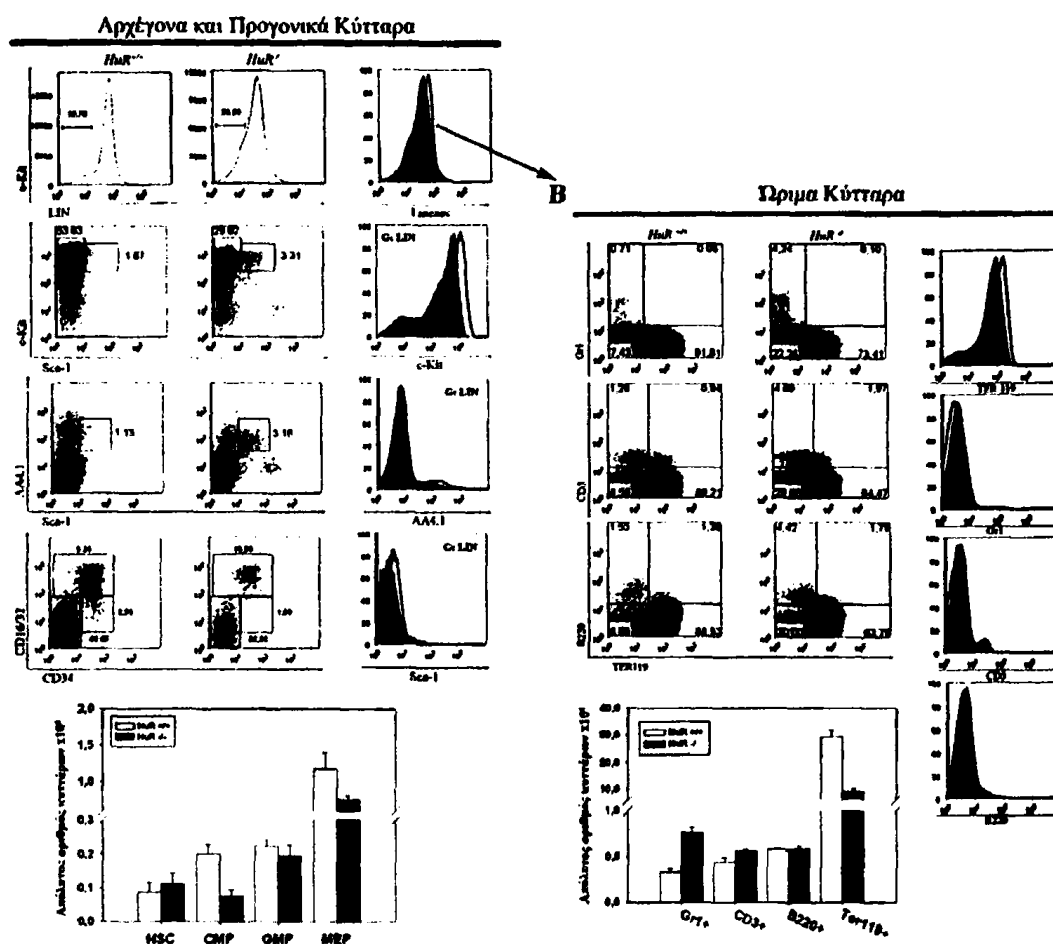
Εικόνα 3.2. Στρατηγική ανάλυσης του ρόλου της HuR στην αιμοποίηση. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση του φυσικού γονιδιωματικού τύπου (*Elavl1*⁺), του τύπου που φέρει loxP αλληλουχίες σε γειτνίαση με το εξώνιο 2 (*Elavl1*^{fl}) και του απενεργοποιημένου τύπου μετά την έκφραση του Cre (*Elavl1*⁻) (Β) Στάδια απαλοιφής της HuR στο ήπαρ εμβρύων καθολικής απαλοιφής (*Elavl1*^{fl}) και στον μυελό των οστών ποντικών μυελοειδικής απαλοιφής (*LysMCre Elavl1*^{fl/fl}).

3.1.3. Η φαινοτυπική ανάλυση του *HuR*^{-/-} εμβρυικού ήπατος, αποκαλύπτει μειωμένα προγονικά κύτταρα και σημαντική απώλεια ερυθροκυττάρων.

Στο αναπτυξιακό στάδιο του εμβρύου, με το ήπαρ ως το βασικό αιμοποιητικό όργανο, η διαδικασία της αιμοποίησης έχει ξεκινήσει αλλά ολοκληρώνεται στον ενήλικο μυελό των οστών. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα του εμβρυικού ήπατος περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό αρχέγονων και προγονικών κύτταρων απ' ότι ο μυελός των οστών των ενήλικων ζώων, και συνεπώς αλλοιώσεις στη σύστασή τους υποδηλώνουν κυρίως μετατροπές στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης.

Η κυτταρομετρική ανάλυση της σύστασης του ήπατος από *Elavl1*^{-/-} έμβρυα κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5 αποκάλυψε ότι η απώλεια της πρωτεΐνης HuR

αλλάζει το ισοζύγιο μεταξύ των αιμοποιητικών και των ώριμων κυττάρων, όπως φαίνεται από την πτώση του δείκτη ωριμότητας LIN (Lineage) (Εικόνα 3.3).



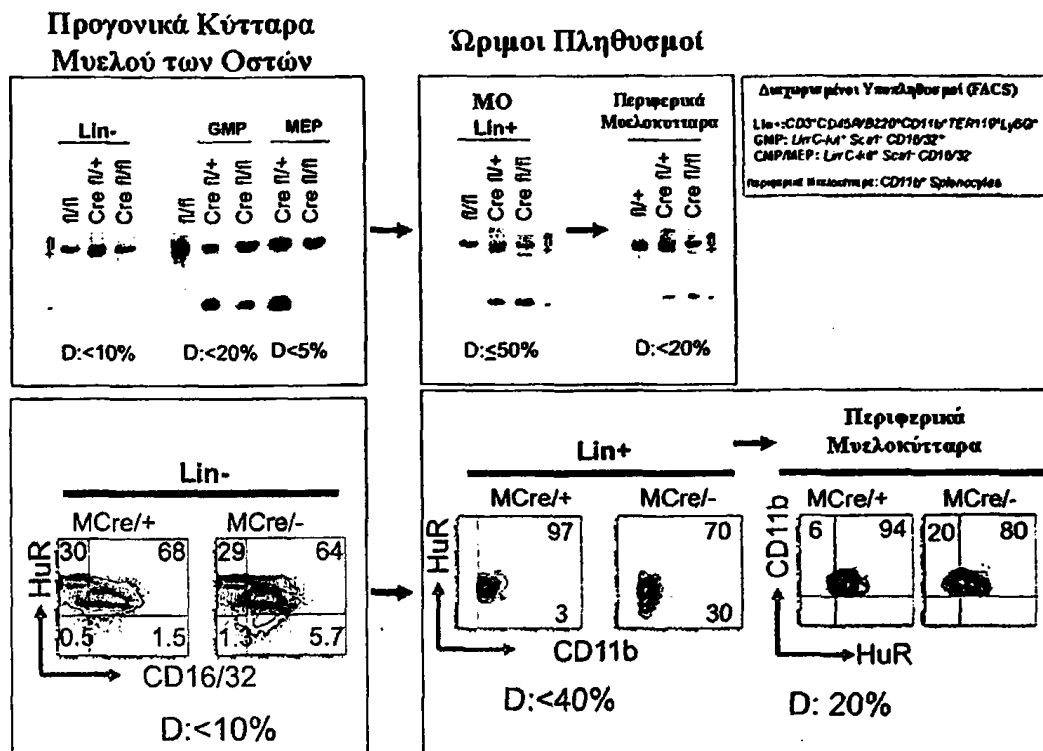
Εικόνα 3.3. Η κατανομή των αιμοποιητικών υποπληθυσμών του εμβρυικού ήπατος αλλάζει από την απουσία της HuR. (Α) Κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των HSCs και την μέτρηση των απόλυτων κυτταρικών αριθμών των διάφορων υποπληθυσμών προγονικών κυττάρων, μετρημένων σε LIN⁻ διαχωρισμένων προγονικών κυττάρων. (Β) Κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των επιπέδων των μορίων δεικτών των ώριμων κυττάρων του εμβρυικού ήπατος και την μέτρηση των απόλυτων κυτταρικών τους αριθμών. Οι μέσοι όροι των μετρήσεων προκύπτουν από 2 διαφορετικά πειράματα με $n=4$ ποντικοί/γονότυπο

Η εκτενέστερη ανάλυση του αιμοποιητικού τμήματος στα (LIN⁻) με χρήση των δεικτών cKit, Sca1, AA4.1, CD34 και CD16/32 έδειξε ότι η απώλεια της HuR σχετίζεται με τη μείωση του αριθμού των αρχέγονων κυττάρων CMP (cKit⁺ Sca1⁺ CD34⁺ CD16/32⁻) και των προγονικών MEPs (cKit⁺ Sca1⁺ CD34⁺ CD16/32⁺) χωρίς να επηρεάζει τον απόλυτο αριθμό των πολυδύναμων αρχέγονων HSCs (cKit⁺ Sca1⁺

CD34⁺ CD16/32⁻) και των προγονικών GMPs (cKit⁺ Sca1⁺ CD34⁺ CD16/32⁺), καθώς παρά την αύξηση του ποσοστού τους κατά περίπου 2 φορές το μέγεθος του εμβρυικού συκωτιού είναι περίπου υποδιπλάσιο σε συνολικό κυτταρικό αριθμό (εικόνα 3.3A - αριστερά). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του δείκτη cKit ο οποίος αποτελεί τον υποδοχέα του αιμοποιητικού παράγοντα SCF-1 (εικόνα 3.3A-δεξιά στήλη). Στον αντίποδα, και παρά τους μειωμένους αριθμούς τους, η αντιπροσώπευση των ώριμων κυττάρων είναι κανονική με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα που παρουσιάζουν μειωτική τάση όπως φαίνεται από τη απώλεια των TER119⁺ κυττάρων (εικόνα 3.3B).

Για να διαχωρίσουμε τις δράσεις της HuR κατά την διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων έναντι της διαφοροποίησης των προγονικών, αναλύσαμε τη σύσταση του μυελού των οστών των ποντικών *MCre*^{-/-} και των μαρτύρων τους *MCre*^{+/+}. Η ανάλυση δεν αποκάλυψε ευδιάκριτες αλλοιώσεις μεταξύ των HSC, CMP/CLP, GMP/MEP και ώριμων κυττάρων. Όταν όμως ελέγξαμε τα ποσοστά ανασυνδυασμού του γονιδιωματικού τύπου *Elavl1* σε απομονωμένα αρχέγονα, προγονικά και πρόδρομα κύτταρα από *MCre*^{-/-} ποντικούς, τότε παρατηρήσαμε μείωση των ανασυνδυασμένων κυττάρων σε GMP και πολύ περισσότερο σε MEP. Αντίστοιχα, και με βάση τον ανασυνδυασμό και την κυτταρομετρική ανίχνευση της πρωτεΐνης HuR, το ποσοστό των ώριμων HuR⁻ κυττάρων δεν ξεπερνούσε το 50% τόσο στον μυελό των οστών όσο και στην περιφέρεια των *MCre*^{-/-} ποντικών (Εικόνα 3.4)

Συνεπώς φαινοτυπικά, και με βάση τη σύγκριση των δύο συστημάτων η απώλεια της HuR να επηρεάζει τουλάχιστον δύο αιμοποιητικά στάδια: (α) την δημιουργία των αρχέγονων CMP από τα HSC και (β) και την δημιουργία παρουσία των προγονικών και πρόδρομων/ώριμων κυττάρων της μυελοποιητικής/ερυθροποιητικής σειράς από τα CMP.

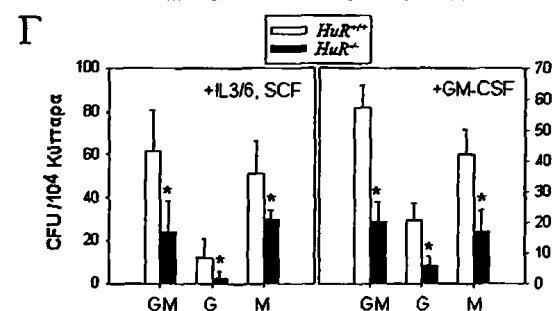
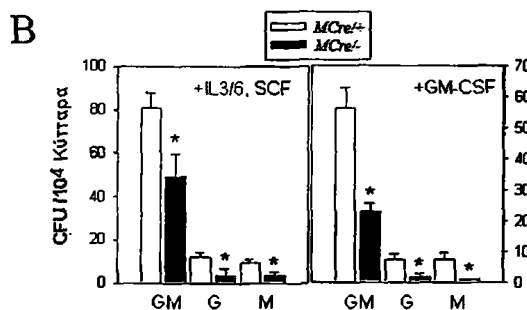
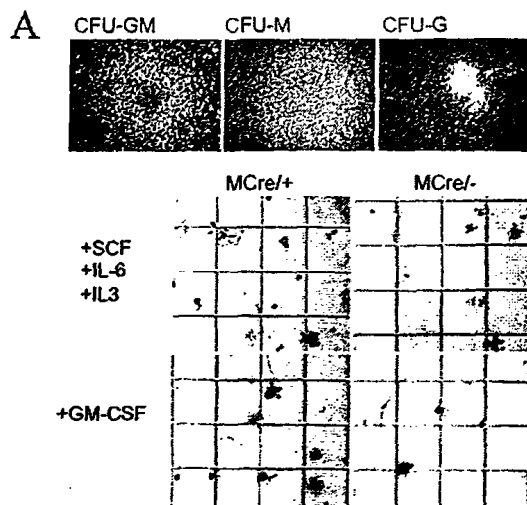


Εικόνα 3.4. Η μυελοειδική απαλοιφή της HuR σχετίζεται με την απώλεια μυελοποιητικών και ερυθροποιητικών κυττάρων. Ημιοσοτική PCR μετά από απομόνωση προγονικών μυελοκυττάρων που απομονώθηκαν με κυταρομετρία διαχωρισμού. Τα προγονικά μυελοκύτταρα του μυελού των οστών και οι ώριμοι υποπληθυσμοί μυελοκυττάρων μυελού των οστών και περιφέρειας διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τις χρώσεις που περιγράφονται στην δεξιά στήλη της εικόνας. Η κάτω σειρά απεικονίζει πειράματα κυταρομετρίας ροής στους αντίστοιχους πληθυσμούς μυελοκυττάρων.

3.1.4. Η πρωτεΐνη HuR είναι απαραίτητη για την μυελοειδική διαφοροποίηση *in vitro*

Προκειμένου να αναλυθεί η ενδογενής ικανότητα των προγονικών HuR⁻ κυττάρων είναι σκόπιμη η απομόνωση τους και η ανάλυση της διαφοροποιητικής τους ικανότητας *in vitro*. Οι κυταροκίνες αποτελούν βασικά σήματα διαφοροποίησης στην διαδικασία της αιμοποίησης. Στην *in vitro* παραγωγή μυελοκυττάρων, οι πιο σημαντικές κυταροκίνες είναι η IL6, η IL3 και ο SCF ενώ ο GM-CSF είναι η πιο σημαντική μυελοειδική κυταροκίνη. Κατά την *in vitro* καλλιέργεια προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων σε υπόστρωμα μεθυλοκυταρίνης η παρουσία των παραπάνω κυταροκινών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία τριών τύπων αποικιών:

α) αποικιών μακροφάγων και ουδετερόφιλων (CFU-GM), β) αποικιών μακροφάγων (CFU-M) και γ) αποικιών ουδετερόφιλων (CFU-G) (εικόνα 3.5A).



Εικόνα 3.5. Η πρωτεΐνη HuR είναι απαραίτητη για την μυελοειδική διαφοροποίηση. (Α)

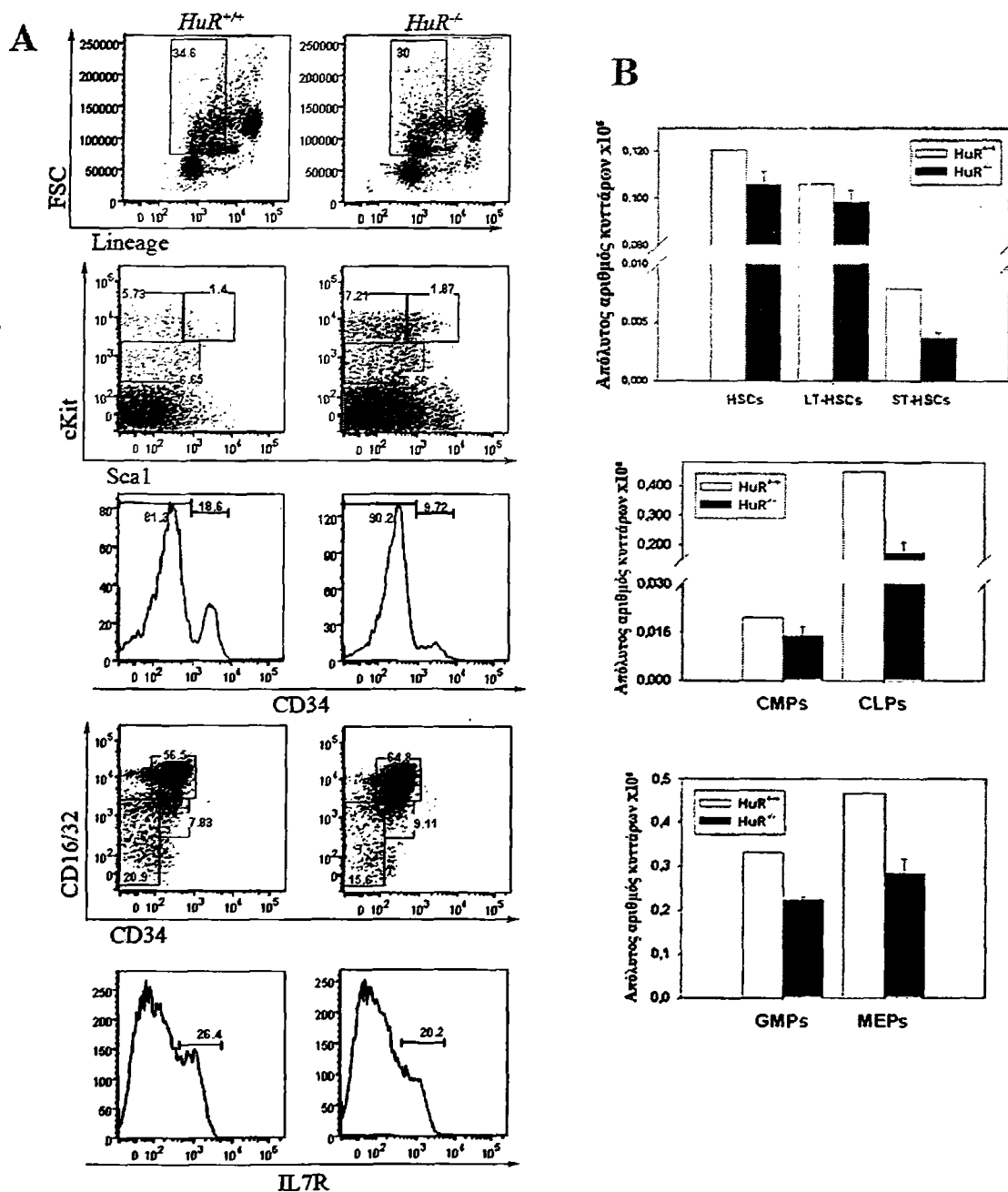
Μικροσκοπικές παρατηρήσεις πειράματος *in vitro* σχηματισμού αποικιών (CFUs) 12 ημέρες μετά την καλλιέργεια LIN⁺ κυττάρων, σε ειδικό θρεπτικό μεθυλοκυτταρίνης συμπληρωμένο με κυτταροκίνες. Τα LIN⁺ κύτταρα προκύπτουν μετά από χρώση του μυελού των οστών με το βιοτυνιωμένο μείγμα αντισωμάτων (LIN) και απομόνωση με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης των LIN⁺ προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Μετρήσεις μετά από μικροσκοπική παρατήρηση των σχηματιζόμενων αποικιών (Β) από 10⁴ κύτταρα LIN⁺ μυελού των οστών και (Γ) από 10⁴ κύτταρα LIN⁺ εμβρυικού ήπατος. Οι μέσοι όροι των μετρήσεων προκύπτουν από n = 3 ποντικού/έμβρυα ανά γονότυπο.

Η μέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας απομονωμένων LIN⁺ κυττάρων, από τον μυελό των οστών του ποντικού MCre^{-/-}, και από HuR^{-/-} εμβρυικό ήπαρ E14.5, αποκάλυψε σημαντικές μειώσεις στον αριθμό τους. Και στα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα μεθυλοκυτταρίνης, συμπληρωμένα από IL3, IL6 και SCF ή GM-CSF μόνο, μετρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένες αποικίες και των τριών τύπων, με μεγαλύτερη μείωση στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο ήταν συμπληρωμένο μόνο με GM-CSF (εικόνα 3.5B, Γ). Ο σημαντικά μειωμένος αριθμός σχηματιζόμενων αποικιών, αναδεικνύει ένα πρόβλημα στην ικανότητα διαφοροποίησης των HuR^{-/-} κυττάρων κάτω από τον ερεθισμό με τις συγκεκριμένες κυτταροκίνες. Η απουσία της HuR στα κύτταρα αυτά θα μπορούσε να επηρεάσει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό αλλά και την διαφοροποίησή τους. Επιπρόσθετα, η έλλειψη διαφοροποίησης των HuR^{-/-} κυττάρων θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα έλλειψης σημάτων διαφοροποίησης ή διαταραχών στον κυτταρικό κύκλο των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων, που προηγούνται της διαφοροποιητικής διαδικασίας.

3.1.5 Τα αρχέγονα κύτταρα με απαλοιφή της HuR παρουσιάζουν μειωμένο αιμοποιητικό δυναμικό *in vivo*.

Τα πειράματα μεταμόσχευσης μυελού των οστών περιλαμβάνουν την μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων σε ιστοσυμβατούς δέκτες, όπου με έκθεση σε ακτινοβολία έχουν απαλειφθεί όλα τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, από προγονικά μέχρι και ώριμα. Η αιμοποιητική ικανότητα των αρχέγονων HuR^{-/-} κυττάρων, μελετήθηκε *in vivo* μέσω της μέτρησης του αιμοποιητικού εποικισμού των ακτινοβολημένων ιστοσυμβατών δεκτών. 10⁶ κύτταρα από το HuR^{-/-} εμβρυικό ήπαρ ενέθηκαν ενδοφλέβια σε ακτινοβολημένους δέκτες. Μετά από 8 εβδομάδες αναλύθηκε η σύσταση του μυελού των οστών για την παρουσία προγονικών κυττάρων. Κύτταρα HuR⁺ χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας ελέγχου του πειράματος ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία. Κατά τον εποικισμό των HuR^{-/-} κυττάρων παρατηρήθηκε μικρή αντιπροσώπευση στον συνολικό πληθυσμό των HSCs, αλλά σημαντική μείωση (υποδιπλάσιος αριθμός) στα ST-HSCs. Η αντιπροσώπευση των αρχέγονων κυττάρων CMPs παρουσιάστηκε μειωμένη όχι ωστόσο στον ίδιο βαθμό με τα CLPs, ενώ παρατηρήθηκαν αντίστοιχες μειώσεις στην αντιπροσώπευση των προγονικών GMPs και MEPs (εικόνα 3.6). Η μείωση των ST-HSCs φαίνεται να είναι

καθοριστικής σημασίας για την περαιτέρω παραγωγή των CMPs, CLPs, GMPs και MEPs υποδηλώνοντας το χαμηλό αιμοποιητικό δυναμικό των HuR^- κυττάρων. Συμπερασματικά τα HuR^- αρχέγονα κύτταρα, ενώ έχουν την δυνατότητα αιμοποιητικής διαφοροποίησης, που επιτρέπει την επιβίωση του ακτινοβολημένου δέκτη, παρουσίασαν χαμηλότερο αιμοποιητικό δυναμικό σε σχέση με τα HuR^+ κύτταρα.

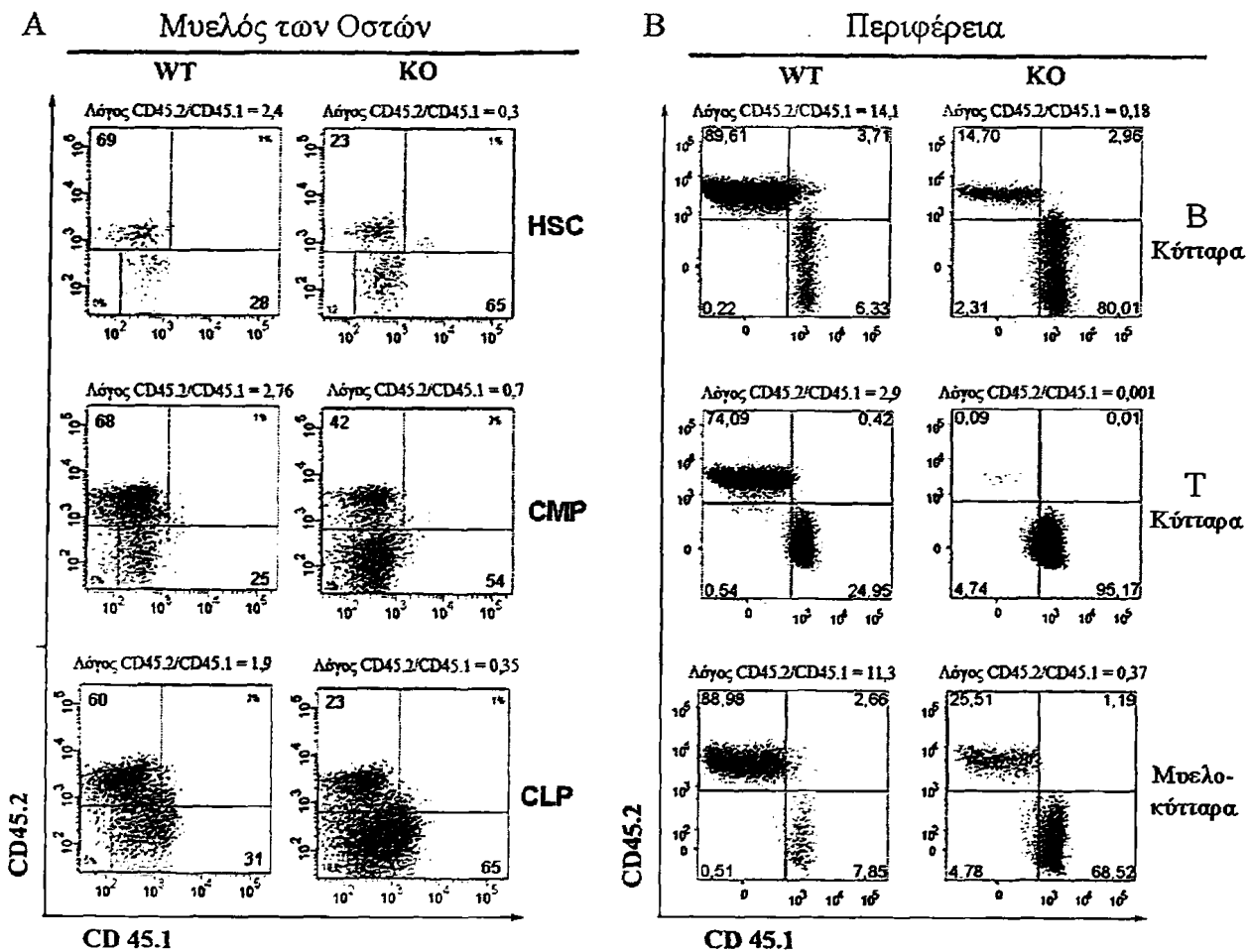


Εικόνα 3.6. Ο μειωμένος εποικισμός από προγονικά κύτταρα ακτινοβολημένων δεκτών από HuR^- κύτταρα του εμβρυϊκού συκωτιού. (Α) Κυτταρομετρία ροής σε επανεποικισμένο μυελό των οστών για αιμοποιητικούς αρχέγονους και προγονικούς υποπληθυσμούς και (Β) ποσοτικοποίηση τους σε απόλυτους αριθμούς κυττάρων

Προκειμένου να μελετηθεί εάν τα HuR^- αρχέγονα κύτταρα, έχουν την δυνατότητα αιμοποίησης παρουσία ανταγωνιστικών HuR^+ κυττάρων *in vivo* διενεργήθηκε πείραμα μεταμόσχευσης για ανταγωνιστικό εποικισμό. Στο πείραμα αυτό, LIN^- κύτταρα από $HuR^{-/-}$ εμβρυικό ήπαρ, απομονώθηκαν από έμβρυα γενετικού υποβάθρου CD45.2 και μεταμοσχεύθηκαν μαζί με LIN^- κύτταρα μυελού των οστών ποντικών γενετικού υποβάθρου CD45.1 σε ακτινοβολημένους δέκτες. HuR^+ κύτταρα από φυσιολογικό εμβρυικό ήπαρ, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας ελέγχου του πειράματος ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία ανταγωνιστικού επανεποικισμού. Ο εποικισμός των HuR^- κυττάρων συγκρίθηκε με ανάλυση κυτταρομετρία ροής με τον εποικισμό των HuR^+ κυττάρων από το φυσιολογικό εμβρυικό ήπαρ.

Η κυτταρομετρία ροής σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς 8 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση μυελού των οστών αποκάλυψε έναν ιδιαίτερα αυξημένο λόγο CD45.2 (ανταγωνιστικών HuR^-) προς CD45.1 (ανταγωνιστικών HuR^+) προγονικών ή/και αρχέγονων κυττάρων (εικόνα 3.7A). Αντίστοιχα με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής τα CD45.2- HuR^- B λεμφοκύτταρα (B220⁺), T λεμφοκύτταρα (CD3⁺) και μυελοκύτταρα (CD11b⁺) καταγράφηκαν ιδιαίτερα μειωμένα. Αυτό δηλώνει ένα σημαντικό ανταγωνιστικό μειονέκτημα των CD45.2- HuR^- κυττάρων να παράγουν τα ώριμα κύτταρα της περιφέρειας (εικόνα 3.7B). Το παρατηρούμενο μειονέκτημα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αντίστοιχου ανταγωνιστικού μειονεκτήματος των αρχέγονων ή/και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων HSCs, CLPs και CMPs. Συμπερασματικά το πείραμα του ανταγωνιστικού εποικισμού αποκάλυψε μια έντονη ποσοτική διαφορά στην ικανότητα αιμοποίησης των HuR^- . Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στο μοντέλο MCre/- ποντικού, διότι και στα δύο συστήματα ανταγωνιστικού περιβάλλοντος, η HuR επιφέρει μειωμένη ικανότητα αιμοποίησης επηρεάζοντας τα αρχέγοννα ή/και προγονικά κυτταρικά στάδια και κατά συνέπεια αυτό επιφέρει μείωση και στα επόμενα στάδια διαφοροποίησης.





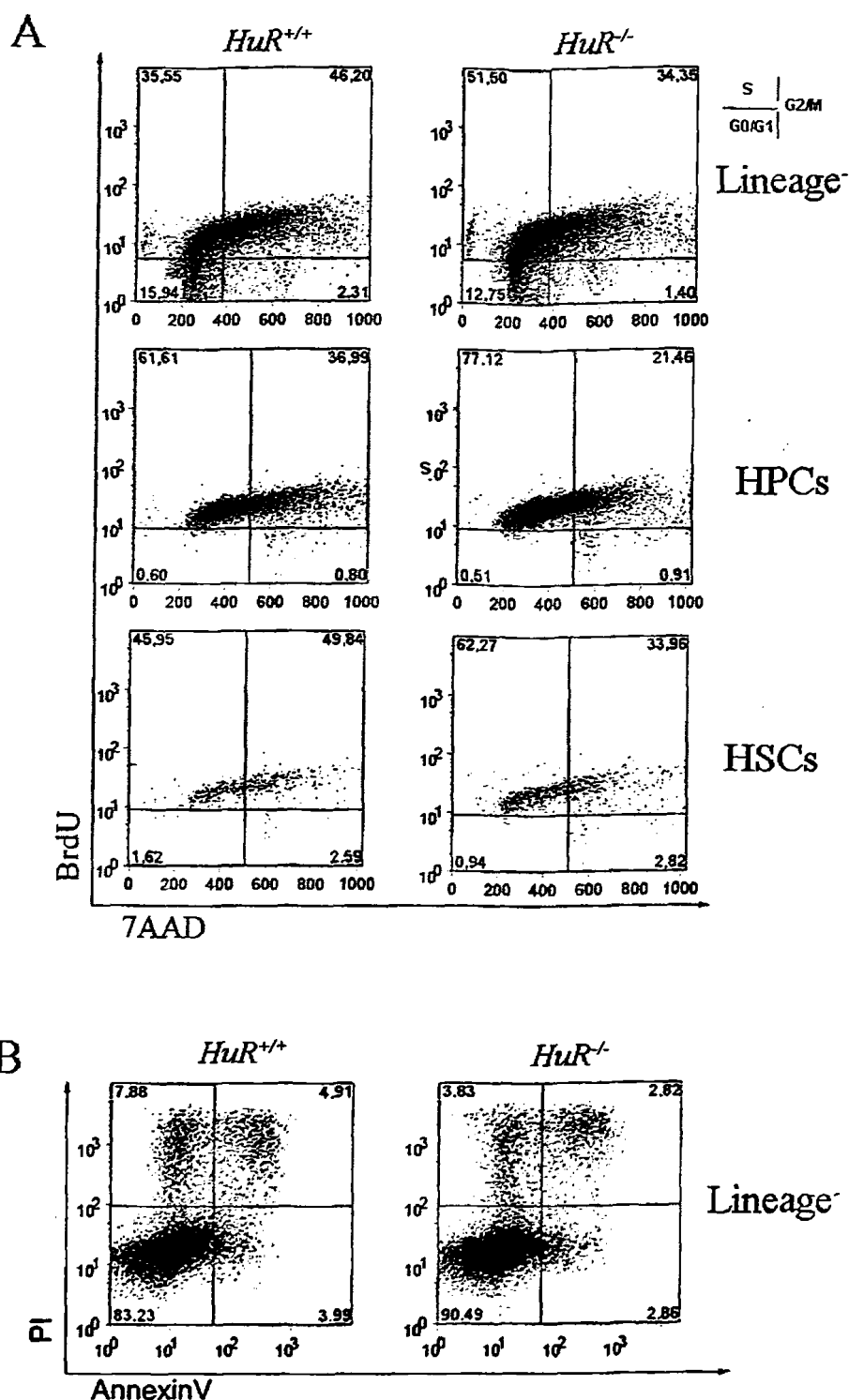
Εικόνα 3.7. Πείραμα ανταγωνιστικού εοικισμού αποκαλύπτει ελλειπωμένη ικανότητα επαναφοράς του ανοσοβιολογικού συστήματος από τα HuR^{+} κύτταρα. (A) των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων σε μυελό των οστών και (B) των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων σε περιφέρεια

3.1.6 Τα $HuR^{-/-}$ αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά κυττάρων στην φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου.

Η απουσία της HuR επιφέρει ένα μειωμένο δυναμικό αιμοποίησης αλλά δεν έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη διακοπή της διαφοροποίησης σε ένα συγκεκριμένο στάδιο. Το γεγονός αυτό δημιουργεί το ερώτημα, αν το πρόβλημα οφείλεται σε μειωμένο πολλαπλασιασμό, μειωμένη αυτοανανέωση ή τέλος σε μειωμένη επιβίωση των αρχέγονων ή/και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να μελετηθεί μετά από την ενσωμάτωση μορίων βρωμοοξουριδίνης στο πολλαπλασιαζόμενο DNA των

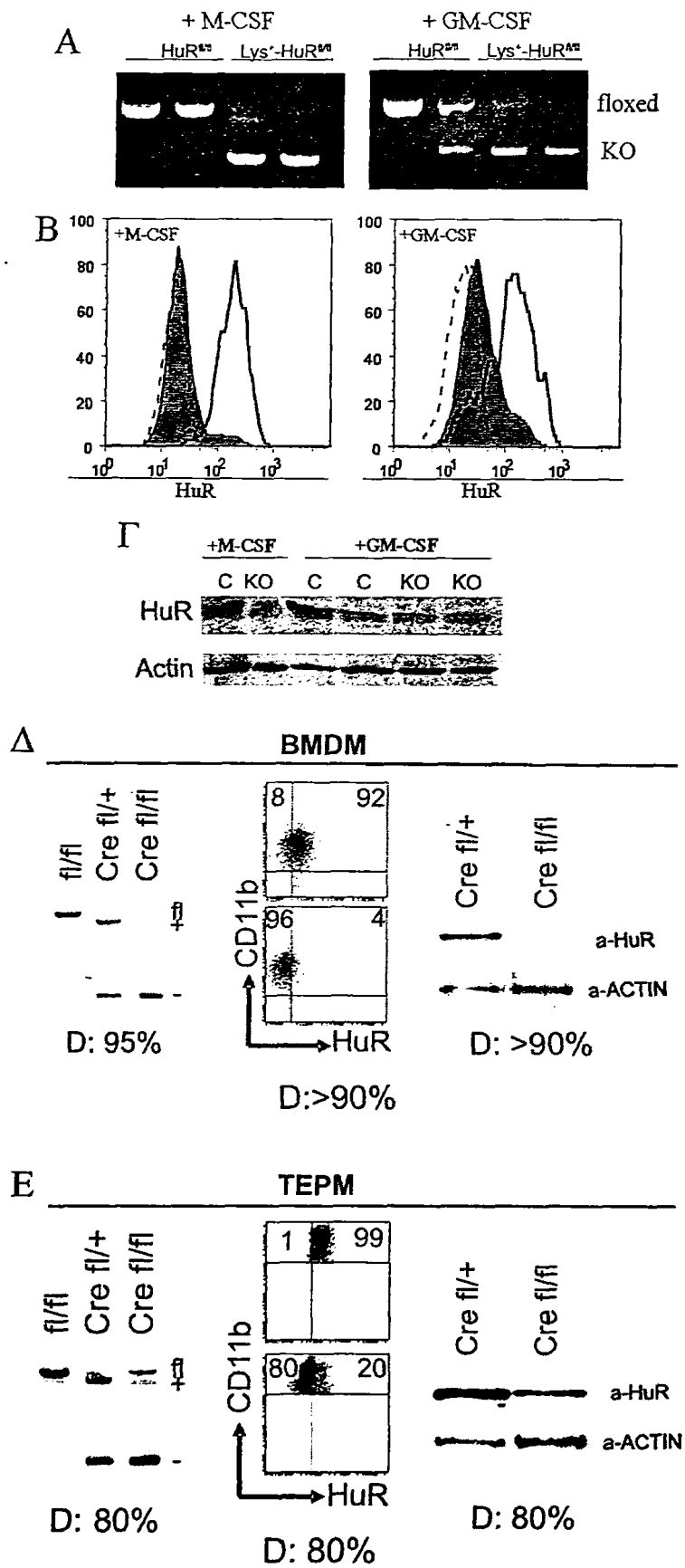
κυττάρων. Η ανάλυση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του εμβρυικού συκωτιού με τη χρήση δεικτών του κυτταρικού κύκλου (anti-BrdU, PI, 7AAD) αλλά και της απόπτωσης (Annexin) αποκαλύπτει υψηλό ποσοστό του συνολικού πληθυσμού των LIN⁺ κυττάρων εμβρυικού ήπατος, στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 3.8A). Καταγράφηκε ακόμα μια μείωση στο ποσοστό κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G2/M, η οποία παρατηρείται κυρίως τα πρόδρομα κύτταρα και όχι στα αρχέγονα. Η απόπτωση των HuR⁺ LIN⁺ κύτταρων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές αποκλείοντας την περίπτωση να υπάρχει κάποια επίδραση της απώλειας της HuR στους αποπτωτικούς μηχανισμούς (εικόνα 3.8B). Η απώλεια της HuR φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, μειώνοντας την μιτωτική τους επέκταση. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη απόκριση των HuR⁺ κυττάρων σε σήματα προερχόμενα από αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες.



Εικόνα 3.8. Τα *HuR^{-/-}* αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό σε μιτωτική φάση ενώ δεν παρουσιάζουν μεταβολές στην απόπτωση. Κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα εμβρυικού ήπατος (A) με τους δείκτες BrdU και 7AAD (B) και τους δείκτες AnnexinV, PI. Ο αριθμός των βιολογικών αντιγράφων ήταν $n = 3$ έμβρυα/πείραμα.

3.1.7. Παρουσία των κυττοκινών M-CSF, GM-CSF και φλεγμονωδών ερεθισμάτων αντιστρέφεται η μυελοποιητική ανεπάρκεια των HuR⁺ κυττάρων.

Η *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών με M-CSF και GM-CSF οδήγησε στην παραγωγή μακροφάγων μυελού των οστών με απαλοιφή της HuR. Η πρωτεΐνη HuR απαλείφεται σε ένα σημαντικό ποσοστό, όπως φαίνεται από την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης μπάντας με ημιποσοτική PCR (εικόνα 3.9A), κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται με την απαλοιφή της και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (εικόνα 3.9B και 3.9C). Η παρουσία του αυξητικού παράγοντα μακροφάγων (M-CSF από L929 θρεπτικό μέσο) σε κύτταρα μυελού των οστών οδηγεί στην καθολική απαλοιφή (μεγαλύτερη από 90%) της πρωτεΐνης HuR στα *in vitro* παραγόμενα μακροφάγα (BMDMs) (εικόνα 3.9D). Η παράκαμψη του *in vivo* μυελοποιητικού προβλήματος στην περίπτωση αυτή, οδηγεί στην υπόθεση ότι η απαλοιφή της HuR δεν έχει επηρεάσει των υποδοχέα του M-CSF ή μόρια που βρίσκονται στον καταρράκτη αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού. Ακόμη σε ένα μοντέλο στείρας φλεγμονώδους απόκρισης στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα μετά από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του βακτηριακού μέσου Thioglucolate Borth, τα εκλυόμενα μακροφάγα (TEPMs) παρουσίασαν ένα σημαντικό ποσοστό απαλοιφής της τάξης του 80% (εικόνα 3.9E). Τα αιμοποιητικά ελλατώματα ξεπερνούνται παρουσία φλεγμονώδους ερεθίσματος το οποίο μπορεί και προκαλεί εναλλακτική αιμοποίηση ή αιμοποίηση σε καταστάσεις ανάγκης (Nagai et al. 2006). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι σε φλεγμονώδεις καταστάσεις ενδεχομένως είτε να χρησιμοποιούνται εναλλακτικά μονοπάτια μυελοποίησης, είτε με τα φλεγμονώδη σήματα να αποκαθίσταται η ισορροπία από τις απορυθμισμένες κυττοκίνες.



Εικόνα 3.9. Παρουσία των κυτταροκινών M-CSF, GM-CSF και φλεγμονωδών ερεθισμάτων αντιστρέφεται η μυελοποιητική ανεπάρκεια των HuR⁺ κυττάρων. Η παρουσία mM-CSF ή mGM—CSF σε κύτταρα μυελού των οστών οδήγησε στην in vitro παραγωγή κυττάρων της έμφυτης ανοσίας όπου ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα (A) ανασυνδιασμού με PCR (B) απαλοιφής σε πρωτεϊνικό επίπεδο με κυτταρομετρεία ροής και (Γ) στυπώματος κατά western. (Δ) Η παρουσία M-CSF από L929 θρεπτικό μέσο σε κύτταρα μυελού των οστών και ο χαρακτηρισμός του ανασυνδιασμού και της απαλοιφής με τις αντίστοιχες τεχνικές (E). Η επαγωγή φλεγμονώδους ερεθίσματος ενδοπεριτοναϊκά και η ταυτοποίηση των επιπέδων ανασυνδιασμού και απαλοιφής στα εκλυόμενα μακροφάγα.

Τα συνολικά μας αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η HuR ενδέχεται να καθορίζει τόσο το δυναμικό αυτοανανέωσης και πολλαπλασιασμού των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων όσο και την επαγωγή της διαφοροποίησης επηρεάζοντας συγκεκριμένα σήματα του M-CSF και του GM-SCF.

3.2. Ο ρόλος της HuR στην έμφυτη φλεγμονώδη απάντηση

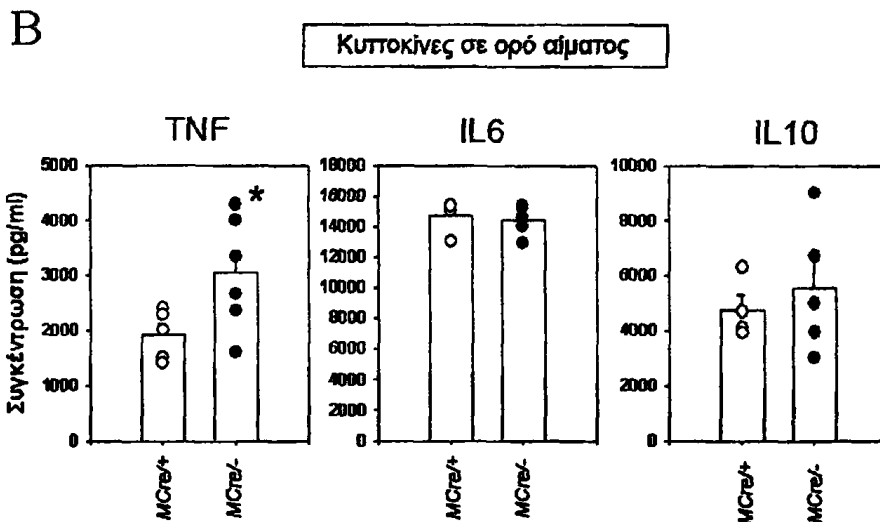
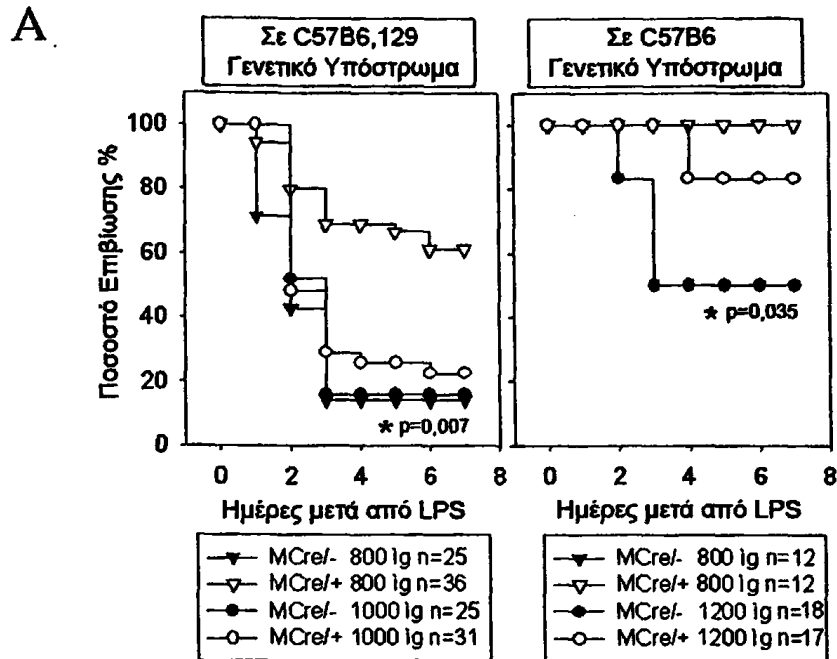
3.2.1. Ποντικοί με απαλοιφή της HuR στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ενδοτοξαιμία

Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε ότι οι ποντικοί με απαλοιφή της HuR στα κύτταρα της μυελοειδικής σειράς (MCre/-) παρουσιάζουν συμπτώματα απώλειας των ώριμων κυττάρων της έμφυτης ανοσίας. Παρά ταύτα τα συμπτώματα αυτά είναι αντιστρέψιμα είτε με τη χορήγηση των αυξητικών παραγόντων M-CSF & GM-CSF ή με την παρουσία φλεγμονώδους ερεθίσματος όπως στην περίπτωση της στείρας φλεγμονής μέσω της χορήγησης thioglucolate. Η δεύτερη αυτή παρατήρηση υποδεικνύει ότι η φλεγμονώδης μυελοποίηση δρα φυσιολογικά στους ποντικούς MCre/- και συνεπώς αυτοί οι ποντικοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των αντιδράσεων της έμφυτης ανοσιακής απάντησης κατά τη φλεγμονή.

Προηγούμενες αναφορές υπεδείκνυν ότι η HuR δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας διότι μπορεί να σταθεροποιεί mRNA γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Αντίθετα, στο παρελθόν είχαμε δείξει ότι η υπερέκφραση της HuR μπορεί να καταστέλλει προφλεγμονώδεις αντιδράσεις διότι μπορεί να καταστέλλει τη μετάφραση φλεγμονωδών mRNA, παρά την θετική επίδραση της στην σταθεροποίηση τους. Για να διευκρινίσουμε το ρόλο της HuR στη ρύθμιση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης στη λοίμωξη, χρησιμοποιήσαμε ποντικούς MCre/- για την εφαρμογή πειραματικού πρότυπου ενδοτοξαιμίας το οποίο επάγεται από τη χορήγηση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών (LPS). Οι LPS προέρχονται από βακτηριακό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων και ενεργοποιούν τους υποδοχείς Toll-like 4 (TLR4) στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Η χορήγηση των LPS προκαλεί την έντονη και συστηματική έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων με αποτέλεσμα την ήπια έως την καταληκτική καταπληξία των ποντικών ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση.

Για τις μελέτες μας επιλέχθηκε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δύο δόσεων LPS από *Salmonella enteridits* (Εικόνα 3.10Α): (α) δόση των 800μg η οποία προκαλεί ήπια συμπτώματα έως και 20-30% θνητότητα σε φυσικού τύπου και MCre/+ ποντικούς μάρτυρες γενετικού υποστρώματος C57Bl/6,129Ola και (β) δόση των 1000-1200μg η οποία προκαλεί 80% θνητότητα σε φυσικού τύπου και MCre/+ ποντικούς μάρτυρες γενετικού υποστρώματος C57Bl/6,129Ola. Σε αντίθεση με την

αντίδραση των μαρτύρων, οι ποντικοί MCre/- παρουσίασαν εκτεταμένη ευαισθησία και >90% θνητότητα κυρίως στην χαμηλή δόση LPS.



Εικόνα 3.10. Ευαισθησία των MCre/- ποντικών στην ενδοτοξαιμία. (Α) Επιβίωση ποντικών ηλικίας 8-12 εβδομάδων σε δύο διαφορετικά γενετικά υποστρώματα και με τους αναγραφόμενους αριθμούς ανά γονότυπο, μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS. Παρουσιάζονται κατανομές και στατιστική ανάλυση Kaplan-Meier και υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (p). (Β) Επίπεδα κυτταροκινών σε ορούς ποντικών 90 λεπτά μετά την χορήγηση 0,2mg LPS. Παρουσιάζονται ανεξάρτητες και μέσες τιμές και μέσοι όροι ($\pm$ SD) από μετρήσεις των αντίστοιχών ELISA. (*) στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώθηκαν και στο ανθεκτικό υπόστρωμα C57Bl/6 όπου οι ποντικοί MCre/- παρουσίασαν >50% θνητότητα στην υψηλή δόση των 1200 µg LPS. Επιπρόσθετα η μέτρηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF, IL-6 και της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 έδειξε την αλλοίωση του ισοζυγίου της φλεγμονής προς την προ-φλεγμονώδη πλευρά με την αυξημένη παρουσία του TNF (Εικόνα 3.10B).

3.2.2. Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας επηρεάζει τη έκφραση δικτύων γονιδίων κυτταροκινών και ενδοκυττάρων σημάτων της φλεγμονής.

Για να ανιχνεύσουμε γονιδιακά δίκτυα που ενδεχομένως να απορυθμίζονται από την απώλεια της HuR σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, απομονώθηκε ολικό RNA από καλλιέργειες MCre/+ & MCre/- μακροφάγων (MMO) και ύστερα από ερεθισμό με LPS για 0, 2 και 6 ώρες. Εν συνεχεία τα δείγματα RNA υβριδοποιήθηκαν σε μικροσυστοιχίες Affymetrix στη μονάδα Μικροσυστοιχιών του Ε.ΚΕ.Β.Ε «Αλ. ΦΛΕΜΙΝΚ». Συνολικά αναγνωρίστηκαν 348 (161 αυξημένα, 187 μειωμένα), 684 (297 αυξημένα, 387 μειωμένα) και 323 (193 αυξημένα & 130 μειωμένα) γονίδια με διαφορετική έκφραση στις MCre/- καλλιέργειες κατά τις 0, 2, 6 ώρες αντίστοιχα. Για να επικεντρωθούμε στα γονίδια εκείνα που σχετίζονται με φαινοτύπους υψηλής ευαισθησίας σε οξείες φλεγμονώδεις αποκρίσεις, συλλέξαμε μια λίστα γονιδίων από το Mouse Genome Informatics (MGI) των εργαστηρίων Jackson (www.informatics.jax.org) που σχετίζεται με την φαινοτυπική οντολογία “sensitivity to endotoxemia” (δηλ. ευαισθησία στην ενδοτοξαιμία). Εν συνεχεία, η λίστα αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εκπαίδευση του αλγορίθμου κατάταξης προτεραιότητας γονιδίων «ENDEAVOUR» (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/endeavour/endeavourweb.php>) και το οποίο συνέκρινε τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών με τα παραδείγματα για να καταλήξει σε μία λίστα διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων σε MCre/- MMO με υψηλή σημασία για την οξεία φλεγμονή (Πίνακας 3.1). Από τη λίστα αυτή προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα: (α) η απώλεια της HuR σε μακροφάγα κύτταρα σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση τόσο πρό- όσο και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF, IL-10) και (β) η απώλεια της HuR σε μακροφάγα κύτταρα που έχουν λάβει το ερέθισμα των LPS σχετίζεται με μεταβολές

στην έκφραση πολλών μονοπατιών ενδοκυττάρων σημάτων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR (όπως ο προσαγωγός IRAK4), κινασών του στρες (p38 και JNK) καθώς και το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (όπως των κινασών σερίνης/θρεονίνης Map3k14 & Map3K2) καθώς και αντίστοιχων κινασών που σχετίζονται με αιμοποιητικά μονοπάτια όπως της κινάσης Map4k1.

Table 1. Priority list of differentially expressed genes in HuR-deficient macrophages

Rank	Name	Gene ID	Description	p value	Time
Genes with reduced expression					
1	Map4k1	1346862	mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 1	0.0000405	2
2	Prkaca	97592	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha	0.000304	2
3	Map3k14	1858204	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	0.000608	2
4	Il7r	96562	interleukin 7 receptor	0.00159	0
5	Ern1	1930134	endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1	0.00195	2
6	Spk2	1201408	serine/arginine-rich protein specific kinase 2	0.00227	0
7	Prkce	97595	protein kinase C, alpha	0.00267	2
8	Lib	104796	lymphotoxin B	0.00418	2
9	Creb3l2	2442695	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	0.00611	2
10	Pink1	1916193	PTEN induced putative kinase 1	0.00735	0&2
11	Mef1	96910	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	0.00867	2
12	Bcl2	88138	B-cell leukemia/lymphoma 2	0.0106	0
13	Merlk	96965	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	0.0142	0
14	Tra2a	1933972	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	0.0177	0
15	Pkl1	97621	polo-like kinase 1 (Drosophila)	0.0155	2
16	Cd97	1347095	CD97 antigen	0.0211	6
17	Cdc2a	86351	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	0.0216	2
18	Aurka	884678	aurora kinase A	0.0234	2
19	Pknox1	2137630	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	0.0244	6
20	Irak4	2182474	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	0.0247	0&2
21	Slamf1	1351314	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	0.0282	6
22	Taok2	1915919	TAO kinase 2	0.0345	2
23	Pdlim1	1860611	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	0.0348	2
24	Chaf1b	1314881	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	0.0384	6
25	Birc5	1203517	baculoviral IAP repeat-containing 5	0.0392	2&6
26	Aurkb	107168	aurora kinase B	0.0404	6
27	Vav2	102718	Vav2 oncogene	0.0419	2
28	Itgb5	96614	integrin beta 5	0.0425	2
29	Lrk2	1913975	leucine-rich repeat kinase 2	0.0453	6
30	Nfat1	1921289	Nfat activating molecule with ITAM motif 1	0.0470	2
31	RhoH	1921984	ras homolog gene family, member H	0.0478	2
32	Gpr65	108031	G-protein coupled receptor 65	0.0497	0
33	Phr1	2179432	pam, highwire, rpm 1	0.0448	0&2&6
Genes with increased expression					
1	Tnf	104798	tumor necrosis factor	0.0000212	0
2	Wnk1	2442092	WNK lysine deficient protein kinase 1	0.00280	0&2
3	Rbm39	2157953	RNA binding motif protein 39	0.00292	2
4	Braf	88190	Braf transforming gene	0.00340	2
5	Prp4b	109584	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	0.00666	2
6	Il10	96537	interleukin 10	0.00800	0
7	Acn1	1891824	apoptotic chromatin condensation inducer 1	0.0125	6
8	Map3k2	1346873	mitogen activated protein kinase kinase kinase 2	0.0128	2
9	Strs10	106016	splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila)	0.0143	2
10	Strs2	96284	splicing factor, arginine/serine-rich 2 (SC-35)	0.0239	2
11	Nfkbi2	1931595	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	0.0254	0
12	Jmyd1c	1918614	jumonji domain containing 1C	0.0298	2
13	Ppan	2178445	peter pan homolog (Drosophila)	0.0331	6
14	Zfp62	99662	zinc finger protein 62	0.0333	2
15	Ccr1	103011	chemokine (C-C motif) receptor 7	0.0343	6
16	Ccnh1	1922664	cyclin L1	0.0355	2
17	Pim2	97587	proviral integration site 2	0.0409	0
18	Zf	2675296	HCF-binding transcription factor Zhangfai	0.0482	2

Πίνακας 3.1. Πίνακας κατηγοριοποίησης των γονιδίων των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται από την απώλεια της HuR, με βάση την προτεραιότητα ενδεχόμενης εμπλοκής τους στην ενδοτοξαιμία. Παρουσιάζονται γονίδια με αυξανόμενα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε HuR-μακροφάγα, οι τιμές στατιστικής ανάλυσης (p-value) με βάση το λογισμικό ENDEAVOUR και χρόνος(Time) που παρατηρείται η διαφορική έκφραση.

3.2.3. Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας δεν επηρεάζει την έκφραση και την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR

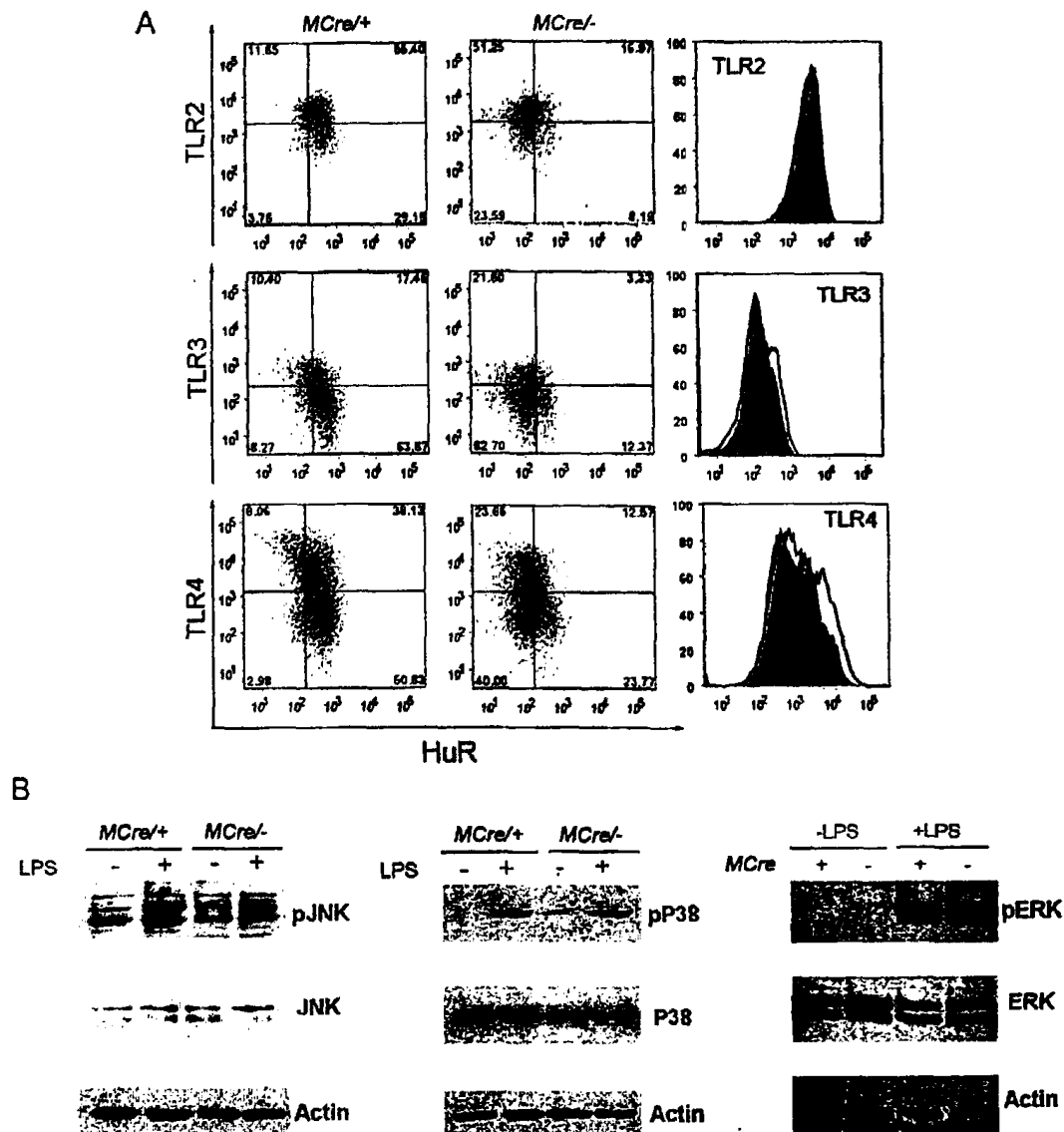
Από το παραπάνω πείραμα ολιστικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης προκύπτει ότι η HuR μπορεί να εμπλέκεται σε μονοπάτια σηματοδότησης της φλεγμονής συμπεριλαμβανομένων και των υποδοχέων TLR. Για το σκοπό αυτό αναλύσαμε την έκφραση των κεντρικών υποδοχέων σε καλλιέργειες MCre/+ & MCre/- μακροφάγων με κυτταρομετρεία ροής αλλά και την ενεργοποίηση των σημαντικών κεντρικών κινασών του στρες στις οποίες συγκλίνουν όλα τα πιθανά σήματα που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς αυτούς. Η παρουσία των TLR2, 3 και 4 παρέμεινε σχετικά αμετάβλητη στα MCre/- μακροφάγα αν και ανιχνεύθηκε μια μικρή μείωση στα επίπεδα του TLR4 (Εικόνα 3.11). Επιπρόσθετα η ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση των MAPK κινασών p38, JNK και ERK από LPS στα MCre/- μακροφάγα ήταν συγκρίσιμη με αυτή των MCre/+ μακροφάγων. Συνεπώς ο ενδεχόμενος λειτουργικός ρόλος της HuR στην ενεργοποίηση της έμφυτης προφλεγμονώδους απόκρισης βρίσκεται κάτω από το επίπεδο ενεργοποίησης των υποδοχέων TLR και ενδεχομένως στο επίπεδο της βιοσύνθεσης και της δράσης των κυτταροκινών και άλλων μορίων της φλεγμονώδους απόκρισης.

3.2.4 Η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας προκαλεί αλλαγές στη βιοσύνθεση των κυτταροκινών.

Με βάση τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας επικεντρωθήκαμε στη ανάλυση της βιοσύνθεσης φλεγμονωδών μορίων σε καλλιέργειες μακροφάγων που υπολείπονται της HuR με εφαρμογή μεθοδολογιών ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για mRNA και ποσοτικών ανοσοενζυμικών προσδιορισμών (ELISA) ή ανοσοοτυπωμάτων για διαλυτές/ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες.

Η απώλεια της HuR προκάλεσε αλλαγές στα επίπεδα συσσώρευσης πολλών mRNA σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας πριν ή μετά την επαγωγή του υποδοχέα TLR4 από LPS (Εικόνα 3.12.A). Όπως είχε ανιχνευθεί στις αναλύσεις μικροσυστοιχιών, το mRNA του προφλεγμονώδους TNF εμφανίζεται στατιστικά αυξημένο κυρίως σε ανερέθιστα HuR⁻ μακροφάγα κύτταρα και όχι τόσο στην επαγωγική (2 ώρες) ή την κατασταλτική φάση (6 ώρες) της αντίδρασης. Αντίθετα τα

mRNA των προφλεγμονοδών παραγόντων IL-6 και IFN β επηρεάζονται θετικά στα HuR⁻ μακροφάγα κυρίως στην επαγωγική φάση (2 ώρες).

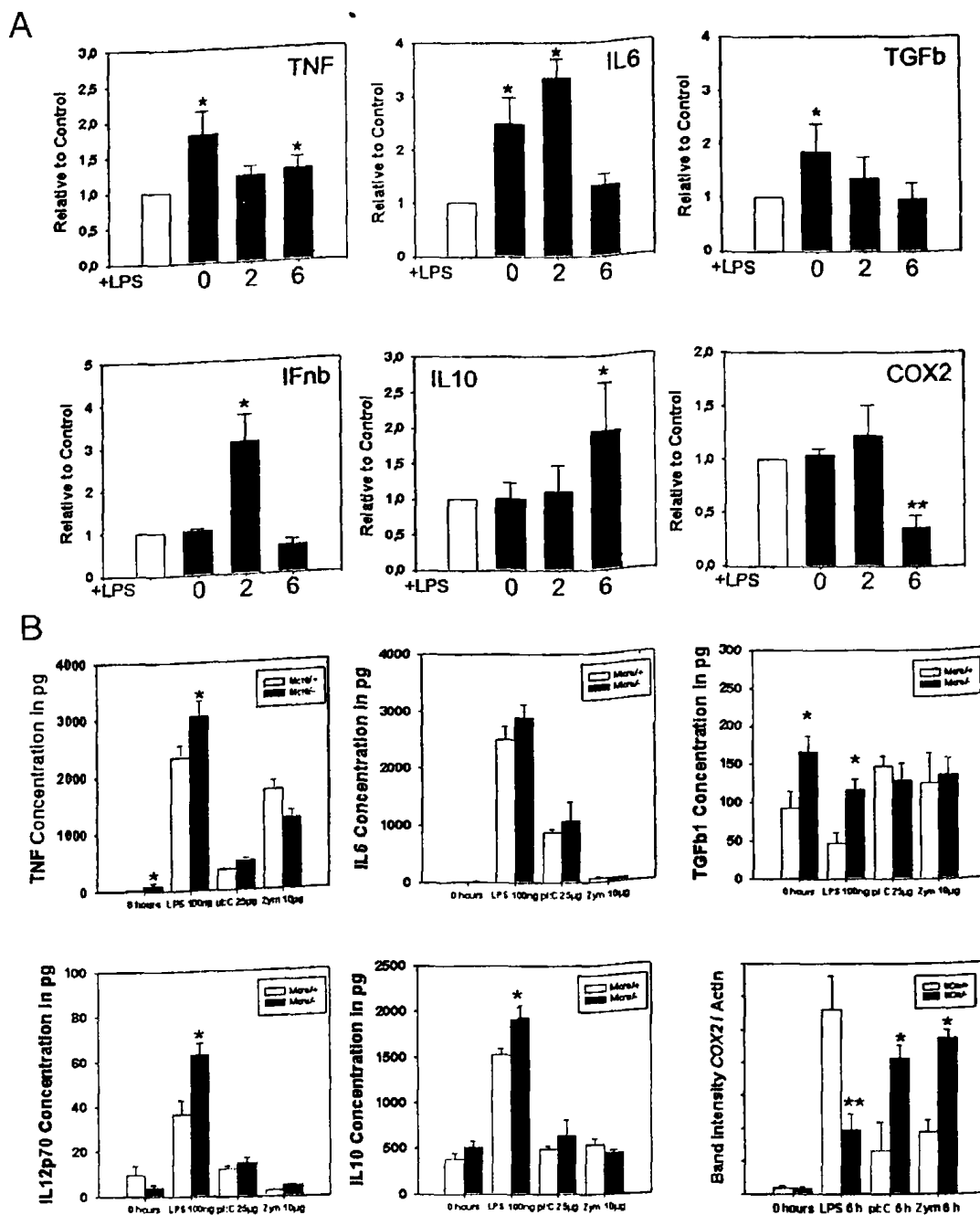


Εικόνα 3.11. Η έκφραση και η σηματοδότηση των TLRs δεν επηρεάζεται από την απώλεια της HuR. (A) Κυτταρομετρία ροής σε MMO μακροφάγα μέσω ενδοκυτταρικής χρώσης με αντισώματα για τις πρωτεΐνες HuR, TLR2, TLR3, TLR4 μετά από αναστολή του συμπλέγματος golgi με Brefeldin A (B) Στύπωμα Western για τις φωσφορυλιωμένες και τις φυσιολογικές μορφές των κινασών JNK, p38 και ERK και ποσοτικοποίηση με βάση την ακτίνη. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την πρωτεϊνική ανάλυση ήταν MMO ερεθισμένα για 30 λεπτά με LPS σε συγκέντρωση 100ng/ml.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η απόκριση αντιφλεγμονωδών και ανοσορρυθμιστικών μορίων απουσία της HuR. Για παράδειγμα το mRNA της αντιφλεγμονώδους IL-10 εμφανίζεται αυξημένο μόνον στις 6 ώρες μετά την επαγωγή γεγονός που υποδεικνύει ότι το πρότυπο βιοσύνθεσης της αλλάζει χρονικά για να καταστείλει μια άρρυθμη παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων. Αντίθετα το mRNA του TGFβ βρίσκεται αυξημένο μόνον κατά την ανερέθιστη και την επαγωγική φάση ενδεχομένως για την εξισορρόπηση της οξείας προ-φλεγμονώδους απόκρισης. Τέλος το mRNA της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX2), που ρυθμίζει την βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, μειώνεται δραματικά κατά την κατασταλτική φάση ενώ το mRNA της ανοσορρυθμιστικής IL-12 δεν επηρεάζεται (αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Για να συσχετίσουμε τις αλλαγές των mRNA στη βιοσύνθεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών αναλύσαμε την παρουσία τους είτε σε υπερκείμενα καλλιέργειών (για εκκρινόμενες πρωτεΐνες) ή σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (για την ενδοκυττάρια COX2) (Εικόνα 3.12.B). Οι μελέτες μας επεκταθήκαν σε μετρήσεις από καλλιέργειες HuR⁻ μακροφάγων που είχαν ερεθιστεί και από προσδέτες των υποδοχέων TLR, πέραν του TLR4, όπως του ιϊκού υποδοχέα TLR3 από πολυϊνοσινικό:πολυκυτιδυλικό οξύ (polyinosinic:polycytidylic acid, poly I:C) και του υποδοχέα TLR2 που αναγνωρίζει ειδικές δομές υδατανθράκων όπως η γλυκάνη Zymozan. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αλλαγών σε mRNA και αυτών σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απώλεια της HuR. Συγκεκριμένα οι αυξήσεις των mRNA των TNF, IL6, IL10 και TGFβ σχετίζονται μόνο με στατιστικά σημαντικές αλλά μικρές αυξήσεις στις πρωτεΐνες των TNF, IL10, μεγαλύτερες στον TGFβ και καθόλου στην IL6 και μόνον στην περίπτωση του LPS. Αντίθετα η πρωτεΐνη της IL-12 αυξάνεται δραματικά μόνον παρουσία LPS παρά την έλλειψη αλλαγής του mRNA της. Τέλος η πρωτεΐνη της COX2 μειώνεται όπως και το mRNA της στην περίπτωση του LPS αλλά αυξάνεται στις περιπτώσεις άλλων ερεθισμάτων.

Από τα παραπάνω προκύπτουν τα ακόλουθα πρότυπα αντίδρασης φλεγμονωδών μορίων σε μακροφάγα που υπολείπονται της HuR: (α) αυξημένη συσσώρευση mRNA αλλά σχετικά μικρότερη αύξηση στην πρωτεΐνη και μόνο μετά από ερεθισμό από τον υποδοχέα TLR4 (π.χ. TNF, IL10), (β) αυξημένη συσσώρευση mRNA αλλά σχετικά μεγαλύτερη αύξηση στην πρωτεΐνη και μόνο μετά από ερεθισμό από τον υποδοχέα TLR4 (π.χ. TGFβ), (γ) αυξημένη συσσώρευση mRNA αλλά αδιαφοροποίητη παραγωγή πρωτεΐνης (π.χ. IL-6), (δ) αδιαφοροποίητη συσσώρευση



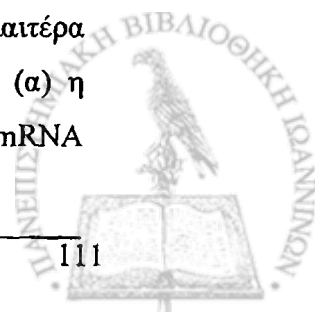
Εικόνα 3.12. Η απώλεια της HuR προκαλεί μεταβολές στην σύνθεση βασικών προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών. (Α) Ποσοτική ανίχνευση των επιπέδων κυτταροκινών με PCR πραγματικού χρόνου από MMO μακροφάγα σε ανερέθιστη κατάσταση και μετά από ερεθισμό με 100 ng/ml LPS για 2 και 6 ώρες. (Β) Ποσοτική ανίχνευση πρωτεϊνών με ELISA και στυπωμάτων Western σε υπερκείμενα και εκχυλίσματα MMO μακροφάγων πριν και μετά το ερεθισμό με LPS, Zymosan και pI:C. Παρουσιάζονται μέσες τιμές (+SD) από 3 ανεξάρτητα πειράματα με ανεξάρτητες καλλιέργειες από 3 ζώα/ομάδα. Στατιστικά σημαντικές αυξήσεις (*) ή μειώσεις (**) σχετίζονται με $p < 0.01$

mRNA αλλά αυξημένη παραγωγή πρωτεΐνης (πχ. IL-12) και (ε) μειωμένη συσσώρευση mRNA και πρωτεΐνης μόνον μετά από ερεθισμό από τον υποδοχέα TLR4 και εντελώς διαφοροποιημένη κατάσταση στις περιπτώσεις άλλων υποδοχέων TLR. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι (α) οι δράσεις της HuR μπορεί να είναι τόσο θετικές όσο και αρνητικές για τη βιοσύνθεση των προφλεγμονωδών παραγόντων και ενδέχεται να ποικίλουν με βάση το προφλεγμονώδες ερέθισμα (β) οι επιδράσεις της HuR ποικίλουν ανάλογα με το mRNA και (γ) οι επιδράσεις της HuR στη συσσώρευση του RNA έναντι της πρωτεϊνοσύνθεσης μπορεί να διαφέρουν με άμεσο αντίκτυπο στο ισοζύγιο προφλεγμονωδών/αντιφλεγμονωδών παραγόντων και την ανάπτυξη της φλεγμονής.

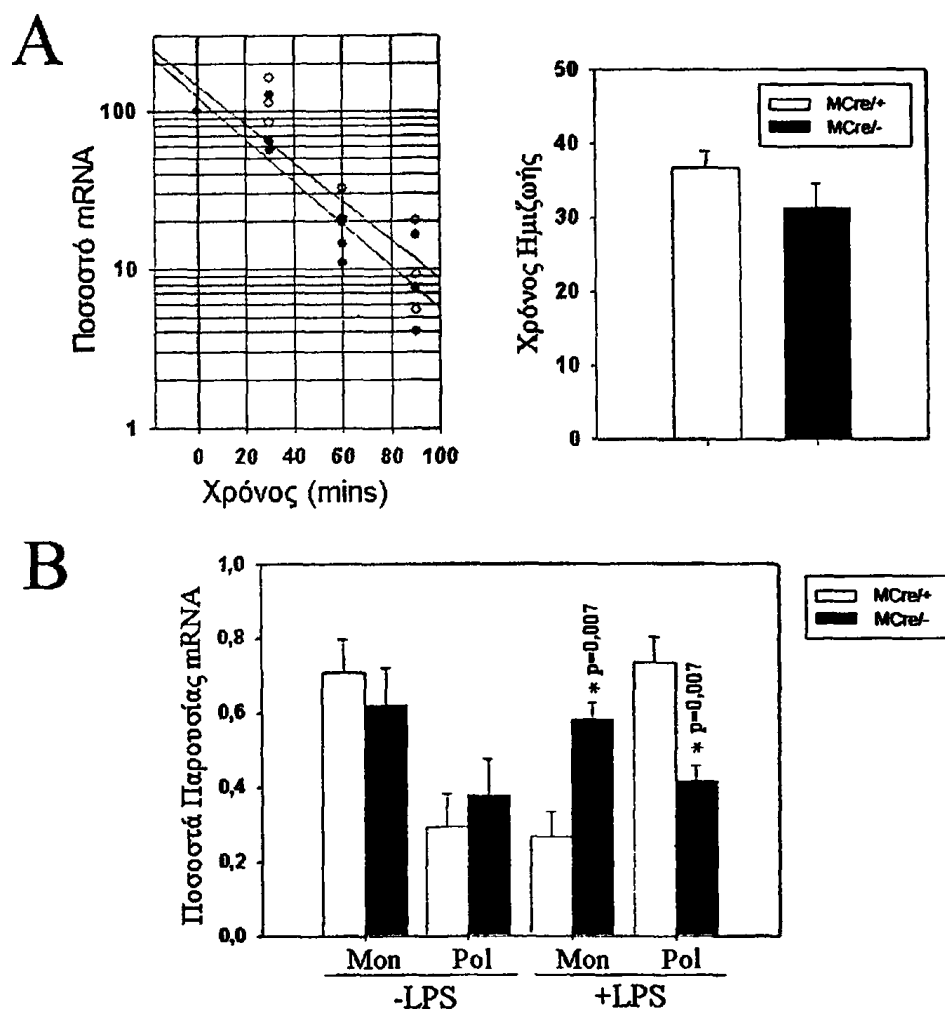
3.2.5. Διαχωρισμός των μετα-μεταγραφικών δράσεων της HuR: Το παράδειγμα του TNF.

Για να διαλευκάνουμε το πως ή HuR επηρεάζει την μεταμεταγραφική χρήση των mRNA που προσδένει επιλέξαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την επίδραση της απώλειας της HuR στη μεταμεταγραφική ρύθμιση του mRNA του TNF. Το mRNA αυτό επιλέχθηκε διότι: (α) υπάρχει αποδεδειγμένη συσχέτιση μεταξύ της ρύθμισης της βιοσύνθεσης του από τα στοιχεία ARE τύπου II και της δυσλειτουργίας τους στην πρόκληση φλεγμονής (Kontoyiannis et al. 1999), (β) υπάρχει αποδεδειγμένη και αποκλειστική πρόσδεση της HuR στα στοιχεία ARE του mRNA του TNF μετά από ερεθισμό μακροφάγων με LPS (Katsanou et al. 2005), (γ) η υπερέκφραση της HuR σε αυτά τα κύτταρα αυξάνει τη σταθερότητα και τη συσσώρευση του mRNA του TNF αλλά καταστέλλει τη μετάφραση του (Katsanou et al. 2005). Κατά συνέπεια το mRNA του TNF αποτελεί ένα καλό πρότυπο για τις αντιδράσεις των mRNA με στοιχεία ARE τύπου II που προσδένονται στη HuR.

Για να διευκρινίσουμε εάν η αυξημένη συσσώρευση του mRNA του TNF στα HuR⁻ μακροφάγα προκαλείται από την αύξηση της σταθερότητας του, ενεργοποιήσαμε καλλιέργειες HuR⁺ και HuR⁻ μακροφάγων με LPS και μετρήσαμε την απώλεια του mRNA του TNF με qRT-PCR στη μονάδα του χρόνου παρουσία μεταγραφικού καταστολέα Ακτινομυκίνη D. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.13A, ο χρόνος ημίσειας ζωής του mRNA του TNF δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα στις καλλιέργειες HuR⁻ μακροφάγων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι (α) η παρουσία της HuR μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της σταθερότητας του mRNA



του TNF αλλά δεν είναι απαραίτητη για ρύθμιση της και (β) ότι η HuR επηρεάζει άλλες άγνωστες μεταγραφικές ή μεταμεταγραφικές (π.χ. πυρηνικοκυτταροπλασματική μεταφορά, μάτισμα) διεργασίες που δεν έχουν αξιολογηθεί ως τώρα.



Εικόνα 3.13. Αντίρροπες δράσεις της HuR στην μεταμεταγραφική ρύθμιση του mRNA του TNF.

(A) Ποσοτική ανίχνευση με PCR πραγματικού χρόνου του ρυθμού εξαφάνισης του mRNA του TNF και υπολογισμός του χρόνου ημιζωής του σε MMO μακροφάγα μετά από ερεθισμό με LPS και ακτινομικίνη D. Αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (B) Κατανομή του του mRNA του TNF σε μονοριβωσωμικά και πολυριβωσωμικά κλάσματα μακροφάγων με και χωρίς LPS και μετά από ποσοτικοποίηση με qRT-PCR. Υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (p) από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Τέλος για να διευκρινίσουμε εάν η HuR επηρεάζει τη μεταφρασιμότητα του mRNA του TNF, μετρήσαμε την παρουσία του στα πολυριβωσώματα, σε μακροφάγα μετά από διαχωρισμό, κλασματοποίηση μονοριβωσωμικών και πολυριβωσωμικών RNA και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.13B, η παρουσία LPS στα HuR⁺ και μακροφάγα προκαλεί την άμεση μεταφορά του mRNA του TNF στα πολυριβωσώματα. Αντίθετα, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση των HuR⁻ μακροφάγων και αυτός είναι ενδεχομένως ο λόγος για την μικρή αύξηση της πρωτεΐνης TNF παρά την αυξημένη συσσώρευση του mRNA του. Συνεπώς και σε σύγκριση με τα πειράματα υπερέκφρασης (Katsanou et al. 2005) η HuR είναι απαραίτητη για τη μετάφραση του mRNA του TNF αλλά όταν τα επίπεδα της ανεβαίνουν του φυσιολογικού, τότε προκαλεί καταστολή της μεταφραστικής δραστηριότητας.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων μας προκύπτει ότι η HuR ρυθμίζει κατά κύριο λόγο τη μετάφραση φλεγμονωδών παραγόντων με διαφορετικό τρόπο και ότι η απορύθμιση της μπορεί να έχει τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιπτώσεις στο ισοζύγιο της φλεγμονής.

3.3. Ο ρόλος της έμφυτης HuR στην ρύθμιση της εντερικής φλεγμονής

3.3.1. Η HuR δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας που εμπλέκονται στην ανάπτυξη οξείας ΙΦΝΕ

Το προαναφερθέν πειραματικό πρότυπο της σηπτικής καταπληξίας (δηλαδή της ενδοτοξαιμίας) μας αποκάλυψε ότι η HuR μπορεί να παίζει ένα αντιφλεγμονώδη ρόλο στην οξεία φλεγμονώδη απάντηση στην λοίμωξη. Παρά ταύτα, η υψηλή και συστηματική δραστικότητα της χορήγησης των LPS *in vivo*, δεν μπορεί να προσομοιάσει τη βαθμιαία κινητική της φλεγμονώδους ανοσολογικής απάντησης όπως αυτή λαμβάνει χώρα σε κανονικές συνθήκες λοίμωξης ή αυτοφλεγμονής. Κατά συνέπεια το κατά πόσο η απορρύθμιση της βιοσύνθεσης των προ-φλεγμονωδών και των αντιφλεγμονωδών παραγόντων -που παρουσιάζεται ως αποτέλεσμα της απώλειας της HuR σε κύτταρα της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης- μπορεί να επηρεάσει τη βαθμιαία ανάπτυξη οξείας και χρόνιας φλεγμονής δεν μπορεί να απαντηθεί από το πρότυπο της ενδοτοξαιμίας. Αντίθετα, η πλειοτροπική δράση της HuR προς τη ρύθμιση των δικτύων των κυτταροκινών στη φλεγμονή μπορεί να μελετηθεί στο πλαίσιο μιας οργανοειδικής φλεγμονώδους αντίδρασης σε ιστούς που έρχονται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον (π.χ. βλεννογόνους) όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της εντερικής φλεγμονής και των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου (ΙΦΝΕ-δηλαδή της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου του Crohn).

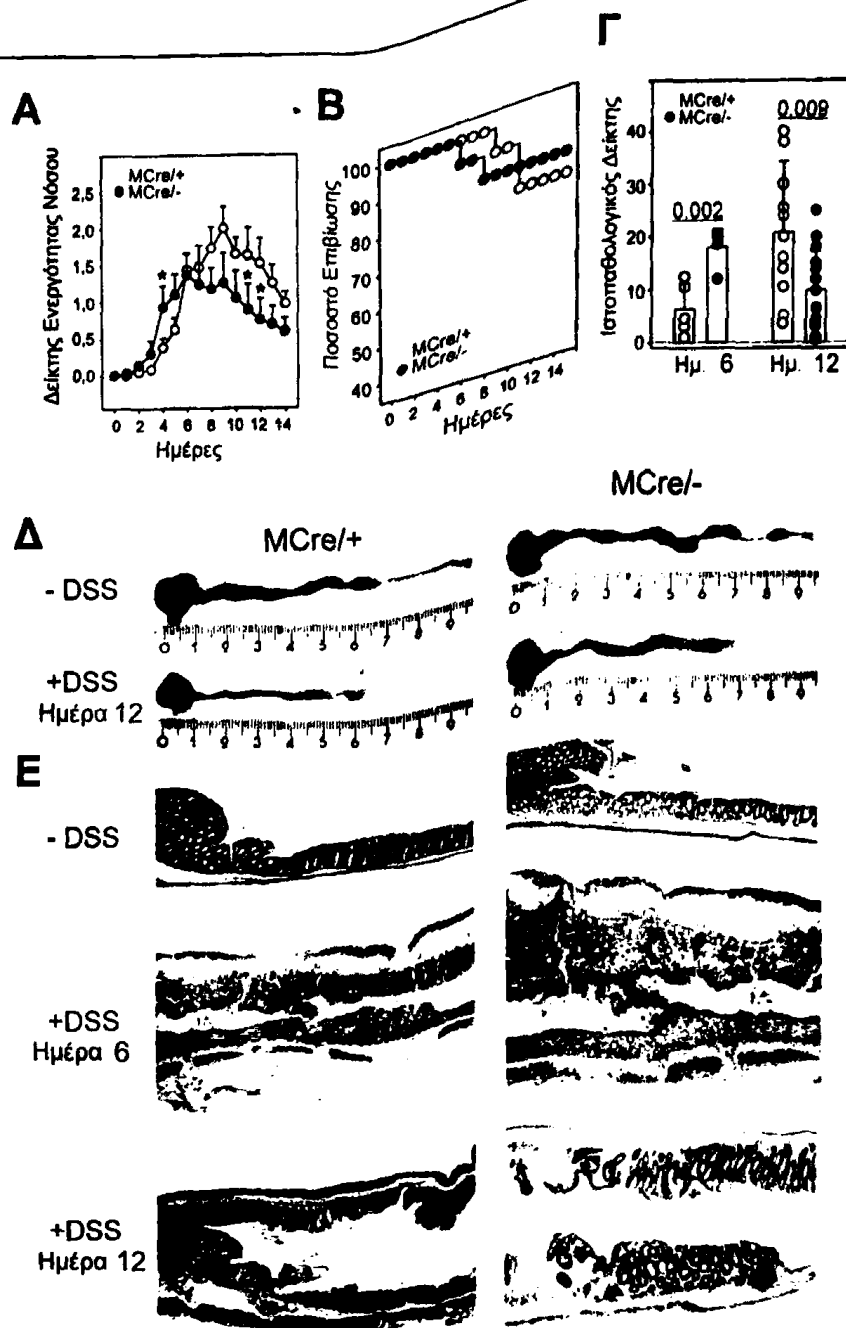
Οι ΙΦΝΕ αποτελούν χρόνια πολυπαραγοντικά νοσήματα και περιλαμβάνουν τόσο τις άρρυθμες αποκρίσεις της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης και του εντερικού βλεννογόνου όσο και της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης (απώλεια ανοσοανοχής κλπ). Παρά ταύτα υπάρχει ένα πλήθος πειραματικών προτύπων ΙΦΝΕ στον ποντικό που εγείρουν την μια ή την άλλη μορφή της αντίδρασης και επιτρέπουν την απομονωμένη μελέτη των εμπλεκόμενων συστημάτων. Ένα κλασσικό πειραματικό πρότυπο ΙΦΝΕ που χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη των έμφυτων αντιδράσεων είναι η φλεγμονώδης κολίτιδα που επάγεται από την συστηματική χορήγηση της γλυκάνης δεξτράνη με τη μορφή του θεικού του άλατος του νατρίου (Dextran sodium sulfate, DSS) (Wirtz et al. 2007). Το DSS είναι τοξικό για τα

επιθήλια του παχέως εντέρου του ποντικού και η χορήγηση του στο πόσιμο νερό προκαλεί οξεία κολίτιδα τύπου Crohn's με όλη τη σχετιζόμενη συμπτωματολογία όπως διάρροια, απώλεια βάρους και αίματος στα κόπρανα και ενίοτε θανάτου (τα οποία αθροιστικά αποτελούν τον δείκτη ενεργότητας της νόσου), ενώ αναστέλλεται με την αφαίρεση του DSS. Ιστολογικά η ανάπτυξη της νόσου εμφανίζεται με τη μορφή διατοιχωματικού φλεγμονώδους διηθήματος πολυμορφοπύρηνων και μακροφάγων κυττάρων και την σταδιακή απώλεια των επιθηλιακών κρυπτών με τελική κατάληξη την απώλεια το εντερικού βλεννογόνου. Για τη μελέτη της οξείας μόνον φάσης της νόσου, το DSS αφαιρείται την 6^η ημέρα της χορήγησης για να επέλθει η σταδιακή ύφεση της νόσου μετά την 12^η ημέρα όπου αρχίζει η σταδιακή ανασύσταση των κρυπτών, η ανάπλαση του επιθηλίου και η ύφεση της φλεγμονής.

Με βάση τα παραπάνω, εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο επαγωγής κολίτιδας από DSS σε ποντικούς με ή χωρίς την μυελοειδική απαλοιφή της HuR, δηλαδή τους ποντικούς *MCre/-* & *MCre/+*. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.14.A, φαινοτυπικά οι ποντικοί *MCre/-* παρουσίασαν πρώιμο δείκτη ενεργότητας στην επαγωγική φάση όπου η συμπτωματολογία της νόσου εμφανίζεται δύο ημέρες πριν από αυτή των αντιστοιχών μαρτύρων, ενώ η ύφεση των συμπτωμάτων μετά την αφαίρεση του DSS την 6^η ημέρα ήταν άμεση στους *MCre/-* και όχι σταδιακή όπως στους *MCre/+* ποντικούς. Ο δείκτης επιβίωσης και των δύο ομάδων ήταν αντίστοιχος και η μακροσκοπική ανάλυση του παχέως εντέρου έδειξε τον ίδιο βαθμό συρρίκνωσης. Παρά ταύτα, η μακροσκοπική εικόνα των εντέρων από τους *MCre/-* ποντικούς ήταν καλύτερη. Η ιστοπαθολογική ανάλυση (Εικόνα 3.14. A&E) των εντέρων αυτών κατά τις φάσεις έξαρσης (6^η ημέρα) και αρχικής ύφεσης της νόσου (12^η ημέρα) αποκάλυψε:

- (α) την πλέον εκτεταμένη φλεγμονώδη διήθηση κατά την 6^η ημέρα στα δείγματα από τους *MCre/-* ποντικούς και την ολοκληρωτική απώλεια του επιθηλίου έναντι της λιγότερο εκτεταμένης διάβρωσης και τις συντήρησης δομών επιθηλίου στα δείγματα από τους *MCre/+* ποντικούς.
- (β) την πολύ γρήγορη ανασύσταση των κρυπτών κατά τη 12^η ημέρα στα δείγματα από τους *MCre/-* ποντικούς σε αντίθεση με την σχεδόν ολοκληρωτική απουσία της στα δείγματα από τους *MCre/+* ποντικούς.



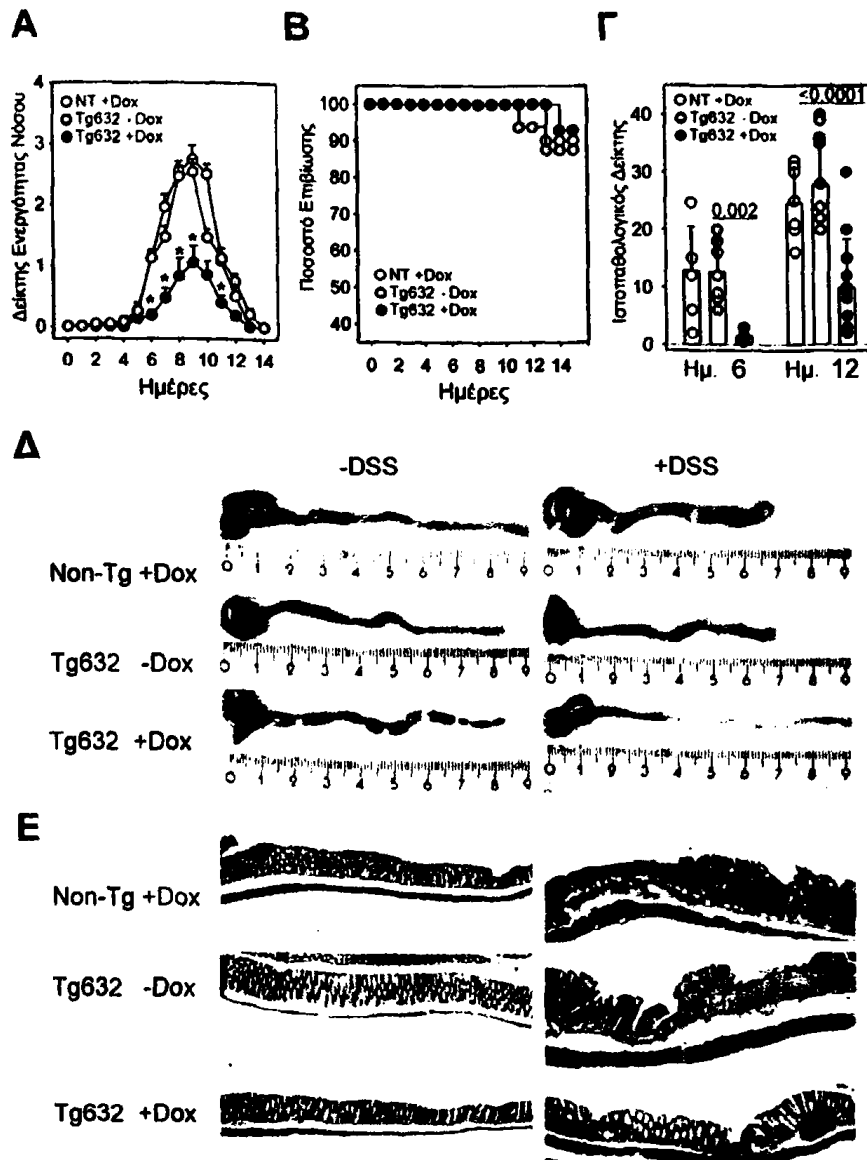


Εικόνα 3.14. Η αφαίρεση της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης επιταχύνει την ανάπτυξη εντερικής φλεγμονής αλλά και προκαλεί την γρήγορη ανασύσταση του εντερικού βλεννογόνου μετά από ερεθισμό με DSS. Γραφική αναπαράσταση των μακροσκοπικών δεικτών ενεργότητας της νόσου (Α), ποσοστών επιβίωσης (Β) και των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων σε δείγματα παχέως εντέρου (Γ) ποντικών MCr^{-/-} (n=20) και μάρτυρων (MCr^{+/+}, n=20) κατά τη χορήγηση 1.5% DSS. (Δ) Στεροσκοπική εικόνα τμημάτων εντέρου (παχύ έντερο από το τυφλό έως και το ορθό, πριν και μετά από τη χορήγηση DSS σε ποντικούς MCr^{-/-} και μάρτυρες (MCr^{+/+}). (Ε) Ιστολογική εικόνα τμημάτων παχέως εντέρου από ποντικούς MCr^{-/-} και μάρτυρες πριν, και 6 ή 12 ημέρες μετά τη χορήγηση DSS. Παρουσιάζονται μικροφωτογραφίες (x40) από τομές παραφίνης μετά από χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης.

Συνεπώς η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσιακής απόκρισης αυξάνει από τη μια πλευρά το προφλεγμονώδες δυναμικό της εντερικής φλεγμονής αλλά από την άλλη προκαλεί την γρήγορη ύφεση της και την ανασύσταση του επιθηλίου.

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HuR είναι ενδεχομένως εκμεταλλεύσιμες για την αντιμετώπιση της οξείας φάσης των ΙΦΝΕ. Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα μας από το σύστημα της απαλοιφής και ελέγχουμε το θεραπευτικό δυναμικό της HuR εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο κολίτιδας από DSS σε ποντικούς που υπερεκφράζουν μυελοειδικά και επαγώγιμα τη HuR (διαγονιδιακοί ποντικοί *Tg632* (Katsanou et al. 2005). Στο σύστημα αυτό η διαγονιδιακή υπερέκφραση της HuR επάγεται από την δράση ενός διενεργοποιητή τετρακυκλίνης ο οποίος ενεργοποιείται από την παρουσία αναλόγων τετρακυκλίνης (π.χ. Δοξυκυκλίνη, Dox) και εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Ως μάρτυρες των πειραμάτων μας χρησιμοποιήθηκαν φυσικού τύπου ποντικοί στους οποίους είχε χορηγηθεί Dox καθώς και ποντικοί *Tg632* χωρίς Dox, ενώ η ομάδα δοκιμασίας ήταν ποντικοί *Tg632* στους οποίους είχε χορηγηθεί Dox. Τα αποτελέσματα μας ήταν εντυπωσιακά και έδειξαν ότι η υπερέκφραση της HuR στους ποντικούς *Tg632* (+Dox) μείωσε δραματικά την ενεργότητα της νόσου (**Εικόνα 3.15.A**) και την ανάπτυξη εντερικής φλεγμονής (**Εικόνα 3.15.Γ-Ε**).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι: (α) η HuR δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας αλλά επηρεάζει και την ανασύσταση του εντερικού επιθηλίου, γεγονός που σχετίζεται τόσο με την ρύθμιση της βιοσύνθεσης προφλεγμονοδών παραγόντων (TNF) όσο και την βιοσύνθεση αντιφλεγμονοδών/αναδομικών παραγόντων (IL-10, TGFβ) και (β) η επιλεκτική υπερέκφραση της HuR αποτελεί μια νέα στρατηγική θεραπευτικής αντιμετώπισης της οξείας φλεγμονής.

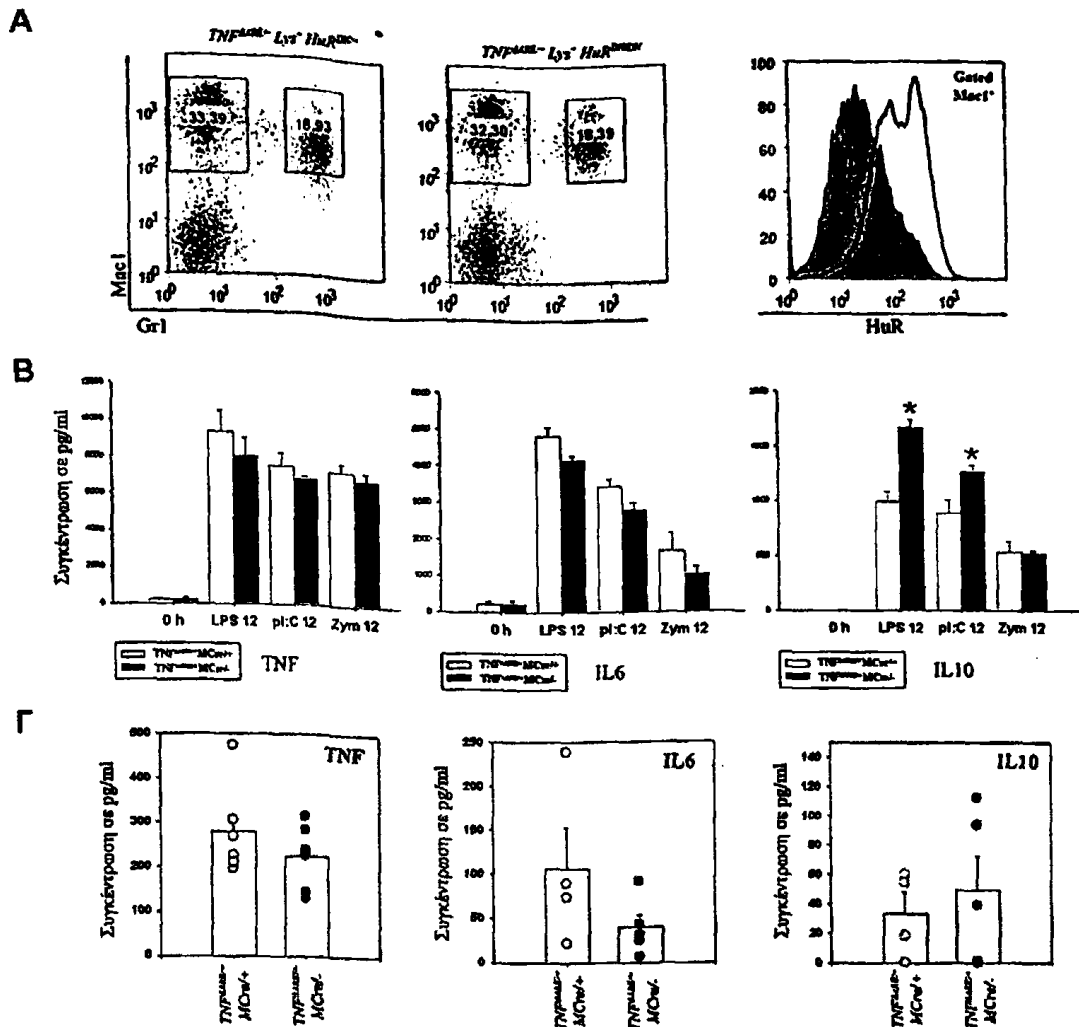


Εικόνα 3.15. Η αύξηση της έκφρασης της HuR σε κύτταρα της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης καταστέλλει την ανάπτυξη εντερικής φλεγμονής μετά από ερεθισμό με DSS. Γραφική αναπαράσταση των μακροσκοπικών δεικτών ενεργότητας νόσου (A), ποσοστών επιβίωσης (B) και των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων σε δείγματα παχέως εντέρου (Γ) διαγονιδικών ποντικών Tg632 παρουσία δοξυκυκλίνης (Dox-n=15) καθώς και μαρτύρων φυσικού τύπου (Non-Tg/n=10) παρουσία δοξυκυκλίνης και ποντικών Tg632 απουσία δοξυκυκλίνης (n=10) κατά τη χορήγηση 2% DSS (Δ) Στεροσκοπική εικόνα τμημάτων εντέρου (παχύ έντερο από το τυφλό έως και το ορθό, πριν και μετά από τη χορήγηση DSS σε ποντικούς Tg632 παρουσία δοξυκυκλίνης (Dox) καθώς και στους μάρτυρες. (Ε) Ιστολογική εικόνα τμημάτων παχέως εντέρου από ποντικούς Tg632 παρουσία δοξυκυκλίνης (Dox) και από τους μάρτυρες πριν, και 12 ημέρες μετά τη χορήγηση DSS. Παρουσιάζονται μικροφωτογραφίες (x40) από τομές παραφίνης μετά από χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης.

3.3.2. Συσχέτιση των δράσεων της HuR με το TNF 3'ARE προς τη βιοσύνθεση του TNF και ως προς την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονώδους ΙΦΝΕ επαγόμενης από τον TNF.

Η συσχέτιση της μεταμεταγραφικής ρύθμισης του TNF από τη HuR καθώς και ο πολλαπλός της ρόλος στη ρύθμιση της μελοποίησης και της φλεγμονής έγειρε το ερώτημα αν αυτές οι δράσεις συγκλίνουν ή όχι; Για να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα διασταυρώσαμε τους ποντικούς MCre/- με τους ποντικούς $TNF^{ΔARE/+}$. Οι ποντικοί $TNF^{ΔARE/+}$ φέρουν μια μεταλλαγή αφαίρεσης των στοιχείων ARE του TNF και εμφανίζουν αρθρίτιδα και χρόνια ΙΦΝΕ τύπου Crohn's λόγω της αυξημένης σταθερότητας και μεταφρασιμότητας του TNF σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων την έμφυτης ανοσίας. Συνεπώς το σύστημα αυτό επιτρέπει τόσο επαλήθευση του ρόλου των RBP ως προς τα ARE όσο και την εμπλοκή τους σε καταστάσεις σηματοδοτούμενες από τον TNF.

Όπως παρουσιάζεται στη Εικόνα 3.16Α, η απαλοιφή του TNF3'ARE από τους $TNF^{ΔARE/+}$ MCre/- ποντικούς προκάλεσε την διαρκή παραγωγή HuR⁺ μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων κυττάρων *in vivo* σε ποσοστά υψηλότερα από αυτά στους MCre/- ποντικούς. Επιπρόσθετα, η ανάλυση της έκκρισης κυτταροκινών από $TNF^{ΔARE/+}$ MCre/- μακροφάγα κύτταρα μετά από ερεθισμό με LPS έδειξε ότι η βιοσύνθεση του TNF παραμένει ανεπηρέαστη και υψηλή απουσία της HuR και των στοιχείων ARE γεγονός που αποδεικνύει τη φυσική τους συνεργία. Αντίθετα, η παραγωγή της IL-10 αυξάνεται ακόμα περισσότερο στα μακροφάγα αυτά γεγονός που υποδηλώνει την αποκλειστική δράση της HuR προς την επαγωγή της IL-10 από τόσο από τους υποδοχείς TLR όσο και από τους υποδοχείς του TNF. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στις ίδιες καλλιέργειες τα επίπεδα της IL-6 μειώνονται ελαφρά γεγονός που υποδηλώνει ότι η HuR ρυθμίζει έμμεσα ή άμεσα την μετάφραση του mRNA της. Αντίστοιχες ήταν και οι μετρήσεις στον ορό των $TNF^{ΔARE/+}$ MCre/- ποντικών (Εικόνα 3.16 Β&Γ).



Εικόνα 3.16. Η απώλεια της HuR σε μυελοκύτταρα και των ARE στοιχείων του mRNA του TNF ενισχύει το μυελοειδικό δυναμικό και αποκαλύπτει τη συσχέτιση των δύο μεταλλαγών. (A) Κυτταρομετρική ανίχνευση των επιπέδων της HuR (ιστογράμματα- $TNF^{dARE/+} MCre^{+/+}$ γραμμικό, $TNF^{dARE/+} MCre^{-/-}$ σκιασμένο, ιστοτυπικό αντίσωμα διακεκομμένο) σε ώριμα Mac1⁺ μακροφάγα και πολυμορφοπύρηνια κύτταρα (dot plot). (B) Ποσοτική ανίχνευση κυτταροκινών με ELISA σε υπερκείμενα ΜΜΟ μακροφάγων πριν και μετά το ερεθισμό με LPS, Zymosan και pI:C. Παρουσιάζονται μέσες τιμές (+SD) από 3 ανεξάρτητα πειράματα με ανεξάρτητες καλλιέργειες από 2 ζώα/ομάδα. (*) Στατιστικά σημαντικές αυξήσεις με $p < 0.05$. (C) Επίπεδα κυτταροκινών σε ορούς $TNF^{dARE/+} MCre^{+/+}$ και $TNF^{dARE/+} MCre^{-/-}$ ποντικών ηλικίας 2 μηνών. Παρουσιάζονται ανεξάρτητες και μέσες τιμές και μέσοι όροι ($\pm$ SD) από μετρήσεις των αντίστοιχών ELISA.

Οι ποντικοί $TNF^{ARE/+}$ $MCr/-$ ανέπτυξαν τον φαινότυπο της αρθρίτιδας όπως και οι μάρτυρες γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο μιας και αυτή η παθολογία βασίζεται στην ενεργοποίηση των υμενοκυττάρων της άρθρωσης και όχι στα διηθηματικά κύτταρα της έμφυτης ανοσίας (Kontoyiannis et al. 1999, Armarka et al. 2008). Παρά ταύτα η ιστολογική ανάλυση τμημάτων ειλεού και παχέως εντέρου έδειξε αλλαγές στην ανάπτυξη και τη δριμύτητα της TNF- επαγόμενης ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα και με βάση ένα προαναφερθέν σύστημα μέτρησης οξείας και χρόνιας φλεγμονής (Kontoyiannis et al. 2002), παρουσίασαν αύξηση στους δείκτες της οξείας φλεγμονής και μείωση στη μετατροπή της σε χρόνια (Πίνακας 3.2.). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές που προκύπτουν από την απώλεια της HuR σε φλεγμονώδη σήματα που επάγονται από τον TNF ενισχύουν την ανάπτυξη και παρατείνουν την παρουσία των έμφυτων φλεγμονωδών αντιδράσεων στο πλαίσιο μιας χρόνιας παθολογίας.

Πίνακας 3.2. Επίδραση της απώλειας της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης στην ανάπτυξη και τη δριμύτητα της ΙΦΝΕ των $Tnf^{ARE/+}$ ποντικών[§]

Γονότυπος	Αριθμός	Είδος Φλεγμονής	Ανάπτυξη Φλεγμονής ^α				Δριμύτητα ^β	p ^γ
			0-0.5	0.5-1	1.5-2	2.5-3.5		
$MCr/+$	5	Οξεία ^δ	3	1			0.4+0.1	
		Χρόνια ^ε	5				0.2+0.1	
$MCr/-$	5	Οξεία	4	1			0.4+0.3	
		Χρόνια	4	1			0.2+0.2	
$Tnf^{ARE/+}$	6	Οξεία			4	2	2.1+0.8	
		Χρόνια		4	1	1	1.4+0.3	
$Tnf^{ARE/+}$ $MCr/+$	12	Οξεία		1	7	3	2.2+0.2	
		Χρόνια		3	6	1	1.6+0.2	
$Tnf^{ARE/+}$ $MCr/-$	18	Οξεία		2	6	10	3.2+0.1	*0.007
		Χρόνια	4	8	4	2	1.1+0.1	*0.04

[§] Ηλικίας 8-10 εβδομάδων ανεξαρτήτως φύλου

^α Κατανομή δριμύτητας

^β Μέση δριμύτητα

^γ Στατιστικά σημαντικές διαφορές με τιμές μάρτυρα $Tnf^{ARE/+}$ $MCr/+$

^δ Σχετικά με τον αριθμό των διηθηματικών πολυμορφοπύρηνων κυττάρων

^ε Σχετικά με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων

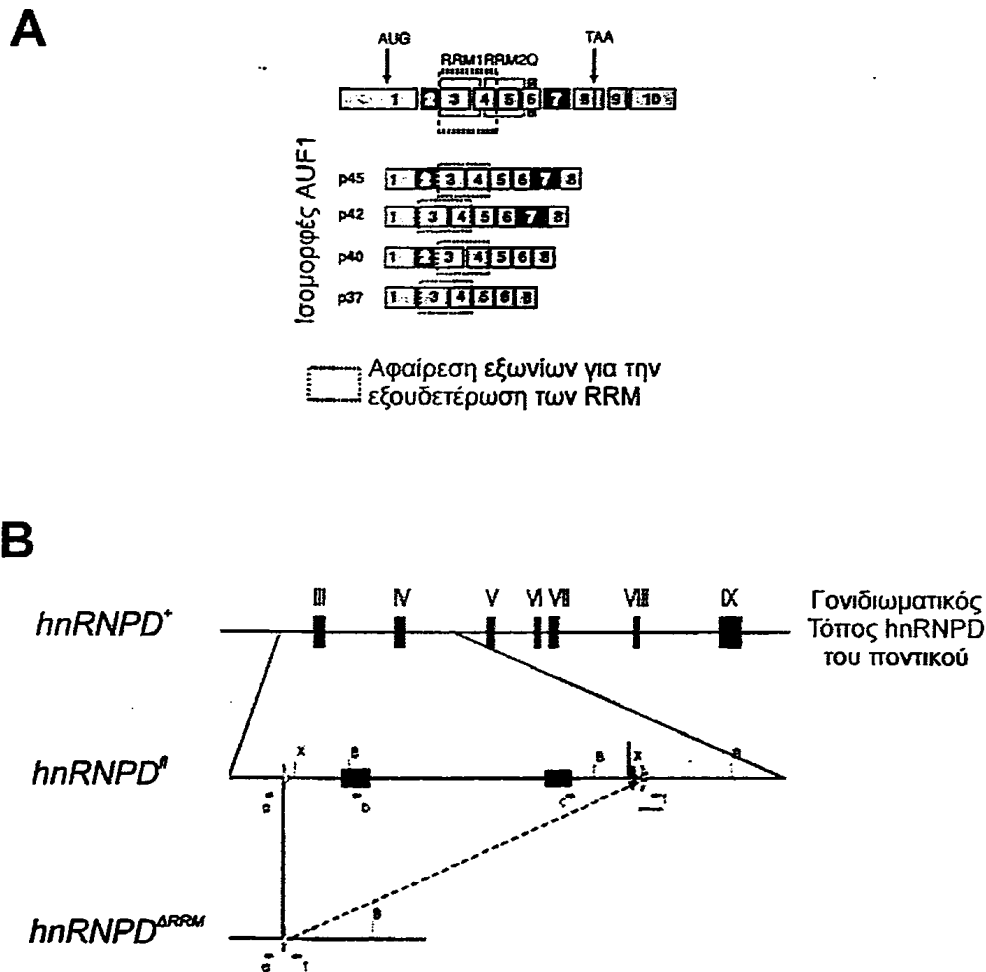
3.4. Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της hnRNP/D/AUF1 στην έμφυτη ανοσιακή απόκριση.

3.4.1. Δημιουργία συστήματος μυελοειδικής απαλοιφής της RBP hnRNP/D/AUF1

Η RBP hnRNP/D (AUF1) έχει ποικίλες δράσεις και θεωρείται ως ένας από τους ανταγωνιστές της HuR ως προς την παράμετρο της σταθεροποίησης μηνυμάτων. Παρά ταύτα, το ενδεχόμενο εμπλοκής της AUF1 παρέμενε για χρόνια ασαφές και αποκαλύφθηκε μέσω της διαγονιδιακής του απαλοιφής στον ποντικό. Αυτοί οι AUF1^{-/-} ποντικοί παρουσίασαν μια σειρά από φαινοτυπικές αλλοιώσεις συμπεριλαμβανομένης και της ανάπτυξης φλεγμονώδους δερματίτιδας, ενώ παρουσίασαν και αυξημένη ευαισθησία στη πειραματική πρόκληση της ενδοτοξαιμίας (Lu et al. 2006, Sadri and Schneider, 2009). Παρά το γεγονός ότι η μελέτη των ποντικών αυτών συσχέτισε την απώλεια του AUF1 με την υπερέκφραση προφλεγμονωδών μορίων, δεν μπόρεσε να αποδείξει έναν μονοσήμαντο και αποκλειστικό ρόλο για τον AUF1 στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων μιας και οι ποντικοί αυτοί εμφάνιζαν και άλλες φαινοτυπικές αλλοιώσεις και η μεταλλαγή δεν περιοριζόταν σε έναν κυτταρικό τύπο.

Στην παρούσα μελέτη αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε μια νέα μεταλλαγή η οποία καθιστά τον AUF1 λειτουργικά ανενεργό. Πιο συγκεκριμένα και σε συνεργασία με την εταιρεία Reentering Pharmaceuticals και τη χρήση της τεχνολογίας Velocipede που επιτρέπει τη γρήγορη στόχευση μεταλλαγών σε γωνιακούς τόπους ποντικού, αναπτύχθηκαν ποντικοί που φέρουν την προσθήκη αλληλουχιών lox εκατέρωθεν των αιωνίων 3 & 4 του γονιδίου του *horned* του ποντικού (*hnRNP/D^{fl/fl}*, Εικόνα 3.17.B). Η προσθήκη αυτή επιτρέπει την αφαίρεση των εξωνίων αυτών (αλλήλιο *hnRNP/D^{ARRM}*) που κωδικοποιούν τα μοτίβα RRM του AUF1 και συνεπώς την πρόσδεση τους σε mRNA με ARE, η οποία τελείται παρουσία του ενζύμου Cre (Εικόνα 3.17.A, B). Ο ανασυνδυασμός σε κύτταρα της γαμετικής σειράς προκάλεσε τη δημιουργία ποντικών *hnRNP/D^{ARRM/ARRM}*, οι οποίοι παρουσιάζουν ποικίλους μη φλεγμονώδεις φαινοτύπους, αλλά ένα ποσοστό επιζεί κανονικά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συγκριτικές μελέτες του ανοσοποιητικού συστήματος (Σγαντζής, Graf, Οικονομίδης και Κοντογιάννης, *αδημοσίευτα αποτελέσματα*). Παρά ταύτα, και για να μελετήσουμε την αποκλειστική δράση του

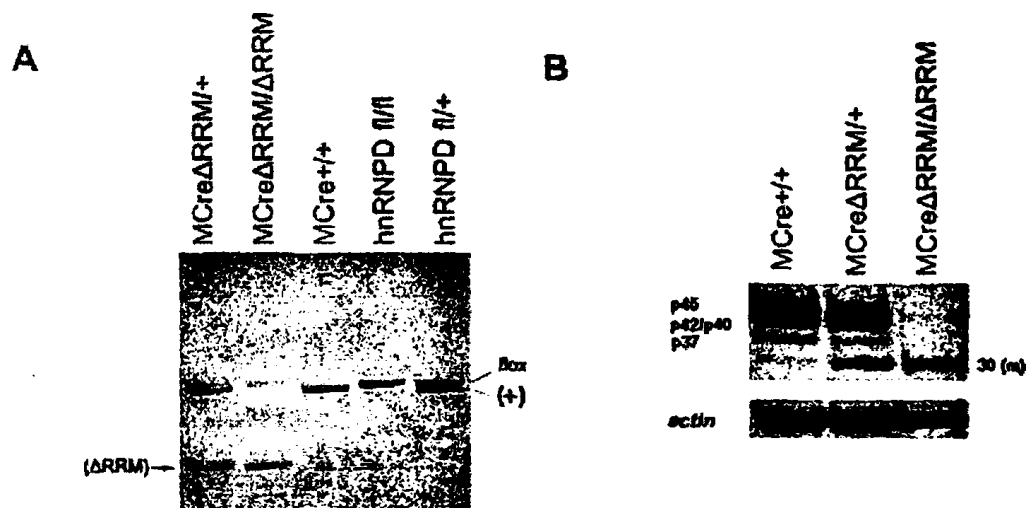
AUF1 στις έμφυτες ανοσολογικές αντιδράσεις, πραγματοποιήσαμε τη μυελοειδική απαλοιφή του μέσα από τη διασταύρωση των ποντικών *hnRNPD^{fl/fl}* με



Εικόνα 3.17. Στρατηγική λειτουργικής αποσιώπησης της hnRNP/D/AUF1 του ποντικού. (Α) Παρουσίαση της κατανομής των εξονίων στις 4 ισομορφές της hnRNP/D/AUF1 στον ποντικό και η στρατηγική αφαίρεσης των RRM μέσα από την αφαίρεση των εξονίων 3 & 4. (Β) Διαγραμματική αναπαράσταση των αλληλίων φυσικού τύπου (*hnRNP^D*), με προσθήκη των αλληλουχιών ανασυνδυασμού loxP (τρίγωνα, *hnRNP^D*^{fl}) και μετά την αφαίρεση των εξονίων 3 & 4 από το Cre (*hnRNP^D*^{ΔRRM}).

ποντικούς *LysMCre* για τη δημιουργία ποντικών *LysMCre hnRNPD^{fl/y}*. Για λόγους απλούστευσης θα καλούμε εφεξής τους ποντικούς με γονότυπο *LysMCre hnRNPD^{+/+}*, *LysMCre hnRNPD^{fl/+}* και *LysMCre hnRNPD^{fl/y}* ως *MCre^{+/+}*, *MCre Δ /+* και *MCre Δ / Δ* αντίστοιχα. Οι ποντικοί *MCre Δ /+* και *MCre Δ / Δ* γεννιούνται και

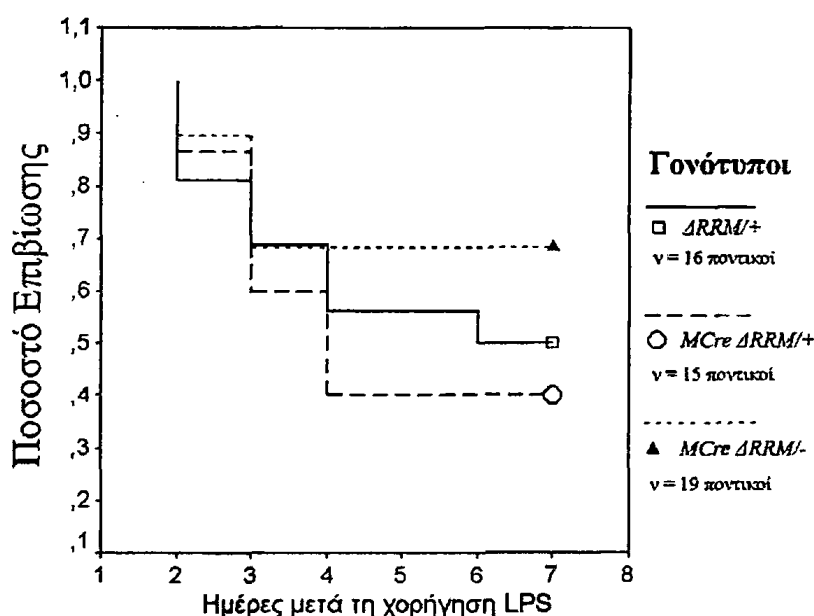
αναπτύσσονται κανονικά και δεν παρουσιάζουν καμία φαινοτυπική ανωμαλία. Επιπρόσθετα τόσο οι ποντικοί με τις καθολικές μεταλλάξεις (*hnRNP^{ΔRRM/+}*, *hnRNP^{ΔRRM/ΔRRM}*) όσο και οι ποντικοί με τις μυελοειδικές μεταλλάξεις (*MCre^{Δ/+}* και *MCre^{Δ/Δ}*) δεν παρουσιάζουν καμία αλλαγή στην κατανομή των μυελοειδών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η AUF1 δεν εμπλέκεται στην μυελοποίηση. Η ανάλυση του ανασυνδυασμού του γονιδιωματικού τόπου του AUF1 και της παραγόμενης πρωτεΐνης σε μακροφάγα κύτταρα από ποντικούς *MCre^{Δ/+}* και *MCre^{Δ/Δ}* έδειξε: (α) ότι η μυελοειδική αφαίρεση των εξωνίων 3&4 ήταν επιτυχής (Εικόνα 3.18.A) και (β) όπως και στην περίπτωση της καθολικής απαλοιφής (Σγαντζής, Graf, Οικονομίδης και Κοντογιάννης, αδημοσίευτα αποτελέσματα), η μεταλλαγή οδηγεί στην παρουσία μόνον μίας πρωτεΐνης μικρότερου μοριακού βάρους τόσο σε ποντικούς *MCre^{Δ/+}* όσο και σε ποντικούς *MCre^{Δ/Δ}*, και η οποία συμπίπτει με το αναμενόμενο μέγεθος μετά από την απαλοιφή των RRM (Εικόνα 3.18.B).



Εικόνα 3.18. Η μυελοειδική τροποποίηση του AUF1. (A) Ανίχνευση του ανασυνδυασμού σε MMO μακροφάγα από ποντικούς με τους αναφερόμενους γονοτύπους. Παρουσιάζονται προϊόντα PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και δείχνονται οι θέσεις των μεταλλαγμένων αλληλίων. (B) Ανίχνευση των ισομορφών AUF1 σε εκχυλίσματα μακροφάγων με στυλώματα Western. Ποσοτικός δείκτης: ακτίνη

3.4.2. Ποντικοί που υπολείπονται της AUF1 από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι ελαφρά ανθεκτικοί στην ενδοτοξαιμία.

Με δεδομένη την προηγούμενη συσχέτιση του AUF1 με την ενδοτοξαιμία (Lu et al. 2006), αποφασίσαμε να εφαρμόσουμε το πρωτόκολλο αυτό στους ποντικούς *MCreΔ/Δ*. Για τις μελέτες μας επιλέχθηκε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίας μέσης δόσης LPS από *Salmonella enteridits* (600μg; Εικόνα 3.19). Η δόση αυτή προκάλεσε 40% θνητότητα σε ποντικούς *hnRNPD^{fl/+}*, *hnRNPD^{fl/fl}*, *MCre+/+* και 60% σε ποντικούς *MCreΔ/+* γενετικού υποστρώματος *C57Bl/6,129Ola*. Σε αντίθεση με την αντίδραση των μαρτύρων, οι ποντικοί *MCreΔ/Δ* παρουσίασαν έναν τροπισμό ανθεκτικότητας στο LPS, αλλά χωρίς να φτάνουν σε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,107$). Συνεπώς τα αποτελέσματα μας διαφοροποιούνται από τις προηγούμενες αναφορές και υποδεικνύουν ένα προφλεγμονώδη ρόλο για τον AUF1.

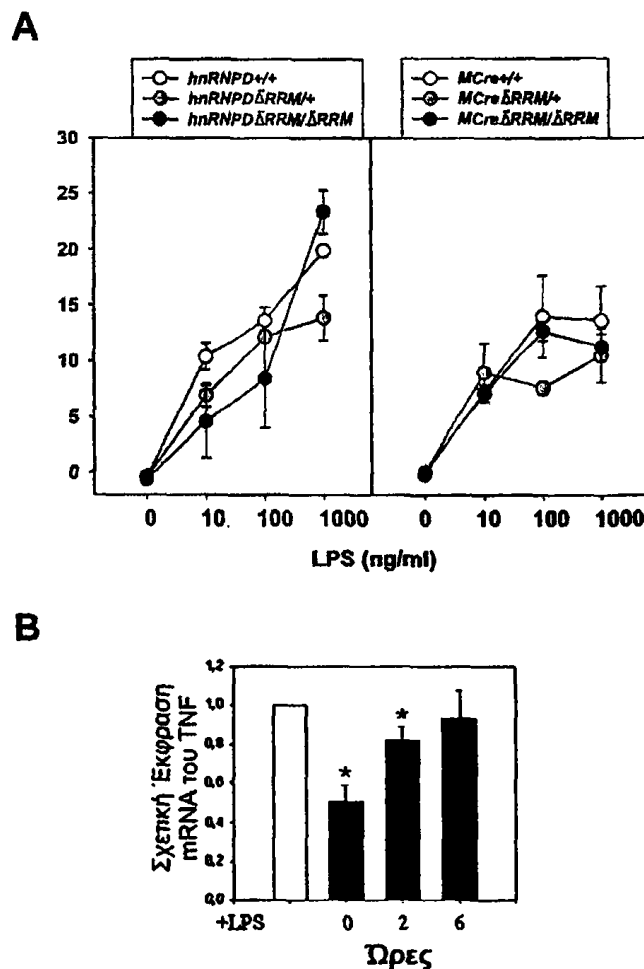


Εικόνα 3.19. Επιβίωση ποντικών ηλικίας 8-12 εβδομάδων με τους αναγραφόμενους αριθμούς ανά γονότυπο, μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS. Παρουσιάζονται κατανομές Kaplan-Meier.

3.4.3. Ο AUF1 δεν επηρεάζει τη βιοσύνθεση του TNF σε μακροφάγα κύτταρα.

Προηγούμενες αναφορές είχαν υποδείξει ότι ο AUF1 ρυθμίζει κατασταλτικά τη βιοσύνθεση του TNF σε μακροφάγα κύτταρα κατά την αντίδραση τους σε LPS (Lu

et al. 2006; Sadri and Schneider 2009). Για το σκοπό αυτό απομονώσαμε καλλιέργειες μακροφάγων ΜΜΟ τόσο από ποντικούς με καθολική αποσιώπηση του AUF1 όσο και με τη μυελοειδική αποσιώπηση του. Οι καλλιέργειες αυτές ερεθίστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις LPS (Εικόνα 3.20Α) όπου δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά στο ποσό του εκκρινόμενου TNF. Αντίστοιχα, η ανάλυση της κινητικής της συσσώρευσης του mRNA του TNF δεν έδειξε διαφορές παρά μόνον σε ανερέθιστα μακροφάγα από ποντικούς *MCreΔ/Δ* (Εικόνα 3.20Β).



Εικόνα 3.20. Η επίδραση της απώλειας του AUF1 στη βιοσύνθεση του TNF σε μακροφάγα κύτταρα. (Α) Ποσοτική ανίχνευση πρωτεΐνης TNF με ELISA σε υπερκείμενα και ΜΜΟ μακροφάγων από ποντικούς με καθολική (δεξιά) και μυελοειδική (αριστερά) απαλοιφή του AUF1, πριν και μετά το ερεθισμό με αυξανόμενες δόσεις LPS. Παρουσιάζονται μέσες τιμές (+SD) από 3 ανεξάρτητα πειράματα με ανεξάρτητες καλλιέργειες από 2-3 ζώα/ομάδα. (Β) Ποσοτική ανίχνευση των επιπέδων του mRNA του TNF με qRT-PCR από ΜΜΟ μακροφάγα *MCreΔ/Δ* σε ανερέθιστη κατάσταση και μετά από ερεθισμό με 100 ng/ml LPS για 2 και 6 ώρες. (*) Στατιστικά σημαντικές μειώσεις με $p < 0.01$

Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι ο AUF1 ενδέχεται να δρα ως ενισχυτής της προφλεγμονώδους απόκρισης. Σε σύγκριση με τη HuR, όντως φαίνεται να δρα ανταγωνιστικά στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HuR. Παρά ταύτα, το παράδειγμα του TNF δείχνει ότι η HuR και ο AUF1 ρυθμίζουν διαφορετικές διεργασίες και συνεπώς ενδέχεται να μην αλληλεπιδρούν με τους ίδιους στόχους και με τα ίδια σήματα.

4. Συζήτηση

4.1. Η HuR ως ρυθμιστής της μυελοποίησης

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε η εμπλοκή της πρωτεΐνης HuR στις διαδικασίες οντογένεσης των ώριμων κυττάρων του αίματος. Η απώλεια της πρωτεΐνης HuR φαίνεται να επηρεάζει τις αιμοποιητικές διαδικασίες μέσω μηχανισμών:

(α) επιρροής του κυτταρικού κύκλου των προγονικών και αρχέγονων κυττάρων της μυελικής σειράς.

(β) επιρροής της σε αποκρίσεις από σήματα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης που συνηγορούν με την εμπλοκή της HuR σε μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου είναι:

1. Η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης HuR σε φυσιολογικούς ποντικούς, (α) από το στάδιο μετάβασης των LT-HSC (αρχέγονων κυττάρων στο στάδιο ηρεμίας) σε ST-HSC (αρχέγονων κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης) και (β) από το στάδιο μετάβασης των CMP (αρχέγονων κυττάρων με δυνατότητα διαφοροποίησης) σε GMP και MEP (προδρόμων ή βλαστικών κυττάρων με υψηλότερη δυνατότητα κλωνικής επέκτασης από τα CMP). Κατά την διαδικασία της αιμοποίησης η δυνατότητα πολλαπλασιασμού αυξάνεται ανάλογα με το διαφοροποιητικό στάδιο των κυττάρων, ξεκινώντας με το χαμηλότερο στα LT-HSC αρχέγονα κύτταρα και καταλήγοντας σε υψηλότερο στο στάδιο των πρόδρομων κυττάρων GMP και MEP (Passegue et al. 2005). Η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης HuR στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα LT-HSC, που βρίσκονται στο στάδιο ηρεμίας και η μείωση των επιπέδων της στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα ST-HSC, που αποτελούν κύτταρα με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης μπορεί να προτείνει μια ενδεχόμενη εμπλοκή της HuR στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

2. Ο σημαντικά μειωμένος αριθμός σχηματιζόμενων αποικιών από προγονικά HuR⁻ κύτταρα, αναδεικνύει ένα πρόβλημα στην ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών. Οι κυτταροκίνες που καθοδηγούν την διαφοροποίηση αυτή μπορούν να προσδίδουν σήματα, τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη/διαφοροποίηση των



κυττάρων και να προσδίδουν κυτταρική επιβίωση (Robb et al. 2007). Η μειωμένη παραγωγή μυελωδών αποικιών είτε παρουσία του μείγματος κυτταροκινών IL3, IL6 και SCF, είτε παρουσία μόνο του αυξητικού παράγοντα GM-CSF, ίσως να οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των HuR^- κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή οποιοδήποτε σήμα από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες θα είχε ως τελικό αποτέλεσμα την μειωμένη κλωνική επέκταση των πρόδρομων κυττάρων μακροφάγων (MP), των πρόδρομων κυττάρων ουδετερόφιλων (GP) και πρόδρομων κυττάρων ουδετερόφιλων και μακροφάγων (GMP).

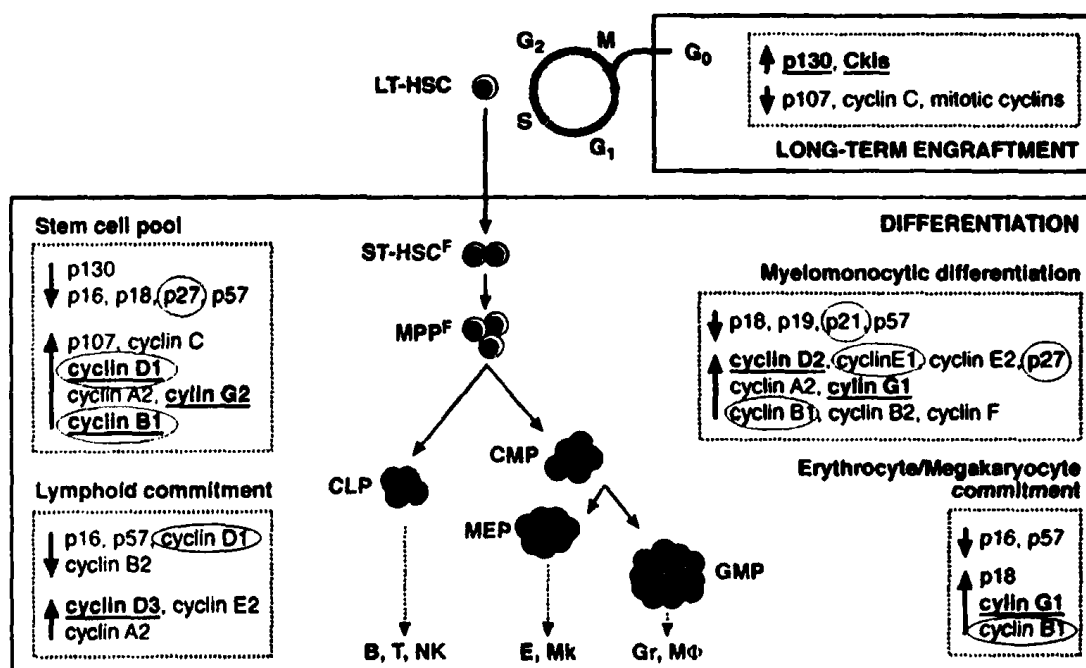
3. Κανένα από τα στάδια διαφοροποίησης δεν είναι δυσανάλογα μειωμένο σε σχέση με τα επίπεδα μείωσης του σταδίου ST-HSC κατά τον εποικισμό μυελού των οστών μετά από μεταμόσχευση HuR^- αρχέγονων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τον πληθυσμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με ικανότητα διαφοροποίησης-πολλαπλασιασμού και η ειδική μείωση τους προτείνει ότι μπορεί να υπάρχει μια καθυστέρηση στην είσοδο σε κυτταρικό κύκλο των κυττάρων αυτών. Αυτή η καθυστερημένη είσοδος σε κύκλο ακολουθείτε και από την καθυστερημένη παραγωγή των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, όπως καταγράφεται από την χαμηλή τους αντιπροσώπευση.

4. Η σημαντική μείωση των HuR^- ώριμων κυττάρων της περιφέρειας κατά τον ανταγωνιστικό εποικισμό, αποτελεί προϊόν αντίστοιχου ανταγωνιστικού μειονεκτήματος των αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων HSCs, CLPs και CMPs. Και στην περίπτωση αυτή η αντιπροσώπευση των αρχέγονων και προγονικών HuR^- κυττάρων παρουσίασε ανάλογες μειώσεις χωρίς την παρατήρηση συσσώρευσης κυττάρων σε οποιοδήποτε από τα στάδια αυτά. Ο ανταγωνιστικός εποικισμός στηρίζεται στην ποιοτική δυνατότητα αυτοανανέωσης των αρχέγονων HSC, η οποία περιλαμβάνει την είσοδο των αρχέγονων κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο (Orkin et al. 2008). Πιθανή ανωμαλία των HuR^- στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό αυτοανανέωσης τους ή/και τον ρυθμό της κυτταρικής τους διαφοροποίησης με τον τρόπο που καταγράφηκε σε αυτό το πείραμα ανταγωνιστικού εποικισμού.

5. Η απώλεια της HuR φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, και όχι την απόπτωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, μειώνοντας την μιτωτική τους επέκταση.



Μια ολική ανάλυση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου σε επίπεδο διαφοροποίησης ή/και αυτοανανέωσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποκάλυψε τα εμπλεκόμενα μόρια ρυθμιστές στις διαδικασίες αυτές. Τα απαραίτητα μόρια ρυθμιστές από το στάδιο των αρχέγονων κυττάρων ST-HSCs προς την μυελοερυθροποιητική διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων περιλαμβάνει την ταυτοποίηση μορίων όπως p21, p27 και κυκλινών A2, B1 (Passegue et al. 2005). Στην ίδια μελέτη οι σχετιζόμενες κυκλίνες με την αυτοανανέωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων LT-HSC είναι μεταξύ άλλων η p27 και η κυκλίνη B1 και D1.



Εικόνα 4.1. Μοριακά δίκτυα συσχέτισης του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής απόφασης των HSC και των προγονικών κυττάρων. Τα μόρια που είναι υπογραμμισμένα σε κόκκινο πλαίσιο είναι τα μόρια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, που έχουν συσχετισθεί με την πρωτείνη HuR (τροποποιημένο από Passegue et al. 2005).

Ο γενικότερος ρόλος της HuR στον κυτταρικό κύκλο υποδηλώνεται από τις ταυτοποιημένες αλληλεπιδράσεις της με μόρια των κυκλινών A, B, D1 και E1 (Wang et al. 2000; Guo and Hartley 2006) αλλά και με τα μόρια αναστολείς κινάσων p21, p27 εξαρτώμενων από κυκλίνες (Kullmann et al. 2002; Lal et al. 2004) (Εικόνα 4.1). Ωστόσο το πώς ακριβώς η HuR δρα σε αυτό το επίπεδο παραμένει αδιευκρίνιστο, ενώ ασαφές παραμένει το ποια σήματα και με ποιο τρόπο, μπορούν να επηρεάσουν την δράση της.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης που συνηγορούν με την εμπλοκή της HuR σε αποκρίσεις κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων είναι:

1. Ο μειωμένος σχηματισμός αποικιών μυελοκυττάρων παρουσία των κυτταροκινών IL3, IL6 και SCF ή του GM-CSF μόνο. Η διαχείριση των σημάτων κυτταροκινών εμφανίζεται ελλατωματική είτε λόγω της προβληματικής έκφρασης των υποδοχέων των κυτταροκινών είτε λόγω της προβληματικής μετάδοσης σημάτων κατά τον κυττάρου των σηματοδοτικών μονοπατιών αυτών.
2. Η παρατήρηση της μείωσης των επιπέδων του υποδοχέα cKit στα προγονικά κύτταρα του εμβρυικού ήπατος. Το γονίδιο cKit έχει ταυτοποιηθεί ως White spotting (*W*) locus και οι διαγονιδιακοί ποντικοί με την πλήρη απαλοιφή του cKit παρουσιάζουν εμβρυικό θάνατο λόγω αναιμίας (Chabot et al. 1988). Ο ζωντανός διαγονιδιακός ποντικός *Vickid* με την μεταλλαγή cKit^{w/w} παρουσίασε ανωμαλίες και μειωμένη ανάπτυξη λεμφοκυττάρων και ερυθροκυττάρων με την πάροδο της ηλικίας προερχόμενη από τους μειωμένους αριθμούς των αντίστοιχων προγονικών κυττάρων σε μυελό των οστών (Waskow et al. 2002). Ο συνδυασμός του cKit προσδέτη (SCF) με άλλες κυτταροκίνες μπορεί να δώσει σήματα επιβίωσης, διαφοροποίησης και ανάπτυξης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και η μείωση που καταγράφηκε στα επίπεδα του ενδέχεται να καθορίζει την διαφοροποιητική τους ικανότητα.
3. Η αντιστροφή του φαινοτύπου σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι μπορούν είτε να χρησιμοποιούνται εναλλακτικά μονοπάτια μυελοποίησης, είτε με τα φλεγμονώδη σήματα να αποκαθίστανται η ισορροπία από τις απορυθμισμένες κυτταροκίνες. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να ενισχύεται από μελέτες στις οποίες σήματα ενεργοποίησης των TLRs προσδίδουν αντίστοιχα σήματα διαφοροποίησης με αυτά των κυττοκινών και των αυξητικών παραγόντων (Nagai et al.. 2006).



4.2. Η HuR ως ρυθμιστής της έκφρασης των δικτύων των κυτταροκινών

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πιστοποιήσαμε το ρόλο της HuR στη ρύθμιση των κυτταροκινών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της φλεγμονής. Αυτό πιστοποιείται από τα ακόλουθα:

- (α) η απώλεια της HuR προκαλεί αυξημένη ευαισθησία σε πειραματικά πρότυπα οξείας φλεγμονής όπως η πειραματική σηπτική καταπληξία και η πειραματική οξεία ΙΦΝΕ.
- (β) η απώλεια της HuR προκαλεί την αυξημένη ύφεση της φλεγμονής σε πειραματικά πρότυπα οξείας φλεγμονής όπως η πειραματική οξεία ΙΦΝΕ.
- (γ) η απώλεια της HuR δεν επηρεάζει τα μονοπάτια ενεργοποίησης των κυτταροκινών (TLR, κινάσες του στρες)
- (δ) η απώλεια της HuR προκαλεί την αυξημένη βιοσύνθεση προφλεγμονωδών παραγόντων όπως ο TNF, η IL-12, και η Cox2
- (ε) η απώλεια της HuR προκαλεί την αυξημένη βιοσύνθεση αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως η IL-10 και ο TGFβ

Συνολικά καταγράφηκε μια ταυτόχρονη και αυξημένη βιοσύνθεση κυτταροκινών αντίρροπων δράσεων που κανονικά θα βρίσκονταν σε μία ακολουθία (από προφλεγμονώδη σε αντιφλεγμονώδη/ανοσορυθμιστική κατάσταση). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η HuR δεν πρέπει να είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των κυτταροκινών *per se*, αλλά μάλλον αποτελεί μέρος ενός δικτύου παραγόντων που ρυθμίζει το ισοζύγιο των δράσεων των παραγόντων αυτών και, κατ'επέκταση, της επαγωγής και της διάρκειας μιας φλεγμονώδους απάντησης. Φυσικά, η υπόθεση αυτή θέτει το άμεσο ερώτημα του ενδοκυττάριου μηχανισμού της δράσης της HuR για τη διατήρηση αυτού του ισοζυγίου. Παρά το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση του βιολογικού και όχι του μοριακού μηχανισμού δράσης της HuR, η σύγκριση των βιοσυνθετικών αλλοιώσεων που εμφανίζονται απουσία της HuR με αυτές που εντοπίστηκαν σε συστήματα υπερέκφρασης της (Katsanou et al. 2005) μας δίνουν κάποια στοιχεία για τη μοριακή της δράση. Στον Πίνακα 4.1. επιχειρούμε μια τέτοια σύγκριση.



Πίνακας 4.1. Σύγκριση της αντίδρασης των mRNA κυτταροκινών σε μακροφάγα κύτταρα τα οποία υπολείπονται ή υπερεκφράζουν HuR και μετά απο ερεθισμό με LPS

mRNA	ARE	Παρά- ιση HuR	Επίδραση υπολοίπου HuR**				Επίδραση υπερέκφρασης HuR*			
			Συνσύνθεση mRNA	Σταθερότητα mRNA	Μεταφορά mRNA	Πρωτεΐνη	Συνσύνθεση mRNA	Σταθερότητα mRNA	Μεταφορά mRNA	Πρωτεΐνη
TNF	NAI	NAI*	Αυξημένη	Αναλλοιωτή	Μειωμένη	Αυξημένη	Αυξημένη	Αυξημένη	Μειωμένη	Μειωμένη
IL-1	OXI	OXI*	Αγνώστο	Αγνώστο	Αγνώστο	Αγνώστο	Μειωμένη	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Μειωμένη
IL-6	NAI	OXI*	Αυξημένη	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή
IL-1β	NAI	ΑΓΝ	Αυξημένη	Αγνώστο	Αγνώστο	Αυξημένη	Αναλλοιωτή	Αγνώστο	Αγνώστο	Αυξημένη
IL-12	OXI	ΑΓΝ	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αγνώστο	Αυξημένη	Αναλλοιωτή	Αγνώστο	Αγνώστο	Αγνώστο
IFNβ	OXI	ΑΓΝ	Αυξημένη	Αγνώστο	Αγνώστο	Αγνώστο	Αναλλοιωτή	Αγνώστο	Αγνώστο	Αγνώστο
TGFβ	NAI***	NAI*	Αυξημένη	Αγνώστο	Αγνώστο	Αυξημένη	Μειωμένη	Αναλλοιωτή	Μειωμένη	Μειωμένη
COX2	NAI	NAI*	Αναλλοιωτή	Αναλλοιωτή	Αγνώστο	Αυξημένη	Αυξημένη	Αυξημένη	Μειωμένη	Μειωμένη

* Katsanou et al., Mol. Cell, 2005

** Παράδοση μέλιτη

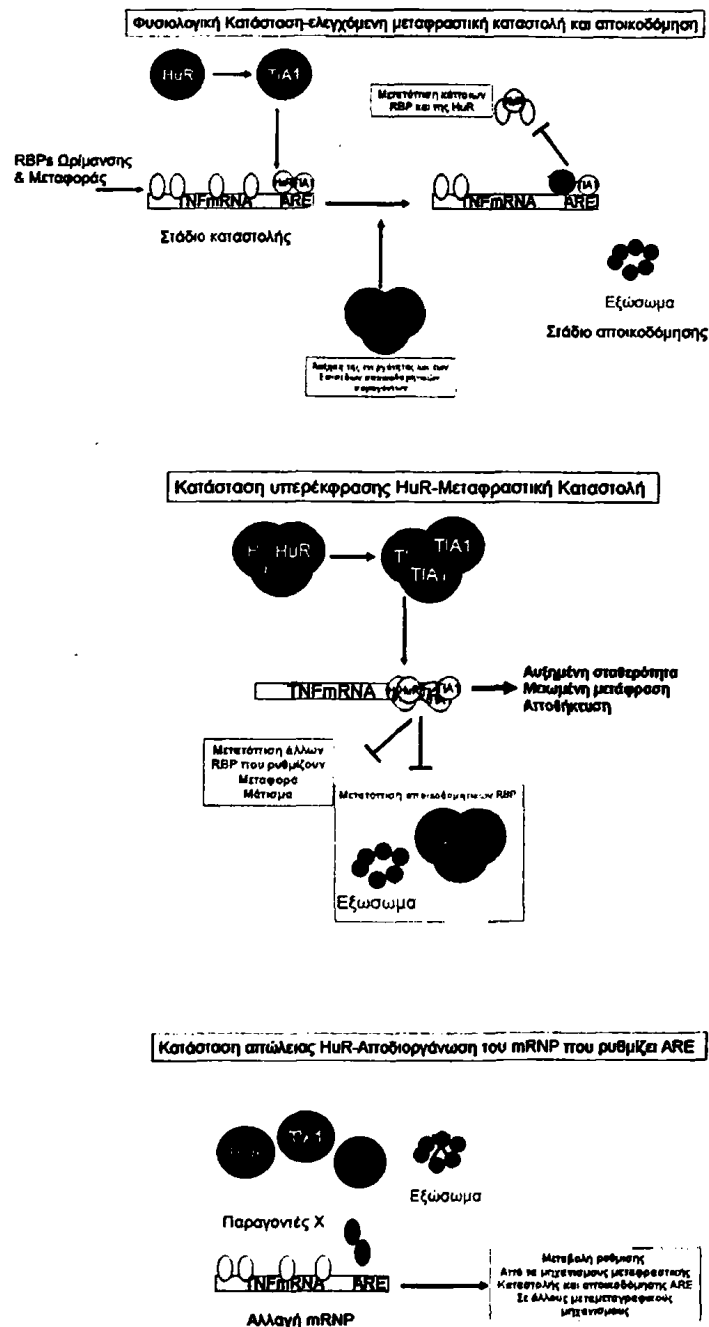
*** Μη κανονικό ARE-πρόσωπο σε U

Παρά την έλλειψη αρκετών μετρήσεων από αυτόν τον πίνακα, προκύπτουν κάποια συγκεκριμένα πρότυπα. Όπως παρουσιάζεται από την βάση δεδομένων ARED (<http://brp.kfshrc.edu.sa/ARED/>) είναι φανερό η κλασσική δομή ARE δεν υπάρχει σε όλα τα mRNA που φαίνεται να επηρεάζονται είτε από την απώλεια ή από την υπερέκφραση της HuR ή και στις δύο περιπτώσεις. Αυτό δεν σημαίνει ότι τα mRNA αυτά δεν περιέχουν δομές πλούσιες σε AU και U, αλλά μάλλον ότι δεν περιέχουν την κλασσική πεντανουκλεοτιδική αλληλουχία AUUUA, ή ότι τα καταγεγραμμένα mRNA δεν περιέχουν τις αλληλουχίες του 3'UTR. Το πλέον σημαντικό είναι ότι, για τα mRNA που έχουν ελεγχθεί να αλληλεπιδρούν με τη HuR, (Katsanou et al., 2005), υπάρχουν ορισμένα που παρά την αλλαγή της έκφρασης τους δεν προσδένονται σε αυτήν, όπως τα mRNA της IL-1β και της IL-6 η οποία περιέχει ARE. Αντίθετα, mRNA που δεν έχουν το κλασσικό μοτίβο ARE, αλλά κυρίως αλληλουχίες πλούσιες σε U, όπως το mRNA του TGFβ, προσδένονται στη HuR. Συνεπώς η παρουσία και μόνον των ARE δεν αποτελεί κριτήριο πρόσδεσης στη HuR, αλλά αυτό μάλλον εξαρτάται από τη συνολική σύσταση των mRNP που αναγνωρίζουν τα mRNA στη μονάδα του χρόνου και με βάση τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού τύπου ή του ερεθίσματος. Αυτό φαίνεται και από τη διαφορετική επίδραση των διαγονιδιακών μετατροπών της HuR στην βιοσύνθεση των κυτταροκινών που προσδένει όπως των TNF, TGFβ & Cox2. Για παράδειγμα και με βάση το αποτέλεσμα της βιοσυνθετικής διεργασίας (δηλ. την παραγωγή της πρωτεΐνης) η απουσία της HuR αυξάνει την παραγωγή των πρωτεϊνών TNF, TGFβ & Cox2 ενώ η υπερέκφραση της προκαλεί την αύξηση τους. Παρά ταύτα αυτή η αναλογία διαταράσσεται εάν κοιτάξουμε τις

αλλαγές στα μεταμεταγραφικά στάδια της βιοσυνθετικής διαδικασίας. Για παράδειγμα και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει αυξημένη συσσώρευση των mRNA του TNF και της Cox2, αλλά μόνον στην περίπτωση της υπερέκφρασης επηρεάζεται η σταθερότητα τους, ενώ στην περίπτωση της απώλειας η αιτία για την αυξημένη συσσώρευση παραμένει αδιευκρίνιστη και μπορεί να περιλαμβάνει άλλες μεταμεταγραφικές διεργασίες (πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά, μάτισμα). Αντίστοιχα και στις δύο περιπτώσεις η μεταφρασιμότητα του mRNA του TNF παρουσιάζεται κατεσταλμένη. Αυτές οι ποιοτικές διαφορές στο είδος των μηχανισμών που εμπλέκονται για τη μεταμεταγραφική ρύθμιση των mRNA μπορούν να εξηγηθούν μονάχα εάν η απώλεια και η υπερέκφραση της HuR προκαλούν δραματικές αλλαγές στη σύσταση των mRNP που καθορίζουν τη χρήση των mRNA.

Επί του παρόντος δεν έχουμε αρκετά στοιχεία για τη σύσταση των mRNP σε καταστάσεις απουσίας της HuR. Παρά ταύτα και με βάση την αποδεδειγμένη (α) ρύθμιση του mRNA του TNF, (β) συνεργία HuR με την TIA1, (γ) τη συνεργία μεταξύ TIA1 και TTP, (δ) τον ανταγωνισμό μεταξύ HuR και της αποσταθεροποιητικής TTP και του εξωσώματος για τη ρύθμιση του mRNA του TNF (Chen et al. 2001; Keene and Tenenbaum 2002; Katsanou et al. 2005; Lopez de Silanes et al. 2005) και με δεδομένο ότι η υψηλότερη συσσώρευση των HuR και TIA1 (και ενδεχομένως και η πρόσδεση τους) εντοπίζεται στον πυρήνα προτείνουμε 3 καταστάσεις αλλαγών των mRNP ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης της HuR (Εικόνα 4.2). Στη φυσιολογική κατάσταση η σωστή στοιχειομετρία πρόσδεσης της HuR με την TIA1 στον πυρήνα δεν επηρεάζει αρνητικά τις προσδέσεις των RBP που ελέγχουν την ωρίμανση και τη μεταφορά του mRNA του TNF, ενώ στο κυτταρόπλασμα το mRNA περνάει από φάση ενδιάμεσης καταστολής πριν τη σύσταση των ριβοσωμάτων. Όταν ενεργοποιηθεί η TTP (π.χ. από αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες) εκτοπίζει την HuR στο RNP και το mRNA του TNF οδηγείται προς αποικοδόμηση στο εξώσωμα. Αντίθετα στην περίπτωση υπερέκφρασης της HuR προκαλείται ενδεχομένως αυξημένη πρόσδεση και της TIA1 στο mRNA του TNF που μπορεί να εκτοπίσει άλλους παράγοντες, όπως η TTP και να διατηρήσει το mRNA σταθερό αλλά σε κατάσταση συνεχούς μεταφραστικής καταστολής. Τέλος στην περίπτωση απώλειας της HuR όλες οι AREBP δεν μπορούν να οργανωθούν πάνω στο mRNA του TNF το οποίο και ακολουθεί τις δράσεις των προϋπαρχόντων

RBP ή να επιτρέπει την πρόσδεση άλλων παραγόντων και συνεπώς ακολουθεί μία άλλη διαδικασία χρήσης.



Εικόνα 4.2. Προτεινόμενες αναμορφώσεις των AREBP στο mRNA του TNF κατά την υπερέκφραση ή την απώλεια της HuR.

Η παραπάνω θεώρηση χρήζει εμπειριστατωμένης βιοχημικής και μοριακής ανάλυσης η οποία αποτελεί νέο αντικείμενο μελέτης μιας και υποστηρίζει το ρόλο της **HuR στην οργάνωση των μεταμεταγραφικών διεργασιών**. Επιπρόσθετα η θεώρηση αυτή υποδεικνύει ότι η αλλαγή των RNP ενδέχεται να υποστηρίζεται και από την **αντίστοιχη αλλαγή των σημάτων που ρυθμίζουν τις μεταμεταγραφικές μηχανές** και κατά συνέπεια την αλλαγή των σημάτων που καθορίζουν **κυτταρικές αντιδράσεις** όπως π.χ. των φλεγμονωδών αντιδράσεων.

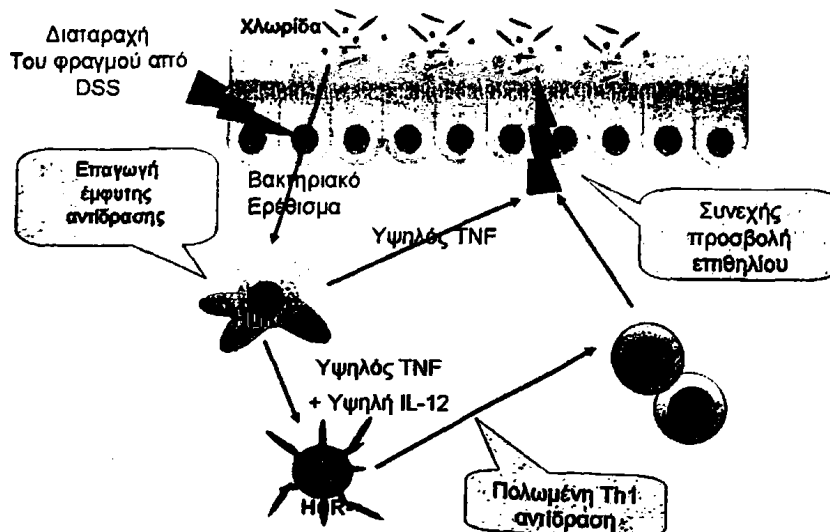
4.3. Η HuR ως ρυθμιστής φλεγμονωδών αποκρίσεων

Η απορρύθμιση του ισοζυγίου των κυτταροκινών από την απώλεια της HuR στα κύτταρα της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης είχε άμεσο αντίκτυπο στη φλεγμονή. Ανεξάρτητα από την επίδραση της HuR στη διαμόρφωση των μοριακών παραμέτρων που καθορίζουν την έκφραση των κυτταροκινών, είναι σαφές ότι η HuR δρα ρυθμιστικά και όχι επαγωγικά για την φλεγμονώδη αντίδραση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας. Αυτό αποδεικνύεται ξεκάθαρα από την αυξημένη ευαισθησία των ποντικών *MCre/-* στην πειραματική σηπτική καταπληξία ή οποία μπορεί να προκύπτει τόσο από την αυξημένη παραγωγή TNF, όσο και από άλλες κυτταροκίνες όπως ο TGFβ, η υπερέκφραση του οποίου ενισχύει την ηπατική βλάβη παρουσία LPS (García-Lazaro et al. 2005).

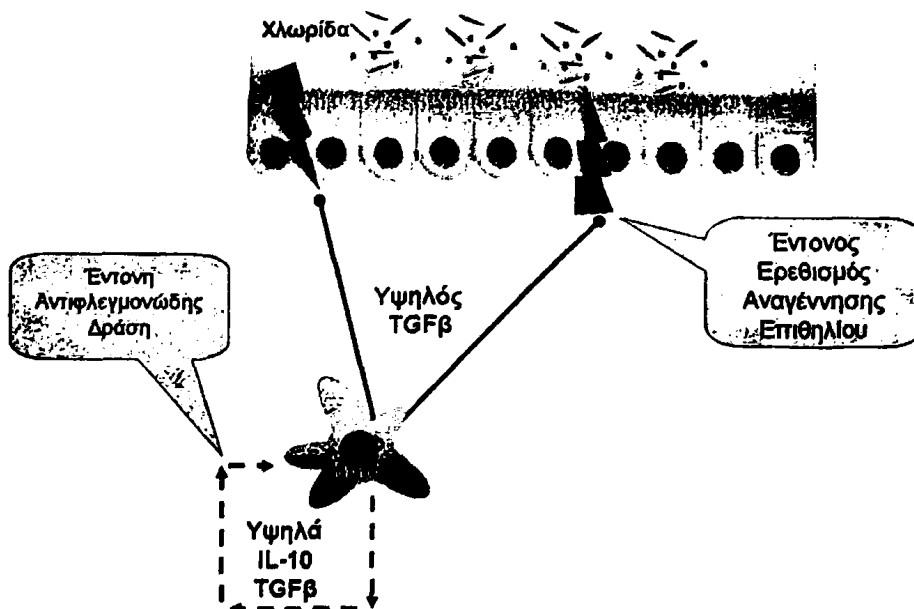
Σε αντίθεση με την σηπτική καταπληξία, το πρότυπο της οξείας ΙΦΝΕ από DSS έδειξε τον ρόλο της HuR τόσο ως προς της ρύθμιση των αντιδράσεων της έμφυτης ανοσίας στο πλαίσιο της εντερικής φλεγμονής όσο και ως προς ομοιοστάση του επιθηλιακού φραγμού. Αυτό αποδεικνύεται από την γρήγορή ανάπτυξη αλλά και ύφεση της φλεγμονής κατά την γρήγορη ανασύσταση του εντερικού επιθήλιου των ποντικών μετά την επαγωγή της ΙΦΝΕ. Με βάση (α) την αυξημένη έκφραση των TNF και IL-12 που έχουν αποδεδειγμένο ρόλο στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ και κυρίως της νόσου του Crohn's (Kontoyiannis et al. 2002; Schmidt et al. 2002) και (β) την αντιφλεγμονώδη δράση της IL-10 (Papadakis and Targan 2000) και του TGFβ (Monteleone et al. 2008) καθώς και την αναδομική δράση του TGFβ στην ανάπλαση των επιθηλίων (Beck et al. 2003) προτείνουμε δύο διακριτές διεργασίες που μπορεί να λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση του εντερικού βλεννογόνου των ποντικών *MCre/-* (Εικόνα 4.3). Στην επαγωγική φάση της νόσου και με την παρουσία του DSS η απώλεια της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης προκαλεί την έντονη έκκριση

TNF ο οποίος από την μία πλευρά ενισχύει την έμφυτη απάντηση και την επιθηλιακή βλάβη,

Φάση Επαγωγής – Γρήγορη και υπέρμετρη ανάπτυξη φλεγμονής



Φάση Καταστολής – Γρήγορη ύφεση



Εικόνα 4.3. Υπόθεση κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στην ΙΦΝΕ των ποντικών που υπολείπονται της HuR από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας.



ενώ από την άλλη συνδυάζεται με την υψηλή έκκριση IL-12 για την υποστήριξη φλεγμονωδών αντιδράσεων της επίκτητης ανοσίας. Αντίθετα μετά την αφαίρεση του DSS, οι υψηλές συγκεντρώσεις IL-10 και TGFβ καταστέλλουν τη φλεγμονή ενώ ο δεύτερος ενισχύει την αναδόμηση του επιθήλιου. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η HuR μπορεί να εμπλέκεται και με την υποστηρικτική ικανότητα της έμφυτης ανοσίας προς την επίκτητη. Αυτό φαίνεται επίσης και στους ποντικούς *MCre/- TNF^{1ARE/+}* όπου η αύξηση των δεικτών της οξείας φλεγμονής (πολυμορφοπύρηνα και μακροφάγα) δεν αντιστοιχούσε και σε αύξηση της χρόνιας φλεγμονής (λεμφοκύτταρα) αλλά η χρόνια φλεγμονή είχε πτωτική τάση. Φυσικά, η ανάλυση του ρόλου της HuR στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ δεν πρέπει να περιλαμβάνει μόνον την διαλεύκανση του ρόλου της στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας αλλά και στις επίκτητης ανοσίας καθώς και του επιθηλίου. Η ερευνητική μας ομάδα έχει ήδη αναπτύξει συστήματα απαλοιφής στα T-λεμφοκύτταρα (Papadaki et al. 2009) και το επιθήλιο του εντέρου (Γιακουβάκη Α., Μηλάτος Σ. και Δ.Α. Κοντογιάννης, *αδημοσίευτα αποτελέσματα*) και η ανάλυση της αντίδρασης τους σε ΙΦΝΕ βρίσκεται σε εξέλιξη.

Τέλος, η αντιφλεγμονώδης δράση της HuR στην ΙΦΝΕ αποδεικνύεται ξεκάθαρα από την καταστολή της ανάπτυξης της στο σύστημα μυελοειδικής υπερέκφρασης της HuR. Το αποτέλεσμα αυτό προσδίδει στη HuR και την ιδιότητα του στόχου για την ανάπτυξη θεραπευτικών πρωτοκόλλων έναντι των ΙΦΝΕ. Η ανάπτυξη καινοτόμων μεθοδολογιών μελέτης αλληλεπιδράσεων μεταξύ RBP και RNA οδήγησε στην πρόσφατη ανακάλυψη μικρο-μοριακών ουσιών που προσδένουν και επηρεάζουν τις δράσεις της HuR (Meisner et al. 2007; Meisner et al. 2009) και απέδειξε ότι η φαρμακευτική στόχευση της HuR μπορεί να γίνει πραγματικότητα. εφόσον τα συστήματα διαγονιδιακής απαλοιφής διαλευκάνουν πλήρως τις βιολογικές της δράσεις.



5. Περίληψεις

5.1. Περίληψη στα Ελληνικά

Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας έχουν εξελιχθεί τόσο για να αναγνωρίζουν και να αντιδρούν άμεσα στη λοίμωξης και της ιστικής βλάβης όσο και για να ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη ομοιόσταση και να υποστηρίξουν της αντιδράσεις της επίκτητης ανοσίας. Οι πολύπλοκες αυτές αντιδράσεις βασίζονται σε μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης παραγόντων διαφοροποίησης, κυτταροκινών, αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων και άλλων παραγόντων της φλεγμονής. Είναι πλέον σαφές ότι η βιοσύνθεση μορίων που εμπλέκονται στις δράσεις της έμφυτης ανοσίας, ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς που καθορίζουν τη «χρήση» των αντίστοιχών mRNA. Οι μεταμεταγραφικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν σειρά διαδικασιών οι οποίες καθορίζουν τα επιμέρους στάδια του μεταβολισμού του mRNA (σταθερότητα, υποκυτταρικός εντοπισμός, μετάφραση) και ελέγχονται από τις δυναμικές αλληλεπιδράσεις μορίων RNA με ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RBP) που τα αναγνωρίζουν. Όπως έχει αποδειχθεί σε περιπτώσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος Crohn), η απορρύθμιση των παραπάνω διεργασιών μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογικές κυτταρικές αντιδράσεις, οι οποίες με τη σειρά τους θα αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη παθολογίας.

Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάλυση του βιολογικού ρόλου ριβονουκλεοπρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταμεταγραφική ρύθμιση των mRNA που περιέχουν αλληλουχίες αδενίνης και ουρακίλης (ARE) και που κωδικοποιούν παράγοντες του στρες και της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα η εργασία επικεντρώθηκε στις δράσεις, πρωτίστως της RBP **Elavl1/HuR** και δευτερευόντως της RBP **hnRNPd/AUF1**, στον καθορισμό της έμφυτης ανοσίας με εφαρμογή: καινοτόμων μεθοδολογιών διαγονιδιακής απαλοιφής των RBP από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα *in vivo*, πειραματικών προτύπων οξείας φλεγμονής και φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου και μελετών γονιδιακής έκφρασης.

Η απώλεια της HuR σε διαφορετικά αιμοποιητικά στάδια αποκάλυψε τον λειτουργικό της ρόλο στην ρύθμιση της αιμοποιητικής διαφοροποίησης: (α) των αρχηγόνων κυττάρων προς τα προγονικά και (β) των προγονικών μυελοποιητικών κυττάρων προς τα ώριμα μυελοειδή συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων μονοκυττάρων/μακροφάγων και των πολυμορφοπύρηνων. Ο αιμοποιητικός ρόλος της HuR συσχετίστηκε με τη ρύθμιση μορίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο

των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων καθώς και με τις δράσεις παραγόντων διαφοροποίησης. Παρά ταύτα και στην περίπτωση της μυελοειδικής απαλοιφής της HuR, ο φαινότυπος αυτός είναι αντιστρέψιμος είτε με την αυξημένη παρουσία παραγόντων διαφοροποίησης ή την παρουσία φλεγμονής γεγονός που επέτρεψε τη διαλεύκανση του ρόλου της HuR στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις της έμφυτης ανοσίας.

Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι η HuR παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του ισοζυγίου προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών μέσα από την αλληλεπίδραση με τα mRNA που τις κωδικοποιούν και την διαφορική της δράση προς την οργάνωση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων που καθορίζουν την σταθερότητα και την μεταφρασιμότητά τους. Η διατήρηση αυτού του ισοζυγίου προσδίδει στη HuR μια ανοσορρυθμιστική και αντιφλεγμονώδη δράση η οποία πιστοποιήθηκε τόσο στην ανάπτυξη πειραματικών προτύπων σηπτικής καταπληξίας όσο και σε πειραματικά πρότυπα Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ). Για την πιστοποίηση της αντιφλεγμονώδους δράσης της HuR στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ, επιχειρήσαμε μια φαρμακο-διαγονιδιακή διαδικασία υπερ-έκφρασης της, η οποία κατέστειλε την ανάπτυξη της νόσου αναδεικνύοντας το θεραπευτικό δυναμικό φαρμακευτικών ρυθμίσεων των δράσεων της HuR.

Αντίθετα τα αποτελέσματα μας για τις δράσεις της AUF1, όπως προκύπτουν από τη μυελοειδική απαλοιφή της έδειξαν ότι δεν σχετίζεται με τη ρύθμιση της αιμοποίησης αλλά δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας, χωρίς όμως να επηρεάζει τη βιοσύνθεση βασικών κυτταροκινών. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε αντίθεση με ένα πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών που υποδεικνύουν ότι η HuR και ο AUF1 έχουν ανταγωνιστικές δράσεις στα ίδια mRNA και αναδεικνύουν τη HuR ως πιθανό **κυρίαρχο διοργανωτή μεταμεταγραφικών δικτύων**.

5.2. Summary in English

Innate immunity has evolved to recognize and respond rapidly to infection and tissue damage whilst maintaining inflammatory homeostasis and support to adaptive immunity. These complex responses depend on mechanisms controlling the expression of differentiation factors, cytokines, antigen presentation molecules and a hitherto of inflammatory mediators. Prior research has demonstrated that the biosynthesis of innate effector molecules is regulated at the post-transcriptional level which determines the utilization of the corresponding mRNAs. These post-transcriptional processes comprise a series of overlapping mechanisms controlling the subcellular localization, decay and translation of mRNA molecules via dynamic interactions with RNA binding proteins (RBPs). As has been demonstrated in animal models of acute and chronic inflammation (e.g. rheumatoid arthritis and Crohn's disease), defects in post-transcriptional regulation may provide the impetus for the development of disease.

The research presented focuses on the analysis of the functional role of RNA-binding proteins (RBPs) that interact with mRNA's containing AU-rich elements. Such mRNAs are critical for innate immunity since they usually encode stress factors and inflammatory mediators. Specifically, we focus on the functions of the RBPs *Elavl1/HuR* and *hnRNPd/AUF1* during the development, induction and activity of innate immune cells. Our experimental approach involved the application of: novel transgenic systems of RBP deletion in hematopoietic cells, animal models of acute inflammation and Inflammatory Bowel Disease (IBD), and gene expression measurements.

The comparison between *HuR*'s deletion in hematopoietic stem versus myelopoietic progenitor cells revealed ***HuR*'s functions towards the regulation of hematopoietic differentiation** of: (a) stem to progenitor cells and (b) myelopoietic progenitors to mature myeloid lineages, including innate effectors. The functions of *HuR* in these differentiation processes correlate with its functions in controlling cell cycle regulators and differentiation signals. Still, and in the case of myelopoietic deletions of *HuR*, the differentiation defect could be restored in the presence of high levels of differentiation factors or in the presence of inflammation. This, allowed us to dissect further the role of *HuR* in innate immune responses.



From our data, it is clear that **HuR controls the equilibrium in the production of pro- and anti-inflammatory mediators** by organizing the RBP associations which control mRNA decay and translation. This property of HuR, render the outcome of its functions as **immunomodulating and anti-inflammatory** and was further revealed in animal models of endotoxemia and IBD. To validate the anti-inflammatory effects of HuR we also employed a drug-inducible HuR overexpression system that attenuated the development of acute IBD. This latest finding indicates the **therapeutic potential** of pharmaceutical modulation of HuR's functions.

Contrary to HuR, the myeloid restricted deletion of AUF1 revealed that it does not play a role in the development of innate cells but it does act as a **pro-inflammatory RBP**. Still its functions do not appear to relate to cytokine production, which against previous data and against AUF1's role as an antagonist for HuR's functions. Collectively our data demonstrate that HuR and AUF1 are involved in different responses and highlight HuR's role as **putative organizer** of post-transcriptional networks.

6. Βιβλιογραφία

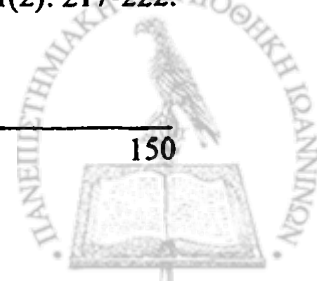


- Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim, H.H., and Gorospe, M. 2008. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem* 389(3): 243-255.
- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A. et al. 2007. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25(4): 543-557.
- Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Lal, A., Kim, H.H., Kuwano, Y., Galban, S., Becker, K.G., Kamara, D., de Cabo, R. et al. 2009. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J* 28(9): 1271-1282.
- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Anderson, P. and Kedersha, N. 2006. RNA granules. *J Cell Biol* 172(6): 803-808.
- 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.
- Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D.L., Elewaut, D., and Kollias, G. 2008. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med* 205(2): 331-337.
- 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.
- Balmer, L.A., Beveridge, D.J., Jazayeri, J.A., Thomson, A.M., Walker, C.E., and Leedman, P.J. 2001. Identification of a novel AU-Rich element in the 3' untranslated region of epidermal growth factor receptor mRNA that is the target for regulated RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 21(6): 2070-2084.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33(22): 7138-7150.
- Beck, P.L., Rosenberg, I.M., Xavier, R.J., Koh, T., Wong, J.F., and Podolsky, D.K. 2003. Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. *Am J Pathol* 162(2): 597-608.
- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., and Segal, D.M. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24(10): 528-533.
- Benjamin, D., Schmidlin, M., Min, L., Gross, B., and Moroni, C. 2006. BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Mol Cell Biol* 26(24): 9497-9507.
- Bhatia, S.K., Tygrett, L.T., Grabstein, K.H., and Waldschmidt, T.J. 1995. The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation. *J Exp Med* 181(4): 1399-1409.
- Bohjanen, P.R., Petryniak, B., June, C.H., Thompson, C.B., and Lindsten, T. 1991. An inducible cytoplasmic factor (AU-B) binds selectively to AUUUA multimers in the 3' untranslated region of lymphokine mRNA. *Mol Cell Biol* 11(6): 3288-3295.
- Bohjanen, P. R., Petryniak, B., June, C. H., Thompson, C. B., Lindsten, T. 1992. AU RNA-binding factors differ in their binding specificities and affinities. *J Biol Chem* 267(9): 6302-6309.



- Bouma, G. and Strober, W. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3(7): 521-533.
- Brennan, C.M. and Steitz, J.A. 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58(2): 266-277.
- 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.
- Brook, M., Tchen, C.R., Santalucia, T., McIlrath, J., Arthur, J.S., Saklatvala, J., and Clark, A.R. 2006. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol Cell Biol* 26(6): 2408-2418.
- Butler, J.S. 2002. The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol* 12(2): 90-96.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(6): 1670-1674.
- Carballo, E. and Blackshear, P.J. 2001. Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood* 98(8): 2389-2395.
- Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281(5379): 1001-1005.
- . 2000. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95(6): 1891-1899.
- Carrick, D.M., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. 2004. The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6(6): 248-264.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. 1988. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335(6185): 88-89.
- Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y.S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., and Becker, K.G. 2005. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics* 6(1): 75.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, 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.
- Cherry, J., Jones, H., Karschner, V.A., and Pekala, P.H. 2008. Post-transcriptional control of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression: formation of a nuclear HuR-C/EBPbeta mRNA complex determines the amount of message reaching the cytosol. *J Biol Chem* 283(45): 30812-30820.
- Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6): 3120-3125.

- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. 1999. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8(4): 265-277.
- Dean, J.L., Wait, R., Mahtani, K.R., Sully, G., Clark, A.R., and Saklatvala, J. 2001. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 21(3): 721-730.
- 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.
- 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.
- Doller, A., Huwiler, A., Muller, R., Radeke, H.H., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. 2007. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell* 18(6): 2137-2148.
- Douni, E., Akassoglou, K., Alexopoulou, L., Georgopoulos, S., Haralambous, S., Hill, S., Kassiotis, G., Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Plows, D. et al. 1995. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 47(1-2): 27-38.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 195-205.
- Dumitru, C.D., Ceci, J.D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J.H., Patriotic, C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kollias, G. et al. 2000. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103(7): 1071-1083.
- 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.
- Fan, J.G., Shao, Y., and Hong, J. 2002. [Effects of transfer growth factor beta, tumor necrosis factor alpha and neutral lipids on biological behaviors of L-02 cell lines]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 10(5): 388-389.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A. 1998. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 17(12): 3448-3460.
- Gaestel, M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 120-130.
- Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., and Steitz, J.A. 2001. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* 7(9): 1348-1361.
- 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.
- Garcia-Lazaro, J.F., Thieringer, F., Luth, S., Czochra, P., Meyer, E., Renteria, I.B., Galle, P.R., Lohse, A.W., Herkel, J., and Kanzler, S. 2005. Hepatic overexpression of TGF-beta1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock. *Immunol Lett* 101(2): 217-222.



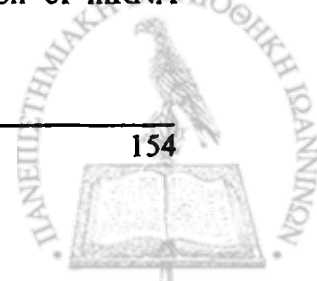
- Giles, K.M., Daly, J.M., Beveridge, D.J., Thomson, A.M., Voon, D.C., Furneaux, H.M., Jazayeri, J.A., and Leedman, P.J. 2003. The 3'-untranslated region of p21WAF1 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein. *J Biol Chem* **278**(5): 2937-2946.
- Good, P.J. 1995. A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(10): 4557-4561.
- Guo, X. and Hartley, R.S. 2006. HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **66**(16): 7948-7956.
- Hamilton, B.J., Nagy, E., Malter, J.S., Arrick, B.A., and Rigby, W.F. 1993. Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *J Biol Chem* **268**(12): 8881-8887.
- Hao, S. and Baltimore, D. 2009. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* **10**(3): 281-288.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H.Y., Yamazaki, N., and Matsushima, K. 1999. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* **94**(3): 837-844.
- Hegen, M., Gaestel, M., Nickerson-Nutter, C.L., Lin, L.L., and Telliez, J.B. 2006. MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* **177**(3): 1913-1917.
- Henics, T., Nagy, E., Oh, H.J., Csermely, P., von Gabain, A., and Subject, J.R. 1999. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem* **274**(24): 17318-17324.
- Hieronymus, H. and Silver, P.A. 2004. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* **18**(23): 2845-2860.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Radzioch, D., Clark, A.R., Blackshear, P.J., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. 2006. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* **26**(6): 2399-2407.
- Houzet, L., Morello, D., Defrance, P., Mercier, P., Huez, G., and Kruys, V. 2001. Regulated control by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element during mouse embryogenesis. *Blood* **98**(5): 1281-1288.
- Ikuta, K. and Weissman, I.L. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(4): 1502-1506.
- Jacob, C.O. and Tashman, N.B. 1993. Disruption in the AU motif of the mouse TNF- α 3' UTR correlates with reduced TNF production by macrophages in vitro. *Nucleic Acids Res* **21**(11): 2761-2766.
- Kabnick, K.S. and Housman, D.E. 1988. Determinants that contribute to cytoplasmic stability of human c-fos and beta-globin mRNAs are located at several sites in each mRNA. *Mol Cell Biol* **8**(8): 3244-3250.
- 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., Dimitriou, M., and Kontoyiannis, D.L. 2006. Post-transcriptional regulators in inflammation: exploring new avenues in biological therapeutics. *Ernst Schering Found Symp Proc*(4): 37-57.
- 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.
- Kedersha, N. and Anderson, P. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6): 963-969.
- Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151(6): 1257-1268.
- 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.
- Keene, J.D. 2001. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7018-7024.
- Keene, J.D. and Tenenbaum, S.A. 2002. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9(6): 1161-1167.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R., and Murray, J.A. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9(12): 413-421.
- Kollias, G., Kontoyiannis, D., Douni, E., and Kassiotis, G. 2002. The role of TNF/TNFR in organ-specific and systemic autoimmunity: implications for the design of optimized 'anti-TNF' therapies. *Curr Dir Autoimmun* 5: 30-50.
- Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., Kotlyarov, A., Forster, I., Flavell, R., Gaestel, M. et al. 2002. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 196(12): 1563-1574.
- Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Carballo, E., Alexopoulou, L., Blackshear, P.J., Gaestel, M., Davis, R., Flavell, R., and Kollias, G. 2001. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J* 20(14): 3760-3770.
- 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.
- Kotlyarov, A., Neining, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H.D., and Gaestel, M. 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nat Cell Biol* 1(2): 94-97.
- Kracht, M. and Saklatvala, J. 2002. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 20(3): 91-106.



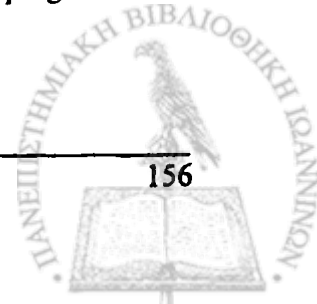
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B., and Hengst, L. 2002. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* 16(23): 3087-3099.
- Lagnado, C.A., Brown, C.Y., and Goodall, G.J. 1994. AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an 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. *EMBO J* 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.
- Lee, J.C. and Young, P.R. 1996. Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 59(2): 152-157.
- Lehner, M.D., Schwoebel, F., Kotlyarov, A., Leist, M., Gaestel, M., and Hartung, T. 2002. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 168(9): 4667-4673.
- 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.
- Lewandoski, M. 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2(10): 743-755.
- Li, C.L. and Johnson, G.R. 1995. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood* 85(6): 1472-1479.
- 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. *J Biol Chem* 277(47): 44623-44630.
- Lopez de Silanes, I., Galban, S., Martindale, J.L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F.E., Falco, G., Zhan, M., and Gorospe, M. 2005. Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25(21): 9520-9531.
- Lu, J.Y., Sadri, N., and Schneider, R.J. 2006. Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev* 20(22): 3174-3184.
- Mahtani, K.R., Brook, M., Dean, J.L., Sully, G., Saklatvala, J., and Clark, A.R. 2001. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol* 21(19): 6461-6469.
- Malter, J.S. and Hong, Y. 1991. A redox switch and phosphorylation are involved in the post-translational up-regulation of the adenosine-uridine binding factor by phorbol ester and ionophore. *J Biol Chem* 266(5): 3167-3171.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97(11): 3333-3341.

- Maris, C., Masse, J., Chester, A., Navaratnam, N., and Allain, F.H. 2005. NMR structure of the apoB mRNA stem-loop and its interaction with the C to U editing APOBEC1 complementary factor. *RNA* 11(2): 173-186.
- 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.
- 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.
- Meisner, N.C., Hintersteiner, M., Mueller, K., Bauer, R., Seifert, J.M., Naegeli, H.U., Ottl, J., Oberer, L., Guenat, C., Moss, S. et al. 2007. Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat Chem Biol* 3(8): 508-515.
- Meisner, N.C., Hintersteiner, M., Seifert, J.M., Bauer, R., Benoit, R.M., Widmer, A., Schindler, T., Uhl, V., Lang, M., Gstach, H. et al. 2009. Terminal adenosyl transferase activity of posttranscriptional regulator HuR revealed by confocal on-bead screening. *J Mol Biol* 386(2): 435-450.
- Messias, A.C. and Sattler, M. 2004. Structural basis of single-stranded RNA recognition. *Acc Chem Res* 37(5): 279-287.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3(3): REVIEWS0004.
- Ming, X.F., Stoecklin, G., Lu, M., Looser, R., and Moroni, C. 2001. Parallel and independent regulation of interleukin-3 mRNA turnover by phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 21(17): 5778-5789.
- Monteleone, G., Boirivant, M., Pallone, F., and MacDonald, T.T. 2008. TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1: S50-S53.
- Morrison, S.J. and Weissman, I.L. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1(8): 661-673.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Rajmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S., and Wilusz, J. 2002. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J* 21(1-2): 165-174.
- Nagy, E. and Rigby, W.F. 1995. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J Biol Chem* 270(6): 2755-2763.
- Nakagawa, J., Waldner, H., Meyer-Monard, S., Hofsteenge, J., Jenö, P., and Moroni, C. 1995. AUH, a gene encoding an AU-specific RNA binding protein with intrinsic enoyl-CoA hydratase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 2051-2055.
- Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.D., Holtmann, H., Kollias, G., and Gaestel, M. 2002. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 277(5): 3065-3068.
- Newbury, S.F., Muhlemann, O., and Stoecklin, G. 2006. Turnover in the Alps: an mRNA perspective. Workshops on mechanisms and regulation of mRNA turnover. *EMBO Rep* 7(2): 143-148.



- Nguyen Chi, M., Chalmel, F., Agius, E., Vanzo, N., Khabar, K.S., Jegou, B., and Morello, D. 2009. Temporally regulated traffic of HuR and its associated ARE-containing mRNAs from the chromatoid body to polysomes during mouse spermatogenesis. *PLoS One* 4(3): e4900.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3): 694-702.
- Orkin, S.H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1(1): 57-64.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273(5272): 242-245.
- 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.
- Papadakis, K.A. and Targan, S.R. 2000. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 51: 289-298.
- Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. 2005. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 202(11): 1599-1611.
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B. et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180(5): 1955-1960.
- Phillips, K., Kedersha, N., Shen, L., Blackshear, P.J., and Anderson, P. 2004. Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(7): 2011-2016.
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A.R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Krusys, V., Streuli, M. et al. 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J* 19(15): 4154-4163.
- Pressman, S., Bei, Y., and Carthew, R. 2007. Posttranscriptional gene silencing. *Cell* 130(3): 570.
- Rajasingh, J., Bord, E., Luedemann, C., Asai, J., Hamada, H., Thorne, T., Qin, G., Goukassian, D., Zhu, Y., Losordo, D.W. et al. 2006. IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. *FASEB J* 20(12): 2112-2114.
- Ramos, S.B., Stumpo, D.J., Kennington, E.A., Phillips, R.S., Bock, C.B., Ribeiro-Neto, F., and Blackshear, P.J. 2004. The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* 131(19): 4883-4893.
- Randall, T.D., Lund, F.E., Howard, M.C., and Weissman, I.L. 1996. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood* 87(10): 4057-4067.
- Robb, L. 2007. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26(47): 6715-6723.
- Rosenbauer, F. and Tenen, D.G. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7(2): 105-117.

- Ross, J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59(3): 423-450.
- Sadri, N. and Schneider, R.J. 2009. Auf1/Hnmpd-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol* 129(3): 657-670.
- Schmidlin, M., Lu, M., Leuenberger, S.A., Stoecklin, G., Mallaun, M., Gross, B., Gherzi, R., Hess, D., Hemmings, B.A., and Moroni, C. 2004. The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. *EMBO J* 23(24): 4760-4769.
- Schmidt, C., Marth, T., Wittig, B.M., Hombach, A., Abken, H., and Stallmach, A. 2002. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 70(3): 177-183.
- Shaikh, A.C. and Sadowski, P.D. 1997. The Cre recombinase cleaves the lox site in trans. *J Biol Chem* 272(9): 5695-5702.
- Shaw, G. and Kamen, R. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46(5): 659-667.
- Shyu, A.B. and Wilkinson, M.F. 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* 102(2): 135-138.
- Stefl, R., Skrisovska, L., and Allain, F.H. 2005. RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* 6(1): 33-38.
- Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 117(3): 514-521.
- Stumpo, D.J., Byrd, N.A., Phillips, R.S., Ghosh, S., Maronpot, R.R., Castranio, T., Meyers, E.N., Mishina, Y., and Blackshear, P.J. 2004. Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol Cell Biol* 24(14): 6445-6455.
- Sun, L., Stoecklin, G., Van Way, S., Hinkovska-Galcheva, V., Guo, R.F., Anderson, P., and Shanley, T.P. 2007. Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor- α mRNA. *J Biol Chem* 282(6): 3766-3777.
- 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.
- 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 α in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4(5): 445-454.
- Tenen, D.G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3(2): 89-101.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. 2000. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290(5499): 2152-2154.
- Varani, G. and Nagai, K. 1998. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 407-445.
- Vasudevan, S. and Steitz, J.A. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128(6): 1105-1118.



- von Roretz, C. and Gallouzi, I.E. 2008. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? *J Cell Biol* **181**(2): 189-194.
- 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. 2000. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* **19**(10): 2340-2350.
- Warren, M.K. and Vogel, S.N. 1985. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. *J Immunol* **134**(2): 982-989.
- Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.R. 2002. Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* **17**(3): 277-288.
- Wilson, G.M. and Brewer, G. 1999. The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 257-291.
- Wilson, G.M., Sutphen, K., Chuang, K., and Brewer, G. 2001. Folding of A+U-rich RNA elements modulates AUF1 binding. Potential roles in regulation of mRNA turnover. *J Biol Chem* **276**(12): 8695-8704.
- Wilusz, C.J., Wormington, M., and Peltz, S.W. 2001. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4): 237-246.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* **2**(3): 541-546.
- Ye, M., Iwasaki, H., Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., Xie, H., Heck, S., Clausen, B., Akashi, K., and Graf, T. 2003. Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity* **19**(5): 689-699.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Frankenberger, M., and Wedel, A. 1995. Tolerance to lipopolysaccharide in human blood monocytes. *Immunobiology* **193**(2-4): 217-223.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**(3): 405-413.
- 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.