



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη μορίων ρυθμιστών του RNA στα  
σηματοδοτικά μονοπάτια της πόλωσης των  
μακροφάγων**

**RNA-regulating molecules in signaling  
pathways of macrophage polarisation**

Αντώνης Προσίλης

Επιβλέπων

**Δρ. Δημήτριος Κοντογιάννης**

Συνεπιβλέπωντες

Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός

Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά

Εργαστήριο μετα-μεταγραφικού ελέγχου, Ερευνητικό κέντρο βιοϊατρικών  
επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», Βάρη, Αττική

2015-2016

## Περίληψη

---

Η HuR είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του mRNA, η οποία κατέχει μια πληθώρα δράσεων. Στα μακροφάγα, δεν είναι ξεκάθαρο αν η HuR εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια σημάτων που επάγουν τους προ (κατάσταση M1) ή αντιφλεγμονώδης (κατάσταση M2) φαινότυπους που παρατηρούνται κατά τη πορεία μια φλεγμονώδους αντίδρασης. Στη παρούσα διπλωματική, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές αθανатоποιημένων μακροφάγων στις οποίες, η HuR, εκφραζόταν φυσιολογικά, υπερεκφραζόταν, δεν εκφραζόταν καθόλου ή επανεκφραζόταν. Αυτά τα κύτταρα πλώθηκαν προς προ και αντιφλεγμονώδης φαινότυπους και λήφθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, με τα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωμα κατά Western για την ανίχνευση μεταγραφικών παραγόντων που έχουν εμπλακεί στη διαδικασία της πλώσης. Επίσης, με τα ίδια εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά λειτουργικών πειραμάτων ανίχνευσης μονοξειδίου του αζώτου και αργινάσης, χαρακτηριστικών δεικτών των καταστάσεων M1 και M2 αντίστοιχα. Δημιουργήθηκαν αθανатоποιημένα μακροφάγα που υπερεκφράζουν και επανεκφράζουν τη HuR και μαζί με τα ήδη υπάρχοντα μακροφάγα αγρίου τύπου και απουσίας της HuR, πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντίσωμα έναντι της HuR που εισάχθηκε στα κύτταρα. Έτσι επιβεβαιώθηκε η διαφορεική έκφραση της HuR ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές. Στη συνέχεια, με τις δοκιμασίες ανίχνευσης μονοξειδίου του αζώτου και αργινάσης, φάνηκε ότι ο διασωθέν φαινότυπος ήταν ικανός να πλωθεί προς την κατάσταση M1 το ίδιο με κύτταρα αγρίου τύπου κάτι που δεν συνέβη κατά την πλώση προς τη κατάσταση M2, όπου ούτε ο διασωθέν φαινότυπος ούτε η υπερέκφραση της HuR ήταν ικανά να προσομοιάσουν την απόκριση των μακροφάγων αγρίου τύπου. Στο επόμενο πείραμα πλώσης, μακροφάγα που εκφράζαν ή όχι την HuR επώαστηκαν με αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών και φάνηκε πως η HuR πιθανώς εμπλέκεται σε περισσότερα μονοπάτια της κατάστασης M2 από ότι προς την M1, Τέλος, σε πειράματα ανοσοσύτρωσης κατά Western εκχυλισμάτων των ίδιων κυττάρων ανιχνεύθηκε η διαφορετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων IRF5, STAT6 και KLF4. Ο IRF5, δεν παρουσίασε κάποια αλλαγή στην έκφρασή του απουσία της HuR. Αντίθετα, ο STAT6 παρουσίασε μια αύξηση στην έκφρασή του και ο KLF4 μια μείωση όταν υπολείπεται η HuR από τα κύτταρα. Συλλήβδην, παρατηρήσαμε την αναγκαιότητα της HuR για την σωστή πλώση προς M1 ή M2 καθώς και την επιρροή της σε σημαντικά μονοπάτια των μακροφάγων με την αναγκαιότητα για περαιτέρω διερεύνηση των ρόλων της HuR να κρίνεται επιτακτική.

## Abstract

---

HuR is an RNA binding protein with a plethora of cellular functions. In macrophages, it's not clear if HuR is involved in the signaling pathways that induce the pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes that are present in an inflammatory response. In the current thesis, the cell lines that were used were immortalized macrophages that expressed HuR normally, overexpressed it, had HuR knocked out or were a rescued phenotype. Protein extracts from the above cell lines were used for the detection of certain transcriptional factors through Western's blot and a series of functional assays that detected NO or arginase, hallmark indicators of the M1 and M2 phenotype respectively. The macrophages that overexpressed HuR and the rescued phenotype were created in our lab and along with the wild type and HuR KO cells were polarized towards M1 or M2 and were used in a Western's blot assay using an a-HuR antibody to confirm the differential expression of HuR in the cells. Afterwards, using NO detection assay there was an indication that the rescued phenotype was capable of polarising towards M1 the same as the wild type macrophages. Meanwhile, we didn't observe a similar reaction when cells were polarised towards the M2 where none of the three other cell lines responses could even compare to the one of the wild type. Next, wild type and HuR KO polarised macrophages were incubated with inhibitors major signaling pathways and it is possible that HuR is involved in more pathways that are implicated in the M2 phenotype rather the M1. Finally, Western's blot assays were performed in WT and HuR KO macrophages to detect the expression levels of transcriptional factors IRF5, STAT6 and KLF4. IRF5 didn't show any change in its protein levels when HuR was gone. On the contrary, STAT6 had lower protein levels detected while KLF4 showed an increase in its expression between the macrophages that expressed HuR and those that didn't express it at all. Collectively, we saw the importance of HuR in the polarization process to either M1 or M2 as well as its influence in major signaling pathways of the macrophages with the necessity of further investigation of the roles of HuR being present.

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτή της της πτυχιακής, κ. Δημήτριο Κοντογιάννη. Με δέχτηκε στο εργαστήριό του, με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να υλοποιήσω την παρούσα πτυχιακή σε ένα τομέα των βιολογικών επιστημών που έχει ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου, την ανοσολογία. Πέρα από τις πρακτικές συμβουλές του για το πώς να δουλεύω σε ένα ερευνητικό εργαστήριο, το πιο σημαντικό ήταν πως με βοήθησε αναπτύξω την κριτική μου σκέψη και να μάθω να σκέφτομαι σαν ερευνητής. Οι συζητήσεις μας στο αυτοκινήτό του όταν με πηγαινοέφερνε στο εργαστήριο θα μου μείνουν αξέχαστες.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω το ειλικρινές μου ευχαριστώ στη Γιώτα Καφάσλα. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της, την υπομονή και επιμονή της να μου μεταλαμπαδεύει συνεχώς νέες γνώσεις, θεωρητικές και πρακτικές, αυτή η πτυχιακή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί. Η συνεχής επικοινωνία που είχαμε κατά την συγγραφή με βοήθησε να κατανοήσω πως γράφονται τα επιστημονικά άρθρα, μια γνώση ανεκτίμητη για έναν μελλοντικό ερευνητή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Νίκο Νατσαρίδη, Μαργαρίτα Ανδρεάδου, Ελίνα Χριστοδούλου, Ορσαλία Χαζάπη, Νίκη Λούρου και Μαργαρίτα Χατζιμικέ για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν.

# Περιεχόμενα

Περίληψη .....	2
Abstract .....	3
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Δομή και λειτουργία των TLR.....	7
1.2 Πορεία μιας φλεγμονώδης αντίδρασης .....	9
1.3 Πόλωση των μακροφάγων .....	10
1.3.1 Κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα .....	11
1.3.2 Εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα .....	13
M2a .....	13
M2b .....	15
M2c.....	15
M2d .....	16
1.4 Μέτα-μεταγραφική ρύθμιση στα μακροφάγα .....	17
Ρύθμιση σταθερότητας των mRNA.....	18
Μετάφραση mRNA .....	18
1.5 ARE Binding Proteins.....	19
TTP.....	19
AUF-1.....	19
TIA-1 .....	20
HuR .....	20
1.6 Στόχος της διπλωματικής .....	21
2. Υλικά και μέθοδοι .....	22
2.1 Γενικά Αντιδραστήρια .....	22
2.2 Θρεπτικά μέσα .....	24
2.3 Μέθοδοι .....	25
2.3.1 Δοκιμασία του Bradford's για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε δείγμα.....	25
2.3.2 Ήπια λύση κυττάρων και παραγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....	25
2.3.3 Δοκιμασία νιτρικού οξειδίου με τη μέθοδο Griess.....	26
2.3.4 Δοκιμασία δραστηριότητας αργινάσης .....	27
2.3.5 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε SDS-page πήκτωμα.....	28
Ηλεκτροφόρηση .....	28
Προετοιμασία SDS-Page.....	30
Προετοιμασία δειγμάτων που θα διαχωρίσουμε .....	31
2.3.6 Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	31

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με wet transfer.....	31
Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. ....	32
3.Αποτελέσματα.....	34
3.1 Διάγραμμα ροής εργασίας.....	34
3.2 Διαγονιδιακά συστήματα.....	35
3.3 Επιβεβαίωση των επιπέδων έκφρασης της HuR σε BMX2 και Cl6.....	37
3.4 Δημιουργία μακροφάγων που υπερεκφράζουν τη HuR και μακροφάγων KO που επανεκφράζουν τη HuR.....	38
3.5 Μακροφάγα που υπερεκφράζουν τη HuR και μακροφάγα του διασωθέν φαινότυπου δεν είναι ικανά να πολωθούν προς τη κατάσταση M2 στον ίδιο βαθμό με τα φυσικά τύπου μακροφάγα.....	40
3.6 Μακροφάγα με διασωθέν φαινότυπο μπορούν να πολωθούν στον ίδιο βαθμό με μακροφάγα φυσικού τύπου ενώ υπερέκφραση της HuR αδυνατεί να έχει παρόμοιο αποτέλεσμα.....	42
3.7 Σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν τη μεταβολική κατάσταση των μακροφάγων επηρεάζονται εντονότερα κατά την πόλωση προς τη κατάσταση M2.....	43
3.8 Αξιολόγηση έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην πόλωση προς M1/M2 παρουσία και απουσία της HuR.....	47
3.8.1 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα IRF5 δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της HuR.....	47
3.8.2 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT6 αυξάνεται όταν η HuR δεν εκφράζεται.....	49
3.8.3 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 είναι μειωμένη στα κύτταρα που δεν εκφράζουν τη HuR σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου μακροφάγα.....	50
4.Συζήτηση .....	52
Βιβλιογραφία .....	56

# 1.Εισαγωγή

---

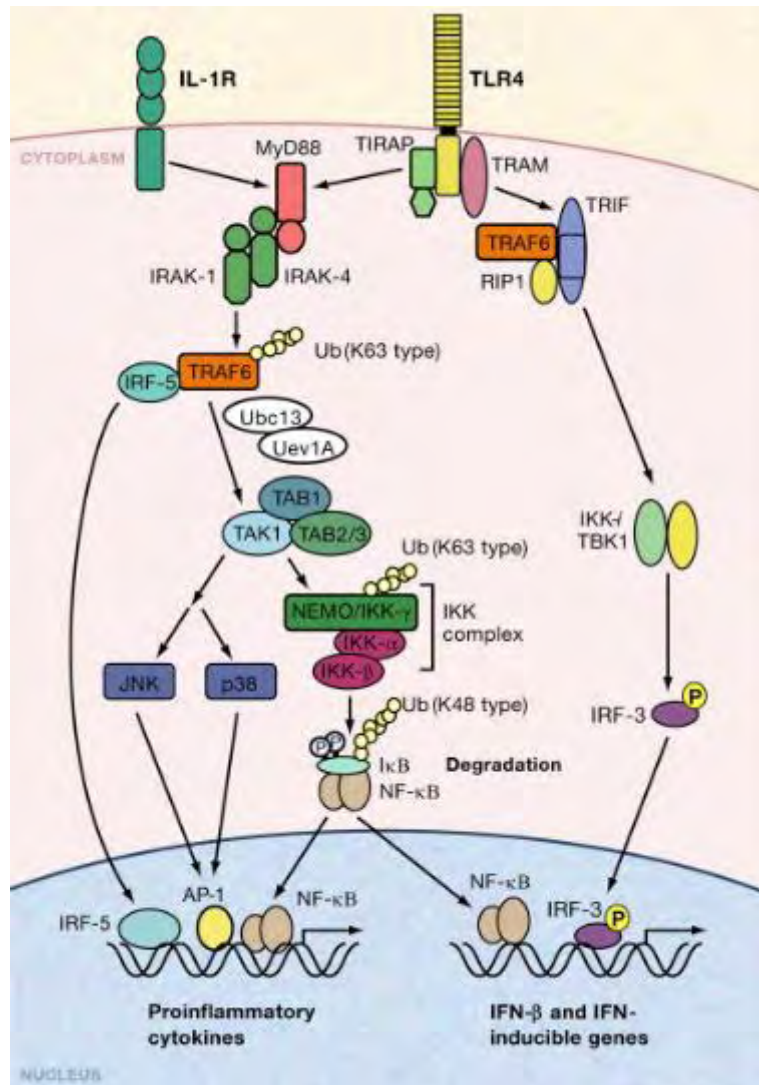
Τα μακροφάγα είναι φαγοκυτταρικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία βρίσκονται σε σχεδόν όλους τους ιστούς και επιδεικνύουν εξαιρετικά μεγάλη πλαστικότητα στις δράσεις και τους φαινότυπούς τους. Ο πρωταρχικός ρόλος τους είναι η αναγνώριση και η θανάτωση παθογόνων που εισβάλλουν στον οργανισμό με επιπλέον λειτουργίες στην ανάπτυξη, την ομοίωση, την ανάπτυξη των ιστών. Στα ενήλικα θηλαστικά, παρουσιάζουν μια κατανομή σε αρκετούς ιστούς, όπως στο ήπαρ, στο δέρμα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα κ.α. (1) Ανάλογα με το μικροπεριβάλλον του ιστού που εγκαθιδρύονται αποκτούν και ένα σύνολο νέων οργανοειδικών ιδιοτήτων, με τις περισσότερες από αυτές να σχετίζονται με την ομοίωση του ιστού, χωρίς να περιορίζονται μόνο σε αυτές. Ανεξαρτήτως, των νέων ιδιοτήτων που αποκτούν τον εκάστοτε ιστό, συνεχίζουν να διατηρούν κάποιες ιδιότητες ή δείκτες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που μοιράζονται με όλα τα μακροφάγα, συμπεριλαμβανομένου εκτενή λυσοσώματα και φαγοκυτταρική ικανότητα. (2) Λόγω του ρόλου τους στην ανίχνευση και θανάτωση μικροοργανισμών, τα μακροφάγα μπορούν να ανιχνεύουν ένα πλήθος ερεθισμάτων όπως βακτηριακά και ιικά αντιγόνα, ανοσοσυμπλέγματα και μόρια μεσολαβητές από άλλα κύτταρα. (3)

## 1.1 Δομή και λειτουργία των TLR

Η αναγνώριση των προαναφερθέντων σημάτων από τα μακροφάγα γίνεται μέσω ειδικών υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν μόρια που συγκροτούν συντηρημένες δομές σε μικροοργανισμούς και ονομάζονται σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs). Έχουν αναγνωριστεί 4 οικογένειες PRRs, οι υποδοχείς που μοιάζουν με Toll (Toll-like Receptors, TLRs), οι υποδοχείς C τύπου λεκτίνης (C-type lectin Receptors, CLRs), οι υποδοχείς που μοιάζουν με RIG-I (RIG-I-like Receptors, RLRs) και τους υποδοχείς που μοιάζουν με NOD (NOD-like Receptors, NLRs). (4) Η οικογένεια των TLR είναι μία από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες οικογένειες RRM και είναι υπεύθυνη να αναγνωρίζει παθογόνα τόσο στο εξωτερικό του κυττάρου όσο και ενδοκυτταρικά στα ενδοσώματα. (4)

Χαρακτηριστικά στη δομή των TLR είναι επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη στο N-τελικό άκρο (N-terminal leucine-rich repeats, LRRs) μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική επικράτεια ομολογίας Toll/IL-1R (cytoplasmic Toll/IL-1R homology, TIR). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 11 TLRs με διαφορετικούς TLR να αναγνωρίζουν διαφορετικά μοριακά πρότυπα μικροοργανισμών. (4)

Όταν ένα PAMP αναγνωριστεί από έναν PRR, έχουμε την ενεργοποίηση του μονοπατιού κάτωθεν του υποδοχέα και αλλαγή στο μεταγραφικό προφίλ του κυττάρου. Στα μακροφάγα χαρακτηριστική είναι η αναγνώριση του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) από τον TLR4 που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μακροφάγου.



Εικόνα 1. Ενεργοποίηση του TLR4 με τον προσδέτη του έχει σαν αποτέλεσμα την στρατολόγηση των πρωτεϊνών προσαρμογής Myd88 και TIRAP στον υποδοχέα. Έτσι σχηματίζεται το σύμπλοκο των IRAKs από τις IRAK1 και IRAK4. Με τη σειρά του εκείνο μπορεί και ενεργοποιεί τη δραστηριότητα E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης της TRAF6, η οποία με τη βοήθεια των UBC13 και UEV1A προσθέτει ουβικουιτίνες στο σύμπλοκο της TAK1 και επάγεται η δράση του μεταγραφικού παράγοντα IRF5 ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα. Φωσφορυλίωση του συμπλόκου IKK από την TAK1 οδηγεί στην ενεργοποίησή της και συνεπακόλουθη φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του αναστολέα του NF-κB, ο οποίος απελευθερώνεται και πλέον μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων. (5)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TLR4 παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 1. Με την πρόσδεση του LPS στον υποδοχέα, στρατολογείται η πρωτεΐνη προσαρμογής που περιλαμβάνει TIR επικράτεια (TIR domain containing adaptor protein, TIRAP) και στην συνέχεια η πρωτεΐνη πρωτεύουσας απόκρισης της μυελοειδούς διαφοροποίησης 88 (Myeloid



Differentiation Primary Response Protein 88, MyD88) δρα επίσης σαν πρωτεΐνη προσαρμογέας. Η MyD88 αλληλεπιδρά με την τέταρτη κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1R-associated kinase 4, IRAK-4) η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τις IRAK-1 και IRAK-2. Εκείνες αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF (TNFR-associated factor 6, TRAF6), ο οποίος δρα σαν λιγάση E3 της ουβικουτίνης. Ο TRAF6 προσθέτει μια αλυσίδα πολυουβικουτινιλίνης στο σύμπλοκο της κινάσης 1 που ενεργοποιείται από τον μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β-Activated Kinase 1, TAK1) και των πρωτεΐνων 1-3 που προσδέονται στην TAK1 (TAK1-Binding proteins, TAB1,2,3) και έτσι το σύμπλοκο ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την κινάση του αναστολέα του NF-κΒ (Inhibitor of κΒ Kinase, IKK). Η IKK φωσφορυλιώνει τον αναστολέα του NF-κΒ (Inhibitor of κΒ, IκΒ) και έτσι απελευθερώνεται ο NF-κΒ και μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα όπου επάγει την ενεργοποίηση γονιδίων των προ-φλεγμονωδών γονιδίων.

## 1.2 Πορεία μιας φλεγμονώδης αντίδρασης

Το παραπάνω μονοπάτι που περιγράφηκε είναι χαρακτηριστικό της ενεργοποίησης των μακροφάγων, η οποία με την σειρά της είναι το πρώτο βήμα για την εκδήλωση της φλεγμονώδης απόκρισης. Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία προσαρμογής που ενεργοποιείται από μόλυνση ή τραυματισμό του ιστού. (6). Διακρίνεται σε οξεία φλεγμονή που προκαλείται λόγω κάποιου τραυματισμού και σε χρόνια που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις όπως αρθρίτιδα. Η φλεγμονή αποτελείται από διακριτά βήματα τα οποία έχουν σαν σκοπό την καταστροφή του παθογόνου, απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και ανάπλαση του περιβάλλοντα ιστού. Το πρώτο βήμα, όπως αναφέρθηκε, είναι η ανίχνευση του παθογόνου από τα μακροφάγα του τραυματισθέντα ιστού. Εκείνα, μέσω των PAMP που διαθέτουν αναγνωρίζουν το παθογόνο και ενεργοποιούνται. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα μακροφάγα παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες όπως μεγαλύτερη φαγοκυτταρική ικανότητα, υψηλότερη αντιγονοπαρουσίαση μέσω μορίων MHC τάξης II και απελευθέρωση διαμεσολαβητών της φλεγμονής. Μέσα σε αυτούς τους διαμεσολαβητές είναι προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνη 6 ή παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), αγγειοδραστικοί παράγοντες, παράγοντες του συμπληρώματος, χημειοκίνες κ.α. Οι χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο επόμενο βήμα της φλεγμονής. Δρουν σαν χημειοτακτικοί παράγοντες που δεσμεύονται από τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η δέσμευση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μετανάστευση και εξαγγείωση των προαναφερθέντων κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Ο κυρίαρχος ρόλος των κυττάρων που προσελκύνονται στην

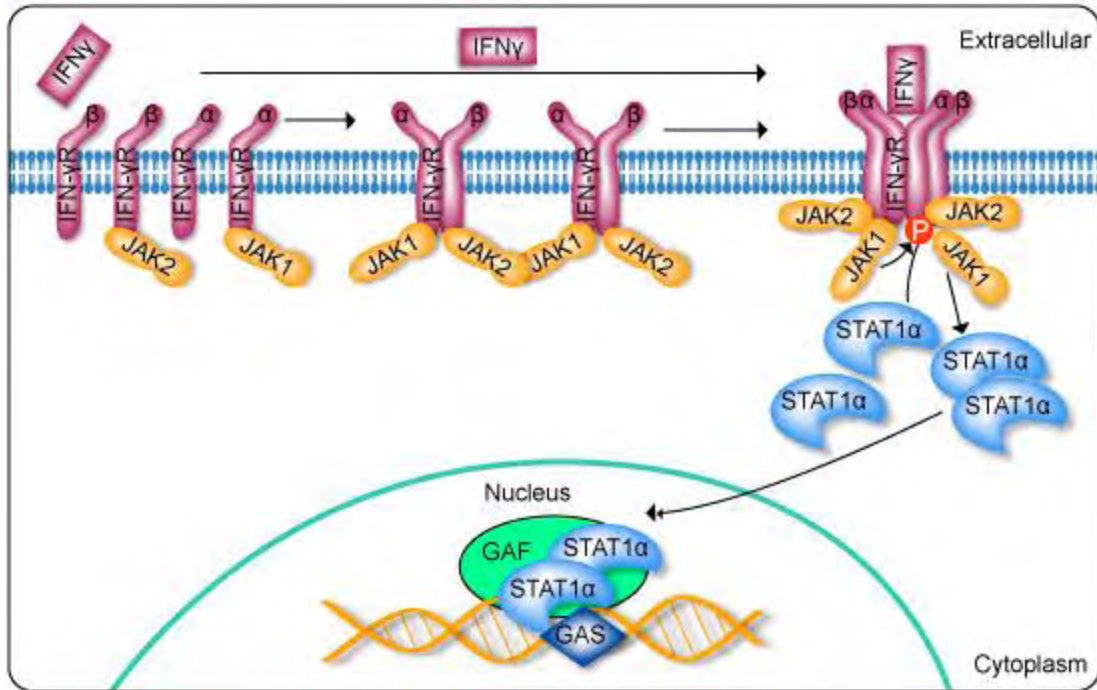
φλεγμώουσα περιοχή είναι απομάκρυνση του βλαπτικού παράγοντα. Αυτό γίνεται μέσω ενισχυμένης φαγοκυτταρικής ικανότητας των κυττάρων αυτών, παραγωγής δραστικών ριζών και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες αυτές από την μία έχουν αντιμικροβιακή δράση και από την άλλη μεταφέρονται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας σε άλλα μέρη του σώματος όπου επάγουν αλλαγές, οι οποίες υποστηρίζουν την ειδική ανοσία. Όταν ο παράγοντας που προκάλεσε βλάβη απομακρυνθεί, τότε έρχεται το τελικό βήμα λήξης της φλεγμονής. Αυτό επιτυγχάνεται με την διακοπή παραγωγής προ-φλεγμονωδών διαβιβαστών. Έτσι σταματάει η προσέλκυση περαιτέρω λευκοκυττάρων και μειώνεται το οίδημα. Έπειτα, τα κύτταρα που συμμετείχαν στην φλεγμονή απομακρύνονται. Είτε εισέρχονται στην κυκλοφορία είτε πεθαίνουν μέσω απόπτωσης και τα μακροφάγα αναλαμβάνουν το ρόλο της φαγοκυττάρωσης των νεκρών κυττάρων. Τέλος, με τη φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων, τα μακροφάγα φεύγουν από το σημείο της φλεγμονής μέσω της λέμφου. (7)

### 1.3 Πόλωση των μακροφάγων

Η πλαστικότητα είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μακροφάγων. Μπορούν και ανταποκρίνονται στα σήματα του περιβάλλοντος και να αλλάζουν την φυσιολογία τους (8). Μία από αυτές τις αποκρίσεις είναι κατά την οξεία φλεγμονή λόγω ενεργοποίησης κάποιου PRR, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα μακροφάγα όμως παίζουν ρόλο και στην χρόνια φλεγμονή, όπου με την βοήθεια των διαμεσολαβητών που παράγουν κύτταρα της ειδικής ανοσίας μπορούν να αλλάξουν περαιτέρω τον φαινότυπο τους ανάλογα με το είδος του σήματος που θα λάβουν. Έτσι, χαρακτηρίστηκε ένας αριθμός πλυθησμών μακροφάγων με διακριτές λειτουργίες και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Οι πιο καλά μελετημένοι πληθυσμοί μακροφάγων είναι τα κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή M1 μακροφάγα και τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή M2 μακροφάγα. Η διαδικασία ενεργοποίησης και αλλαγής σε ένα φαινότυπο των παραπάνω πλυθησμών, ονομάζεται πόλωση των μακροφάγων.

### 1.3.1 Κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα

Τα κλασσικά ενεργοποιημένα ή M1 μακροφάγα είναι σημαντικά κύτταρα τελεστές της αντιμικροβιακής άμυνας του οργανισμού. Χαρακτηριστικές λειτουργίες τους περιλαμβάνουν την υψηλή παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, υψηλή φαγοκυτταρική ικανότητα και παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου(9). Κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα έχουμε από την συνδυαστική δράση δύο σημάτων. Το πρώτο σήμα είναι εκείνο της Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) και είναι ένα σήμα «διέγερσης» (priming). Αυτό σημαίνει ότι η INF- $\gamma$  από μόνη της δεν είναι ικανή να πολώσει πλήρως τα μακροφάγα προς την M1 κατάσταση. Εικάζεται ότι η διέγερση μέσω της INF- $\gamma$  αποσκοπεί στην ενίσχυση των πρώιμων αποκρίσεων της έμφυτης ανοσίας και για να εξασφαλίσουν τάχιση απόκριση σε μολύνσεις (14,15). Πηγή INF- $\gamma$  για τα μακροφάγα είναι αρχικά τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cell, NK cell) και μετέπειτα τα T βοηθητικά 1 (T helper 1, T<sub>H</sub>1) (8). Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που δρα η INF- $\gamma$  καλά χαρακτηρισμένο όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Το σήμα ξεκινάει όταν η INF- $\gamma$  προσδέεται στον υποδοχέα της, ο οποίος αποτελείται από δύο αλυσίδες που προσδέουν την INF- $\gamma$  και δύο αλυσίδες που είναι υπεύθυνες για την μεταγωγή του σήματος, IFNGR1 και IFNGR2 αντίστοιχα. Στη συνέχεια οι κινάσες Jak1 και Jak2 είναι προσδεμένες στον υποδοχέα και κατά την ενεργοποίησή του, τον φωσφορυλιώνουν σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης το οποίο εξυπηρετεί σαν σημείο αγκυροβόλησης για τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1. Εκείνος φωσφορυλιώνεται, ομοδιμερίζεται και μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και ασκεί της δράσης του σαν μεταγραφικός παράγοντας γονιδίων που έχουν την αλληλουχία ενεργοποίησης από INF- $\gamma$  (INF- $\gamma$  activation sequence, GAS) όπως της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthetase 2, NOS2) και του αναστολέα της σηματοδότησης από κυτταροκίνες 3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3, SOCS3).(13)



Εικόνα 2. Η IFN-γ εκκρίνεται κυρίως από από τα ενεργοποιημένα NK και τα CD4+ Th1 κύτταρα. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση των αντιμικροβιακών και προφλεγμονωδών ρόλων των μακροφάγων ενώ μπορεί να παίζει ρόλο και σε άλλες λειτουργίες όπως την διαφοροποίησή τους. Η σηματοδότηση της IFN-γ λαμβάνει χώρα μέσω του υποδοχέα της IFN-γR, ο οποίος αποτελείται από δυο άλφα (alpha chains) και δύο βήτα αλυσίδες (beta chains). Πρόσδεση της IFN-γ στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης του και ενεργοποίηση των κινασών Jak1 και Jak2 που βρίσκονται στην ενδοκυτταρική πλευρά του. Οι κινάσες αυτές των φωσφορυλιώνουν σε ένα κατάλυτο τυροσίνης, το οποίο αναγνωρίζει το μονομερές του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 στο κυτταρόπλασμα. Πρόσδεση του STAT1 στον IFN-γR, έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση από τις κινάσες Jak, τον ομοδιμερισμό των STAT1 και μετανάστευση του ομοδιμερούς στον πυρήνα του κυτταρού όπου μπορεί να επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων. [http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h\\_ifngPathway.php](http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_ifngPathway.php)

Το δεύτερο σήμα για την κλασική ενεργοποίηση είναι ένας προσδέτης των TLR. Όπως αναφέρθηκε οι προσδέτες αυτοί είναι μόρια από παθογόνα που ονομάζονται PAMPs, όπως το LPS που ενεργοποιεί τον TLR4. Από την ενεργοποίηση του TLR4, έχουμε τελικά την ενεργοποίηση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων όπως τον πυρηνικό παράγοντα κάρπα-ενισχυτή της ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB), ρυθμιστικούς παράγοντες της ιντερφερόνης 3 και 5 (Interferon-Regulatory Factor, IRF3, IRF5) και την πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1 (Activator Protein 1). (Εικόνα 1) Όλοι οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων που είναι χαρακτηριστικά για τα κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα όπως προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες (ιντερλευκίνη 12, ιντερλευκίνη 6, TNF), χημειοκίνες, ενίσχυση έκφρασης του NOS2 και μόρια που σχετίζονται με την αντιγονοπαρουσίαση. (13). Αν και υπάρχει ένας βαθμός αλληλεπικάλυψης στα γονίδια στόχους των σηματοδοτικών μονοπατιών της IFN-γ και του LPS, και τα δύο ερεθίσματα είναι αναγκαία για την πλήρη πόλωση των μακροφάγων προς την M1 κατάσταση

Οι προφλεγμονώδης διαμεσολαβητές που παράγονται από τα κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι απαραίτητοι για την επιτυχημένη καταπολέμηση παθογόνων και καρκινικών κυττάρων (14) Απώλεια ρύθμισης των M1 μακροφάγων μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την υπερβολική έκκριση τέτοιων διαμεσολαβητών. Κάτι το οποίο είναι επιβλαβές για τον οργανισμό, καθώς έχουμε την καταστροφή του περιβάλλοντα ιστού μαζί με τα παθογόνα. Επιποροσθέτως, η ανεξέλεγκτη παραγωγή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών έχει συνθεδεί με χρόνια φλεγμονή σε παχύσαρκα άτομα. (15). Τα παραπάνω είναι μόνο μερικά από τα παραδείγματα όπου η απορρύθμιση των κλασσικά ενεργοποιημένων μακροφάγων οδηγεί στην εμφάνιση ασθενειών. Έτσι, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για λεπτή ρύθμιση στην παραγωγή των προ-φλεγμονωδών διαμεσολαβητών από τα μακροφάγα.

### 1.3.2 Εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα

Ο όρος εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για να περιγράψει ένα μεγάλο αριθμό μακροφάγων, τα οποία δεν παρουσίαζαν τα προ-φλεγμονώδη χαρακτηριστικά των κλασσικά ενεργοποιημένων μακροφάγων και παρουσίαζαν ένα εύρος ικανοτήτων από την αντιμετώπιση μυκήτων μέχρι την ανοσορρύθμιση. Για το λόγο αυτό κατηγοριοποιήθηκαν όλα ως αντι-φλεγμονώδη. Περαιτέρω χαρακτηρισμός αυτών των αντι-φλεγμονωδών μακροφάγων έδειξε ετερογένεια στα μοριακά τους προφίλ καθώς και στα ερεθίσματα που τα επάγουν. (16)

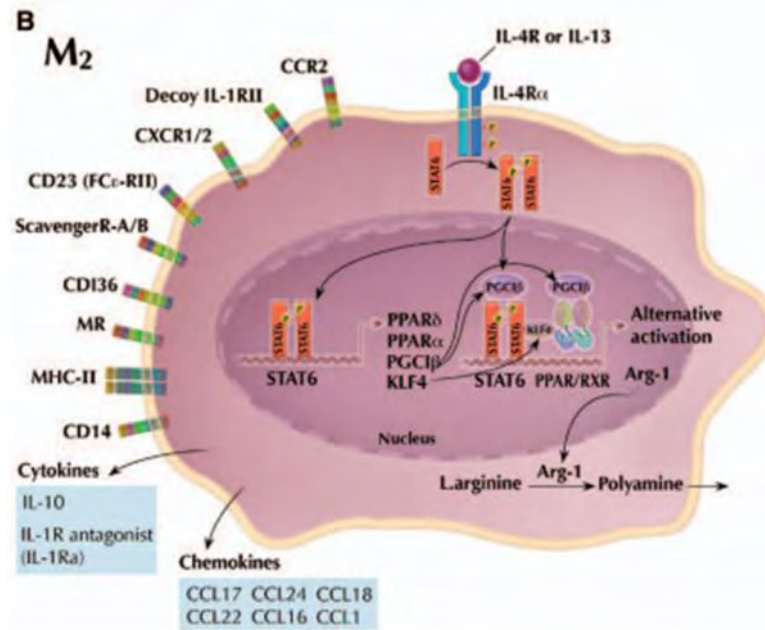
Συνεπώς, τα M2 μακροφάγα ομαδοποιούνται πλέον σε τέσσερις διακριτούς υποπληθυσμούς βάση της έκφρασης πρωτεϊνών που αποτελούν μοριακοί δείκτες. Οι υποπληθυσμοί αυτοί είναι: τα M2a, M2b, M2c και τα M2d.

#### M2a

Τα M2a μακροφάγα είναι ο πιο καλά μελετημένος υποπληθυσμός των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων. Χαρακτηριστικές είναι οι δράσεις τους στην απομάκρυνση παρασίτων (17), την επούλωση πληγών (18) και την προώθηση T<sub>H</sub>2 αποκρίσεων. Το σήμα για την επαγωγή των M2a μακροφάγων είναι η IL-4 που εκκρίνεται αρχικά από τα ουδετερόφιλα και τα σητευτικά κύτταρα (19,20) και στη συνέχεια από κύτταρα της ειδικής ανοσίας όπως τα T βοηθητικά 2.

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος για την εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων περιλαμβάνει την κυτταροκίνη IL-4 και τον υποδοχέα της IL-4R τύπου 1. Ο υποδοχέας είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από 2 αλυσίδες, την IL-4Ra και την κοινή γάμμα αλυσίδα (common gamma chain, γc). Η IL-4Ra είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της IL-4, η οποία όταν

δεσμευτεί επάγει τον διμερισμό των δύο αλυσίδων. Εκτός από τον διμερισμό, η IL-4 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των κινασών Jak1 και Jak 3, οι οποίες στη συνέχεια ελέγχουν την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης στις δύο αλυσίδες του υποδοχέα. Τα κατάλοιπα αυτά δρουν ως σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων STAT6 οι οποίοι αλληλεπιδρούν μέσω των SH2 περιοχών τους με τον υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο των STAT6, το οποίο είναι και απαραίτητο για το διμερισμό τους. Μετά την φωσφορυλίωσή του, ο STAT6 ομοδιμερίζεται και μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας(21). Τα γονίδια στόχοι του ομοδιμερούς STAT6 είναι αρχικά άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως υποδοχείς του υπεροξειδιοσώματος που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Peroxisome Proliferator–Activated Receptors, PPARs) με τον PPAR $\gamma$  να εμποδίζει την κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων και τον PPAR $\beta/\delta$  να ευνοεί την εναλλακτική ενεργοποίηση. Μαζί με τους PPARs, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι παράγοντες που μοιάζουν με την πρωτεΐνη Krüppel της *Drosophila* (Krüppel-like Factors, KLFs) με τον σημαντικότερο να είναι ο KLF4. Όλοι οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες δρουν συνεργατικά για την έκφραση των γονιδίων που χαρακτηρίζουν τα M2a όπως την αργινάση 1 (Arginase 1 , Arg1), τον υποδοχέα μανόζης των μακροφάγων 1( Macrophage Mannose Receptor 1, Mrc1), την πρωτεΐνη που μοιάζει με την ρεζιστίνη  $\alpha$  (Resistin-like  $\alpha$ , Retn1 $\alpha$ ) κ.α. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η έκφραση της Arg1, ένζυμο που μεταβολίζει την αργινίνη σε ορνιθίνη και ουρία. Παρατηρούμε μια αλλαγή στην αξιοποίηση της αργινίνης από τα M2a σε σύγκριση με τα M1 όπου η αργινίνη χρησιμοποιούταν από την NOS2 για την παραγωγή NO. Για το λόγο αυτό, η ανίχνευση του NO και της ουρίας αποτελούν ορόσημα στην διάκριση μεταξύ πόλωσης προς M1 και M2 αντίστοιχα.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση κάποιων επιφανειακών δεικτών στα M2a μακροφάγα, του μονοπατιού ενεργοποίησής τους από την IL-4 και των μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν κομβικό ρόλο στην επαγωγή γονιδίων χαρακτηριστικών για την επαγωγή των M2a μακροφάγων. (22)

## M2b

Η δεύτερη κατηγορία είναι τα M2b, κύτταρα παρόμοια στις δράσεις τους με τα M2a, καθώς έχουν βρεθεί και αυτά να παίζουν ρόλο στην ανοσορύθμιση και την επαγωγή T<sub>H</sub>2 αποκρίσεων.(23) Παρ' όλα αυτά, το σήμα για την επαγωγή M2b μακροφάγων είναι διαφορετικό, καθώς φαίνεται πως χρειάζονται ένα διπλό ερέθισμα όπως τα M1 μακροφάγα. Όταν ένα αντίσωμα αναγνωριστεί από ένα Fcγ υποδοχέα σε μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί από LPS, τότε έχουμε την παύση παραγωγής IL-12 με ταυτόχρονη παραγωγή IL-10 και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (24). Το μονοπάτι σηματοδότησης των FcγR στα μακροφάγα δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστό αλλά γνωρίζουμε ότι οι σχετίζονται η κινάση τυροσίνης του σπλήνα (Spleen Tyrosine Kinase, Syk) και η κινάση της 3-φωσφοϊνοσιτόλης (Phosphoinositide-3 kinase). (25)

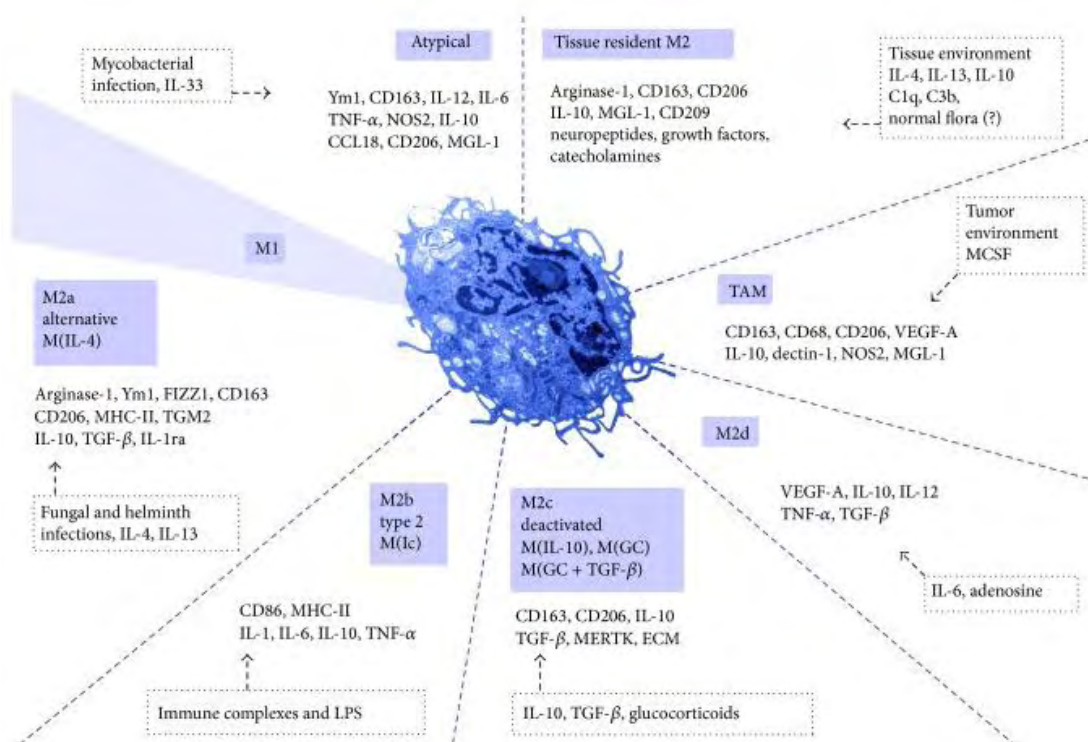
## M2c

Τα M2c είναι ο τρίτος γνωστός υποπληθυσμός των μακροφάγων. Πρόκειται για αντι-φλεγμονώδη μακροφάγα που είναι υπεύθυνα για την λήξη μιας φλεγμονής καθώς διαθέτουν λειτουργίες όπως αυξημένη φαγοκυττάρικη ικανότητα αποπτωτικών κυττάρων και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας και του ιστού. (26). Το σήμα που ευθύνεται κυρίως για την επαγωγή των M2c είναι η IL-10 με μικρότερο ρόλο να παίζουν οι γλυκοκορτικοειδής ορμόνες. (28) Τα γονίδια που επάγονται σε αυτά τα μακροφάγα σχετίζονται κυρίως με την

φαγοκυττάρωση και την αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας με χαρακτηριστικό παράδειγμα του τελευταίου να είναι η έκφραση της Arg1, υπεύθυνη για την παραγωγή απαραίτητων πολυαμινών. (27)

## M2d

Τελευταίος υποπληθυσμός των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων είναι τα M2d. Ως ο λιγότερο χαρακτηρισμένος υποπληθυσμός, δεν είναι ακόμα γνωστές οι δράσεις των κυττάρων αυτών. Παρ' όλα αυτά, γνωρίζουμε πως η πρόσδεση της αδενοσίνης στον υποδοχέα της A<sub>2</sub>AR με ταυτόχρονη ενεργοποίηση κάποιου μονοπατιού TLR, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή M2d μακροφάγων και των γονιδίων που έχουν σχετιστεί με αυτά. Χαρακτηριστική είναι η μείωση παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών με ταυτόχρονη άυξη της IL-10 και του αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Τα παραπάνω υποδεικνύουν μια πιθανή εμπλοκή των M2d στην ανάπλαση του τραυματισμένου ιστού. (16)



Εικόνα 4. Επισκόπηση των καταστάσεων ενεργοποίησης των μακροφάγων. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων συνήθως αναφέρεται μόνο στη προφλεγμονώδη M1 και την αντιφλεγμονώδη M2. Η M2 κατάσταση περιέχει ετερογενείς υποπληθυσμούς μακροφάγων με διακριτά χαρακτηριστικά. Το διάγραμμα απεικονίζει τους πιο χαρακτηριστικούς φαινότυπους ενεργοποίησης των μακροφάγων καθώς επίσης και τις χαρακτηριστικές πρωτεΐνες που παράγονται από εκάστοτε υποπληθυσμό. Τα κουτιά με τις διακεκομμένες γραμμές περιέχουν τα ερεθίσματα υπεύθυνα για τον κάθε τύπο μακροφάγου. (28)



Όπως και για τα M1, έτσι και για τα M2 μακροφάγα απορρύθμιση της λειτουργίας τους συνεπάγεται με προβλήματα στον οργανισμό. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα εμπλοκής κάποιων υποπληθυσμών εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων όπου καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλεργίας (9) καθώς και είδη καρκίνων (29).

#### 1.4 Μέτα-μεταγραφική ρύθμιση στα μακροφάγα

Από την αρχή ως το τέλος μιας φλεγμονώδους αντίδρασης, λειτουργεί ένα δυναμικό σύστημα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Με την ενεργοποίηση των PRRs έχουμε την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών. Αποτέλεσμα της είναι η κινητοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι προκαλούν αλλαγές στην έκφραση εκατοντάδων γονιδίων, που εμπλέκονται στην αντιμικροβιακή άμυνα έως την ανάπλαση του ιστού. Λόγω της πληθώρας των σημάτων που δέχονται τα κύτταρα της φυσικής άμυνας κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων πρέπει να είναι καλά ρυθμισμένη, γρήγορη και δυναμική στις αλλαγές. Παρατεταμένη ή απορρυθμισμένη έκφραση μπορεί να είναι επιβλαβή για τον οργανισμό οδηγώντας σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής.

Για το λόγο αυτό, πέρα από τον έλεγχο κατά την μεταγραφή, τα κύτταρα της ανοσίας χρησιμοποιούν μια πληθώρα μετα-μεταγραφικών σημείων ελέγχου. (30) Τα πιο καλά μελετημένα, είναι κατά την συρραφή των εξωνίων του mRNA, η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και η μετάφραση των mRNA. Αυτές οι διαδικασίες δίνουν στα κύτταρα την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν και να απενεργοποιήσουν ταχύτατα τις αποκρίσεις τους στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. (31,32)

Οι παραπάνω διαδικασίες ελέγχονται και εκτελούνται μέσω διάφορων ρυθμιστικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (Ribonucleoprotein complex, RNP). Πρόκειται για σύμπλοκα αποτελούμενα από πρωτεΐνες πρόσδεσης του RNA (RNA Binding Protein, RBP) και κάποιες φορές μη κωδικοποιητικά RNA (non coding RNA). Η σύσταση των RNPs βρίσκεται σε συνεχή αλλαγή με κάποιες RBPs να παραμένουν στο mRNA καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ενώ κάποιες άλλες δεσμεύονται ή αποδεσμεύονται ανάλογα με τον υποκυτταρική θέση του μορίου. (33)

Η εναλλακτική συναρμογή είναι αποτέλεσμα εξωτερικών ερεθισμάτων και χρειάζεται αρκετές βοηθητικές RBPs όπως οι hnRNPs ή οι SR RBPs. (34,35)

### **Ρύθμιση σταθερότητας των mRNA**

Στη συνέχεια, είναι η ρύθμιση της σταθερότητας του μεταγράφου, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης ρυθμιστικών RBP. Αυτές οι RBP, αναγνωρίζουν αλληλουχίες στο mRNA, προσδένονται σε αυτές και ασκούν τις δράσεις τους. Αυτές μπορεί να είναι είτε επαγωγή της αποικοδόμησης του μεταγράφου ή σταθεροποίησή του. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος αποικοδόμησης του είναι μέσω της αφαίρεσης της πολύ-A ουράς ή της 5' καλύπτρας και την συνεπακόλουθη δράση εξωνουκλεασών. Αντίθετα, η σταθεροποίηση των mRNA επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ανταγωνιστικής δράσης των RBP που σταθεροποιούν με εκείνω που επάγουν την αποικοδόμηση και τον ανταγωνισμό για κοινά σημεία πρόσδεσης στο μετάγραφο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι RBPs που προδένονται σε στοιχεία πλούσια σε AU [AU rich element (ARE)-Binding Protein, ARE-BPs]. Αυτά τα cis στοιχεία εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή πολλών mRNA σχετικά με την ανοσία, με κάποιες ARE-BPs να εμφανίζουν σταθεροποιητικές ιδιότητες και κάποιες αποικοδομητικές.

### **Μετάφραση mRNA**

Η μετάφραση των mRNA της ανοσίας ελέγχεται και μέσω της αναστολής της συναρμολόγησης του συμπλόκου 80S από τα συστατικά του σύμπλοκα 40S και 60S κατά την έναρξη της μετάφρασης ή κατά την σύνθεση της πρωτεΐνης στο στάδιο της επιμήκυνσης. Το πρώτο φαίνεται να επηρεάζεται κυρίως από διάφορα ρυθμιστικά RNP ενώ το δεύτερο από σήματα του κύτταρου (36).

## 1.5 ARE Binding Proteins

Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας εξελίχθηκαν να αναγνωρίζουν βλαπτικούς παράγοντες, να απομακρύνουν νεκρά κύτταρα, να συνεργάζονται με την ειδική ανοσία και να βοηθούν στην ανάπλαση των ιστών. (37) Για να μπορέσουν να ανταποκριθούν σε όλες αυτές τις λειτουργίες, τα κύτταρα εκφράζουν μια πληθώρα RBPs που μέσω δυναμικών αλλαγών στη σύσταση τους στα RNPs, βοηθάνε τα κύτταρα να ανταποκριθούν σε στο μικρο-περιβάλλον της φλεγμονής.

Σημαντικοί τελεστές στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση στα κύτταρα της ανοσίας είναι οι ARE-BPs. Όπως αναφέρθηκε οι ARE-BPs αναγνωρίζουν στοιχεία πλούσια σε AU. Αυτά τα AREs βρίσκονται στη 3' αμετάφραστη περιοχή πολλών mRNA και ειδικά μεταγράφων που κωδικοποιούν προ και αντιφλεγμονώδης διαμεσολαβητές όπως ο TNF, η IL-6, η IL-10 κ.α. (30) Συνήθως, τα ARE έχουν μήκος 50-100 νουκλεοτίδια και το στοιχείο UUAUUUAUU είναι η ελάχιστη ακολουθία που μπορεί να επάγει αποικοδόμηση του mRNA. (38). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 20 RBPs οι οποίες αναγνωρίζουν, στρατολογούνται στα ARE και καθορίζουν την σταθερότητα μεταγράφων στόχων. Ανάμεσα σε αυτές είναι η Τριστετραπρολίνη (Tristetraprolin, TTP), (39) ο παράγοντας δέσμησης/αποικοδόμησης πολύ U ARE 1 (ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1, AUF1) (40), η TIA-1 (41) και μέλη της οικογένειας ELAVL-1 (HuR, HuB, HuC, HuD) (42) με την κάθε μία από αυτές να ασκεί ξεχωριστές ρυθμιστικές δράσεις.

### TTP

Η TTP είναι μια πρωτεΐνη με δάκτυλο ψευδαργύρου που προσδέεται σε ARE και αποσταθεροποιεί προφλεγμονώδη μετάγραφα όπως TNF-α και IL-1β στρατολογώντας σύμπλοκα αποαδενυλίωσης με αποτέλεσμα την εξωνουκλεϊκή αποικοδόμηση τους. (43). Στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας η ρύθμιση της δράσης της TTP επάγεται από την ενεργοποίηση TLR και του υποδοχέα του TNF. Στο τέλος αυτών των μονοπατιών βρίσκονται κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν την TTP προκαλώντας αποσύνδεση της από τα mRNA στόχους και αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες αντάπτορες. Αυτό επιτρέπει στα μακροφάγα να εκκρίνουν προφλεγμονώδης διαμεσολαβητές όταν πρέπει. Αντίθετα, αντιφλεγμονώδη ή ανοσοκατασταλτικά ερεθίσματα προκαλούν αποφωσφορυλίωση της TTP, αποικοδόμηση των mRNA στόχων της. Ποντίκια που δεν εκφράζουν την TTP παρουσιάζουν αυτοάνοσα σύνδρομα με αρθρίτιδα, δερματίτιδα κ.α. (44)

### AUF-1

Ο AUF1 πρόκειται για έναν ακόμα παράγοντα που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση μεταγράφων μέσω των ARE. (40) Είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία ομοδιμερίζεται στις ουρακίλες των ARE και μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μαζί με το mRNA όπου και ασκεί τις

δράσεις της. Ποντίκια με μεταλλάξεις στο γονίδιο του AUF1 παρουσιάζουν φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο της έλλειψης της TTP, με ευαισθησία σε ενδοτοξίνες και εμφάνιση χρόνιας δερματίτιδας. (45,46)

### **TIA-1**

Η TIA-1, σε αντίθεση με τις προηγούμενες δύο ARE-BPs, δε ασκεί τις δράσεις της μέσω της στρατολόγησης αποικοδομητικών μηχανισμών. Αντ' αυτού δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της έναρξης της μετάφρασης των μεταγράφων. Στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων η TIA-1 μαζί με άλλες RBP μπορούν να καθυστερήσουν τη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης και να τα οδηγήσει στα κοκκία στρες. (47) τα ποντίκια που δεν εκφράζουν την TIA-1, είναι ευαίσθητα στη φλεγμονή, παρουσιάζουν παθολογικούς πνεύμονες και έχουν προδιάθεση για χρόνια αρθρίτιδα. (48,49)

### **HuR**

Πέρα από όλες τις RBP που δρουν αρνητικά στην έκφραση των mRNA, έχουν βρεθεί και κάποιες που μπορούν να έχουν θετική επίδραση στην έκφραση τους. Μία τέτοια είναι η ELAVL-1 (Embryonic Lethal Abnormal Vision Like 1 ή HuR) ανακαλύφθηκε στην *Drosophila* και υποκυτταρικά εντοπίζεται κυρίως στον πύρηνα ενώ μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα ως απάντηση σε κάποιο ερέθισμα. Μπορεί και προσδέεται με υψηλή συγγένεια σε mRNA που διαθέτουν ARE στοιχεία μέσω 3 περιοχών RRM διαθέτει επηρεάζοντας την σταθερότητα ή/και την μετάφρασή τους. Η HuR αρχικά θεωρήθηκε ότι προσδέεται στα ARE μεταγράφων και ανταγωνίζεται την πρόσδεση RNP που προάγουν την αποικοδόμηση και με αυτό τον τρόπο σταθεροποιεί τα mRNA στόχους. Γενετικές μελέτες όπου έλειπε η HuR από τα μακροφάγα ποντικών έδειξαν ότι απέκτησαν ευαισθησία σε ενδοτοξίνες, χρόνια φλεγμονή στο έντερο και φλεγμονώδη καρκινογένεση. (50) Αυτές οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HuR φάνηκε να σχετίζονται με την ικανότητα της να προσδέεται σε προφλεγμονώδη mRNA στόχους και να εμποδίζει την μετάφρασή τους καθώς επίσης και σε μετάγραφο χημειοκινών που επάγουν τη στρατολόγηση μονοκυττάρων και μακροφάγων στο σημείο της φλεγμονής. (50,51) Επιπροσθέτως, έχει προταθεί ότι η HuR μπορεί να εμποδίσει τις δράσεις της TTP και του AUF-1 κατά το μηχανισμό αποικοδόμησης μεταγράφων μέσω των AREs και να δράσει συνεργατικά με την TIA-1 για μεταφραστική σίγηση των μεταγράφων στόχων της. (51) Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η HuR έχει μια πληθώρα δράσεων στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Δρώντας συνδυαστικά μαζί με άλλες RBP επάγεται η δημιουργία διαφορετικών RNPs, τα οποία και τελικά καθορίζουν αν ένα μετάγραφο θα εκφραστεί ή θα αποικοδομηθεί.

## 1.6 Στόχος της διπλωματικής

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε ένα δυναμικό περιβάλλον, πρέπει να αναπτύξουν συστήματα τα οποία θα τους επιτρέψουν την γρήγορη προσαρμογή και ανταπόκριση στις οποιεσδήποτε απαιτήσεις μπορεί να προκύψουν. Έτσι και τα μακροφάγα, κύτταρα που κλασικά έχουν συσχετιστεί με την άμυνα του οργανισμού χρειάζονται την ικανότητα να μεταβάλλουν τον φαινότυπο και τις δυνατότητες τους ανάλογα με πως πρέπει να αποκριθούν στα σήματα του περιβάλλοντος. Μια τέτοια διαδικασία πρέπει να είναι ταχεία και κυρίως πολύ καλά ελεγχόμενη, πραγματά που δεν μπορούν να εξασφαλιστούν μόνο από την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Για τον λόγο αυτό τα μακροφάγα έχουν αναπτύξει και άλλους τρόπους ώστε να υπάρχει γρήγορη και αποτελεσματική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Στην παρούσα διπλωματική επιλέξαμε να μελετήσουμε πως ρυθμίζεται ο μετα μεταγραφικός έλεγχος και πιο συγκεκριμένα τον ρόλο που παίζει ένα κομβικό μόριο στην ενορχήστρωσή του, η RBP HuR, στην διαδικασία της πόλωσης των μακροφάγων.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν να διαπιστώσουμε εάν η HuR επηρεάζει τις διαδικασίες προς M1/M2 και αν η σηματοδότηση κατά την πόλωση επηρεάζεται από τη HuR. Μέσα από γενετικές μελέτες δείχτηκε ότι η HuR έχει κάποιο αρνητικό ρόλο στην έκφραση προφλεγμονωδών μεταγράφων και ίσως αυτό να οφείλεται στο ότι η HuR επηρεάζει κάποια κυτταρική κατάσταση. Υποθέσαμε ότι μπορεί να είναι η κατάσταση πόλωσης για αυτό χρησιμοποιήσαμε δύο δείκτες που επηρεάζονται από την πόλωση των μακροφάγων, το NO για την M1 κατάσταση και την ουρία που παράγεται λόγω της δράσης της αργινάσης 1 για την M2 κατάσταση και πραγματοποιήσαμε λειτουργικά πειράματα για την ανίχνευσή τους. Τέλος, πραγματοποιήσαμε ανοσοσύπωση κατά Western έναντι μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο τέλος των σηματοδοτικών μονοπατιών της IFN και του IL4 για να διαπιστώσουμε αν έχει απευθείας συσχέτιση στη σηματοδότηση η HuR.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Γενικά Αντιδραστήρια

#### Αντιδραστήριο

##### **Bradford's reagent**

#### Σύσταση

10 mg Coomassie Blue G250  
10 ml μεθανόλης  
20 ml 85% φωσφορικό οξύ  
170ml ddH<sub>2</sub>O

##### **10x PBS (Phosphate Buffered Saline)**

80g NaCl  
2g KCl  
14.4g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**

100g SDS  
900 ml ddH<sub>2</sub>O

##### **Lysis buffer**

Για παρασκευή 25 ml:  
-Tris pH 8.0 τελικής συγκέντρωσης  
20 mM  
-NaCl τελικής συγκέντρωσης 100 mM  
-Triton X-100 τελικής συγκέντρωσης  
0.5 %  
-Αναστολείς πρωτεασών τελικής συγκέν-  
τρωσης 1x  
-Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)  
τελικής συγκέντρωσης 1 mM

##### **Griess reagent**

Για παρασκευή 50 ml:  
-400 mg sulfanilamide (SIGMA S-8251)  
-100 mg Naphthyl-ethylenediamide  
Dichydrochloride (SIGMA N-5889)  
-10 ml ddH<sub>2</sub>O-αναδεύουμε  
-1.2 ml 85% Phosphoric Acid σε 8.8 ml

ddH<sub>2</sub>O-το προσθέτουμε στο παραπάνω  
μείγμα  
-20 ml of ddH<sub>2</sub>O

**1M Tris**

121.1g Tris base σε 800ml ddH<sub>2</sub>O

**2x Sample buffer**

2.3g SDS  
10ml 10% γλυκερόλη  
5ml beta-mercaptoethanol  
12,5ml 0,5M Tris pH 6.8  
Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>=100ml

**10x Running buffer**

30.3g Tris base  
144g Γλυκίνη  
10g SDS ή 100ml 10% SDS  
dH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>= 1L

**1x Transfer buffer**

3.03g Tris base  
28.8g Γλυκίνη  
200ml μεθανόλη  
1ml SDS 10%  
dH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>= 1L

**10x Tris-buffered saline (TBS)**

24.2g Tris base  
80g NaCl  
Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>= 1L  
Ρύθμιση pH στο 7.6 με HCl

**TBS-T**

50ml 10x TBS

Προσθήκη dH<sub>2</sub>O σε V<sub>final</sub>= 500ml

0.5ml (0.1%) Tween 20%

## 2.2 Θρεπτικά μέσα

**Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
με 10% Fetal Bovine Serum (FBS)**

10% Ορό FBS 50ml

10% 10x DMEM 50ml

1% Γλουταμίνη 5ml

1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη 5ml

2.8% Διττανθρακικό Νάτριο 7,5% 14ml

Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>= 500ml

Ρύθμιση του pH στο 6.9-7.2 με NaOH

**RMPI (Roswell Park Memorial Institute medium)  
με 5% FBS**

20% 5x RPMI (50 ml)

5% FBS (12,5 ml)

1% γλουταμίνη (2,5 ml)

1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη 5ml

2.8% Διττανθρακικό Νάτριο 7,5% 14ml

Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως V<sub>final</sub>= 500ml

Ρύθμιση του pH στο 6.9-7.2 με NaOH



### 2.3.1 Δοκιμασία του Bradford's για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε δείγμα

#### Υλικά:

- Bradford's reagent
- Βόειος ορός αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA) stock γνωστής συγκέντρωσης για τη παρασκευή της πρότυπης καμπύλης.
- ddH<sub>2</sub>O.
- Μικροπλάκα 96 φρεατίων.
- Φωτόμετρο για ELISA.

#### Διαδικασία:

1. Σε μια σειρά της μικροπλάκας προετοιμάζουμε τα δείγματα από τα οποία θα εξάγουμε την πρότυπη καμπύλη. Στο πρώτο φρεάτιο της σειράς προσθέτουμε 4 μl από την BSA γνωστής συγκέντρωσης σε 36 μl ddH<sub>2</sub>O αραιώνοντας το 1/10, ενώ στα υπόλοιπα φρεάτια προσθέτουμε 20 μl ddH<sub>2</sub>O και κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις αφήνοντας και ένα φρεάτιο χωρίς BSA το οποίο θα είναι και το αρνητικό control.
2. Στα υπόλοιπα φρεάτια της μικροπλάκας προσθέτουμε 2 μl από κάθε δείγμα προς εξέταση σε 18 μl ddH<sub>2</sub>O αραιώνοντας τα 1/10.
3. Στη συνέχεια προσθέτουμε 180 μl από το αντιδραστήριο Bradford σε κάθε δείγμα καθώς και στα δείγματα της πρότυπης καμπύλης ανακατεύοντας καλά.
4. Τέλος, επωάζουμε τη μικροπλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και μετράμε την απορρόφησή του στο φωτόμετρο στα 595 nm.

### 2.3.2 Ήπια λύση κυττάρων και παραγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

#### Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος.

- **Ομογενοποιητής.**

#### **Διαδικασία:**

1. Μαζεύουμε τα κύτταρα, τα φυγοκεντρούμε και παίρνουμε το ίζημα, το οποίο τοποθετούμε στον πάγο. Από εδώ και πέρα δουλεύουμε αποκλειστικά στον πάγο.
2. Παρασκευάζουμε όσο Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων χρειαζόμαστε και προσθέτουμε τις αναστολείς πρωτεασών και το PMSF.
3. Προσθέτουμε 0.7 ml ψυχρού ρυθμιστικό διάλυμα λύσης σε κάθε κυτταρικό ίζημα και το επαναδιαλυτοποιούμε.
4. Επιάζουμε τα κύτταρα στον πάγο για 10 λεπτά
5. Με τη χρήση υπερήχων κατακερματίζουμε τις πυρηνικές μεμβράνες. Οι ρυθμίσεις είναι 80 πλάτος κυμάτων και συνεχόμενος παλμός. 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα με κενό 15 δευτερολέπτων ανάμεσα τις.
6. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 5 λεπτά, τις 4 °C, τις 10.000 RPM.
7. Στο ίζημα έχουμε τις σπασμένες μεμβράνες, καθώς και DNA και RNA, ενώ στο υπερκείμενο έχουμε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.
8. Τέλος ελέγχουμε την ποσότητα σε πρωτεΐνη των δειγμάτων.

#### **2.3.3 Δοκιμασία νιτρικού οξειδίου με τη μέθοδο Griess**

#### **Υλικά:**

- **Αντιδραστήριο Griess**
- **Πρότυπη καμπύλη νιτρικού**
  - i. Διαλύουμε 13,8 mg  $\text{NaNO}_2$  σε 5 ml ddH<sub>2</sub>O (η συγκέντρωση του είναι 40 mM)
  - ii. Αραιώνουμε το παραπάνω 1:10 σε ddH<sub>2</sub>O
  - iii. Αραιώνουμε περαιτέρω 1:20 σε θρεπτικό μέσο (π.χ. DMEM) με τελική συγκέντρωση 200 Μμ και πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις 1:1 για να έχουμε μια πρότυπη καμπύλη των 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 μM καθώς και μία μόνο με θρεπτικό μέσο συγκέντρωση 0 μM.
- **Θρεπτικό μέσο (π.χ. DMEM, RPMI-10)**
- **Μικροπλάκα 96 φρεατίων**
- **Φωτόμετρο για ELISA**

#### **Διαδικασία:**

1. Καλλιεργούμε τουλάχιστον  $4 \times 10^4$  κύτταρα (π.χ. Μακροφάγα από το μυελό των οστών) σε DMEM σε μία μικροπλάκα 96 φρεατίων για 24 ώρες παρουσία ή απουσία κάποιας διεγερτικής ουσίας in dublo ή in triplo για κάθε συνθήκη (π.χ. LPS, IFN, IL-4).
2. Μεταφέρουμε 100 μl από το υπερκείμενο σε μια νέα μικροπλάκα.
3. Σε ένα ξεχωριστό σετ φρεατίων προετοιμάζουμε τα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη in dublo και αρνητικό control με θρεπτικό μέσο μόνο.
4. Προσθέτουμε 100 μl του αντιδραστηρίου Griess σε κάθε φρεάτιο με δείγμα και αναδεύουμε καλά πάνω-κάτω με την πιπέτα.
5. Μετράμε την απορρόφηση σε ένα φωτόμετρο για ELISA στα 540 nm.

### 2.3.4 Δοκιμασία δραστηριότητας αργινάσης

#### Υλικά:

- Triton X-100 διαλυμένο σε ddH<sub>2</sub>O
- Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7.5
- Χλωρίουχο Μαγγάνιο MnCl<sub>2</sub>
- 0.5 M Αργινίνη με pH 9.7
- Φωσφορικό οξύ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Θειικό οξύ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Διάλυμα ουρίας 2 mg/ml διαλυμένη σε ddH<sub>2</sub>O
- Ετοιμάζουμε ένα μείγμα οξέων H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και H<sub>2</sub>O σε αναλογία 1/3/7 και το αποθηκεύουμε στους 4 °C.
- 6% α-isonitropropiorphenone (α-ISPP) διαλυμένη σε 100% αιθανόλη και αποθηκεύεται στους 4 °C.
- 1x PBS

#### Διαδικασία:

1. Καλλιεργούμε  $4 \times 10^4$  κύτταρα ανά φρεάτιο σε μία μικροπλάκα 96 φρεατίων, με συνολικό όγκο ανά φρεάτιο 100 μl. Αφήνουμε τα κύτταρα να προσκολληθούν στο πάτο της μικροπλάκας.
2. Επώαζουμε τα κύτταρα παρουσία ιντερλευκίνης 4 (IL-4) για 24 ώρες ώστε επάγουμε τη δραστηριότητα της αργινάσης.

3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο από τα φρεάτιο, πλένουμε μια φορά τα κύτταρα με 200 μl PBS και το αφαιρούμε.
4. Παρασκευάζουμε ένα μείγμα από Tris-HCl με pH 7.5 και τελική συγκέντρωση 25 Mm, Triton X-100 με τελική συγκέντρωση 0,1%. Αυτό το αναμειγνύουμε με MnCl<sub>2</sub> και τελική συγκέντρωση 100 Mm. Από το παραπάνω μείγμα προσθέτουμε 30 μl σε κάθε φρεάτιο και αναδεύουμε τη μικροπλάκα για 15 λεπτά. Μετά την ανάδευση μπορούμε να σταματήσουμε τη διαδικασία και να αφήσουμε τη μικροπλάκα στους 4 °C.
5. Επωάζουμε τη μικροπλάκα στους 56 °C για 8 λεπτά, ώστε να ενεργοποιηθεί η αργινάση.
6. Προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο 20 μl αργινίνης 0,5 M και επωάζουμε στους 37 °C για 1 ώρα.
7. Ταυτόχρονα, ετοιμάζουμε τα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη σε ένα ξεχωριστό σετ φρεατίων. Από το stock της ουρίας 2 mg/ml τοποθετούμε 100 μl στο πρώτο φρεάτιο, ενώ στα άλλα 6 βάζουμε 50 μl ddH<sub>2</sub>O. Κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την συγκέντρωση 0.0625 mg/ml εκτός του τελευταίου φρεατίου το οποίο είναι και το αρνητικό control.
8. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 160 μl από το μείγμα των οξέων στα φρεάτια με τα δείγματα και 160 μl σε αυτά για την πρότυπη καμπύλη. Η διαδικασία μπορεί να σταματήσει σε αυτό το βήμα και τα δείγματα να μείνουν στους 4 °C για μέρες.
9. Σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 8 μl 6% α-ISPP διαλυμένο σε 100% αιθανόλη και αναδεύουμε ελαφρά
10. Καλύπτουμε τα φρεάτια με 50 μl κάποιου οπτικά ανενεργού λαδιού (π.χ. παραφίνη)
11. Επωάζουμε για μισή ώρα στους 95 °C και μισή ώρα στους 4 °C.
12. Τέλος, μετράμε την απορρόφηση στο φωτόμετρο για ELISA στα 540 nm.

### 2.3.5 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε SDS-page πήκτωμα

#### **Ηλεκτροφόρηση**

Ηλεκτροφόρηση είναι η μετακίνηση ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό φορτίο κάθε μορίου εξαρτάται από το ισοηλεκτρικό σημείο και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται. Έτσι, ανάλογα με το φορτίο, το μέγεθος και το διάγραμμα των πρωτεϊνών, όταν αυτές βρίσκονται σε ηλεκτρικό πεδίο διαχωρίζονται. Η μετανάστευση των φορτισμένων μορίων μπορεί να

γίνει είτε μέσα σε κάποιο διάλυμα είτε με τη χρησιμοποίηση ενός μέσου υποστήριξης όπως είναι το χαρτί, η οξική κυτταρίνη ή το πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου είναι χημικά αδρανές και εύκολα παρασκευάσιμο. Η διάμετρος των πόρων του πλέγματος μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τις απαιτούμενες συνθήκες διαχωρισμού. Τα πηκτώματα σχηματίζονται με βινυλικό πολυμερισμό της μονομερούς ακρυλαμίδης ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) σε επιμήκης αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου. Οι τελευταίες συμπολυμερίζονται με το μονομερές N-N-μέθυλο-δις-ακρυλαμίδη ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Οι ρίζες για την έναρξη του πολυμερισμού πρόερχονται από το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) και ο καταλύτης της αντίδρασης είναι η N,N,N',N'-τετραμεθυλοδιαμίνη (TEMED).

#### Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli
- Ρυθμιστικό διάλυμα Running
- Γέλη διαχωρισμού συγκέντρωσης 10%
- Stacking Gel 4%
- Μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker)

Οι ποσότητες είναι μετρημένες σε ml	H <sub>2</sub> O	Δια/μα ακρυλαμιδίου 30%	Buffer	SDS	APS 10%	TEMED
Stacking 4%	2978	667	1250 0.5 M Tris pH 6.8	50	50	5
Γέλη διαχωρισμού 10%	4407	3667	2750 1.5 M Tris pH 8.8	110	6	60

Χρειάζονται περίπου 3 ml για τη γέλη διαχωρισμού και 1,5 ml για το stacking.

## Προετοιμασία SDS-Page

1. Αρχικά παρασκευάζουμε τη γέλη διαχωρισμού. Μίξη των άνωθεν αντιδραστηρίων με τις κατάλληλες αναλογίες σε πλαστικό σωλήνα και ήπια ανάδευση προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων.
2. Τοποθέτηση της γέλης διαζωρισμού σε έτοιμες ειδικές γυάλινες πλάκες, σε κάθετη θέση με άνοιγμα είτε 1 mm είτε 0,75 mm στα περίπου  $\frac{3}{4}$  του συνολικού όγκου. Γέμισμα μέχρι την κορυφή με H<sub>2</sub>O ή αλκοόλη ή ισοπροπανόλη για να αποφευχθεί η οξείδωση της γέλης. Την αφήνουμε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.
3. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού και πήξης της γέλης διαχωρισμού, αφαιρούμε το οποιοδήποτε υγρό χρησιμοποιήσαμε για να άποφευχθεί η οξείδωση της γέλης στο βήμα 2 και ξεπλένουμε καλά την επιφάνεια πάνω από τη γέλη διαχωρισμού.
4. Παρασκευάζουμε το stacking gel με τις αναλογίες που υπάρχουν στον πίνακα σε ένα πλαστικό σωλήνα και το ανακινούμε ελαφρώς. Έπειτα το τοποθετούμε πάνω από το separating gel και αμέσως τοποθετούμε οδοντωτή χτένα ώστε να μην πολυμεριστεί σε συγκεκριμένα σημεία το stacking gel και να δημιουργηθούν τα φρεάτια για να φορτώσουμε τα δείγματά μας. Αφήνουμε ξανά για 20 λεπτά περίπου να πολυμεριστεί το stacking gel σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσαρμογή των πλακών στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος running στο δοχείο που έχουμε τοποθετήσει την συσκευή μέχρι η στάθμη του να ξεπεράσει το ύψος του ηλεκτροδίου.
6. Αφαίρεση της οδοντωτής χτένας με προσοχή ώστε να μην επηρεαστεί η ποιότητα των φρεατίων που έχουν σχηματιστεί. Στη συνέχεια με μια σύρριγα του 1 ml καθαρίζουμε τα φρεάτια από τυχόν υπολοίματα ακρυλαμιδίου που μπορεί να έτυχε να πολυμεριστεί.
7. Τέλος, προσθέτουμε τα δείγματα στα εκάστοτε φρεάτια μαζί με έναν protein marker και η συσκευή είναι έτοιμη να λειτουργήσει. Η τάση του ρεύματος (Volt) που χρησιμοποιούμε είναι του εύρους από 80 V μέχρι το πολύ 120 V, με χαμηλότερες διαφορές δυναμικού να σημαίνουν πως τα δείγματα θα διαχωριστούν πιο αργά αλλά η ποιότητά των πρωτεϊνών θα είναι η βέλτιστη δυνατή. Στον αντίποδα, υψηλότερες διαφορές δυναμικού έχουν σαν αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών να είναι τάχιστος με το κόστος να είναι ότι η υψηλή θερμότητα, που παράγεται λόγω του νόμου του Joule, θέτει σε κίνδυνο την ποιότητα των πρωτεϊνών που διαχωρίζουμε.

## **Προετοιμασία δειγμάτων που θα διαχωρίσουμε.**

1. Δημιουργία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων είτε με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω είτε με την ανάμειξη των δειγμάτων με Laemli Buffer (sample buffer).
2. Μέτρηση ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με κάποια μέθοδο ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 95°C για 3 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη πρωτεϊνών.
4. Φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα του ακρυλαμιδίου.

### **2.3.6 Ανοσοστύπωμα κατά Western**

Ο Towbin και συνεργάτες το 1979 περιέγραψαν μια μέθοδο μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα ακρυλαμίδης με SDS-PAGE σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος (Towbin, Staehelin et al. 1979). Από τότε η μέθοδος αυτή έχει βελτιωθεί και στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιούμε μια βελτιωμένη έκδοσή της.

#### **Υλικά:**

- 6 κομμάτια χαρτί 3M μεγέθους 5,5cm x 8,5cm για κάθε μεμβράνη
- 2 σφουγγαράκια
- 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 5,5cm x 8,5cm
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
- 1 apparatus
- 1x TBS-T
- 4% γάλα ή BSA σε TBS-T
- ECL Plus Western Blotting Detection Reagent

#### **Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με wet transfer.**

1. Σε ένα δοχείο προσθέτουμε επαρκής ποσότητα 1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
2. Τοποθετούμε το apparatus μέσα στο δοχείο με τη λευκή πλευρά κάτω.

3. Βρέχουμε 1 σφουγγαράκι, 3 χαρτιά 3M και 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και τα τοποθετούμε στο apparatus με αυτή τη σειρά.
4. Από πάνω τοποθετούμε το SDS-PAGE χωρίς το stacking gel.
5. Βρέχω άλλα 3 χαρτιά 3M και άλλο 1 σφουγγαράκι και τα τοποθετώ με την ίδια σειρά πάνω από το SDS-PAGE.
6. Αφαιρώ τις φυσαλίδες που μπορεί να υπάρχουν, κλείνω το apparatus και το τοποθετώ με τέτοιο τρόπο ώστε η μαύρη του πλευρά να συμπιπτει με τη μαύρη πλευρά του δοχείου.
7. Μαζί με το apparatus, στο δοχείου βάζουμε επίσης ένα μαγνήτη για να αναδύεται το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς καθόλη τη διάρκεια της μεταφοράς καθώς και πάγο λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται για να προστατευτούν οι πρωτεΐνες.
8. Συμπληρώνουμε μέχρι την κορυφή του δοχείου με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και βάζουμε το μηχάνημα να λειτουργεί στα 300 mA για συνήθως το λιγότερο 90 λεπτά.

### **Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.**

Μετά των διαχωρισμό των πρωτεϊνών στο πήκτωμα του ακρυλαμιδίου μπορούμε, με τη χρήση εξειδικευμένων αντισώματων, να χαρακτηριστούν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν ή όχι στο κάθε δείγμα που έχουμε φορτώσει.

1. Προετοιμάζουμε τη μεμβράνη κάνοντας 2 πλύσεις με TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία
2. Έπειτα χρησιμοποιούμε κάποιο διάλυμα παρεμπόδισης για 30 με 60 λεπτά ή μπορούμε να σταματήσουμε τη διαδικασία σε αυτό το βήμα και να το αφήσουμε όλο το βράδυ. Το βήμα με την παρεμπόδιση είναι απαραίτητο ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις στη μεμβράνη και να μην έχουμε μη ειδική προσδεση των αντισωμάτων. Το διάλυμα παρεμπόδισης μπορεί να είναι 4% γάλα ή BSA διαλυμένο σε TBS-T. Το γάλα είναι πιο διαδεδομένο και φτηνό αλλά δεν συνίσταται η χρήση του όταν θέλουν να μελετηθούν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες καθώς περιέχει φωσφατάσες ενώ το BSA είναι υψηλότερης καθαρότητας από το γάλα αλλά πιο ακριβό.
3. Μετά την επώαση αλλάζουμε το διάλυμα παρεμπόδισης με το πρωτεύων αντίσωμα που θα χρησιμοποιήσουμε (διαλυμένο με ότι αντιδραστήριο χρησιμοποιήσαμε για τη παρεμπόδιση προτιμώτερα). Η επώαση με το πρωτεύων αντίσωμα γίνεται σε



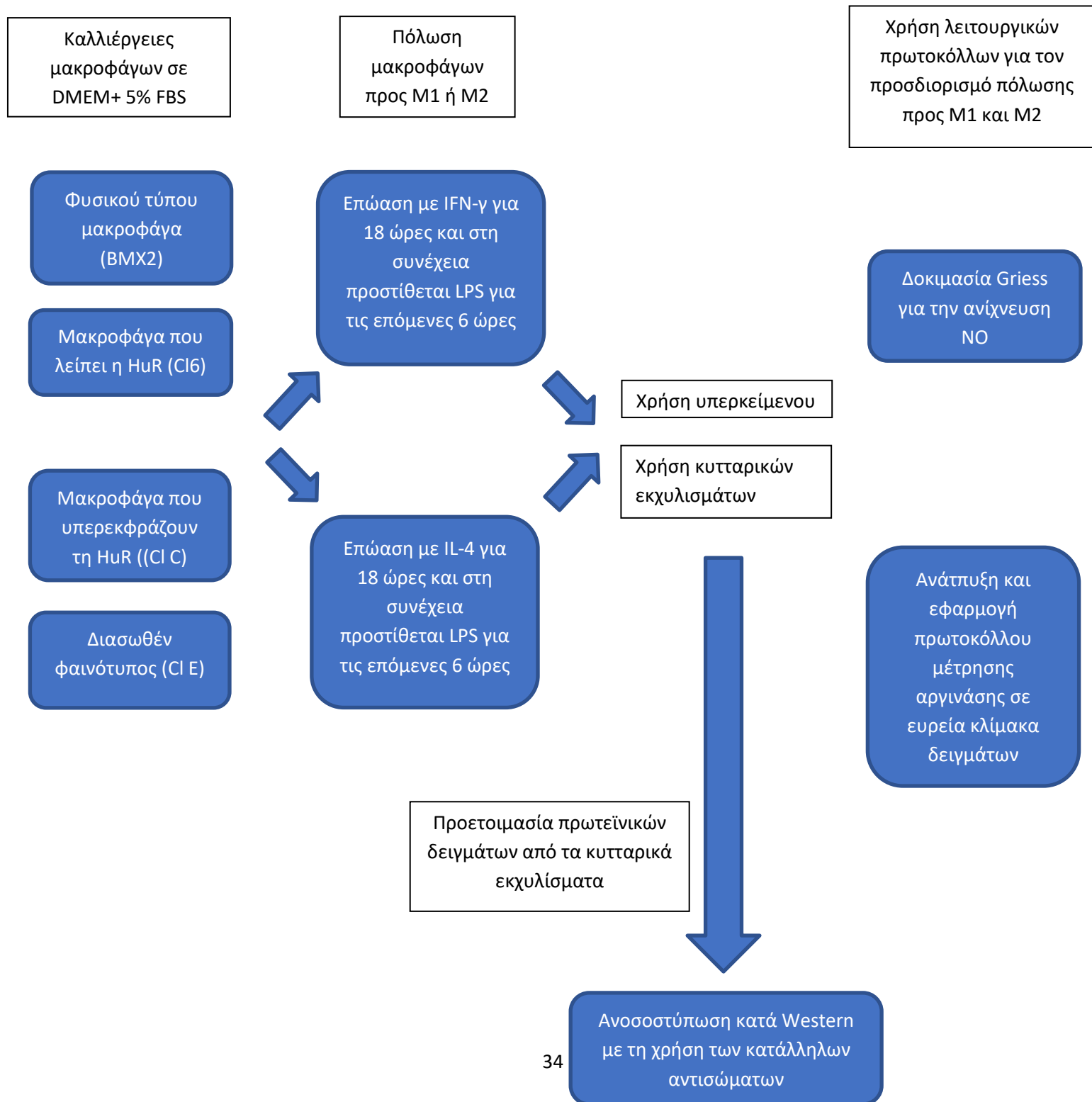
θερμοκρασία 4°C αν την αφήσουμε όλο το βράδυ ή σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες με συνεχής ανάδευση.

4. Αφού τελειώσει η επώαση με το πρωτεύων αντίσωμα, πραγματοποιούμε άλλες 2 πλύσεις με TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία και επωάζουμε την μεμβράνη με το κατάλληλο δευτερεύων αντίσωμα για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ενώ αναδεύεται. Στη συνέχεια, άλλες 2 πλύσεις με TBS-T.
5. Ενώ είμαστε στις τελευταίες πλύσεις με TBS-T, ετοιμάζουμε το υπόστρωμα της HRP που είναι συνδεδεμένη με το δευτερεύων αντίσωμα, το ECL. Αυτό αποτελείται από ίσους όγκους 1:1 από τα αντιδραστήρια 1 και 2 που μας προμηθεύει η εταιρεία.
6. Με το πέρας των πλύσεων απλώνουμε αρκετή ποσότητα ECL ώστε να καλυφθεί όλη η μεμβράνη και εμφανίζουμε στο ειδικό scanner.

# 3.Αποτελέσματα

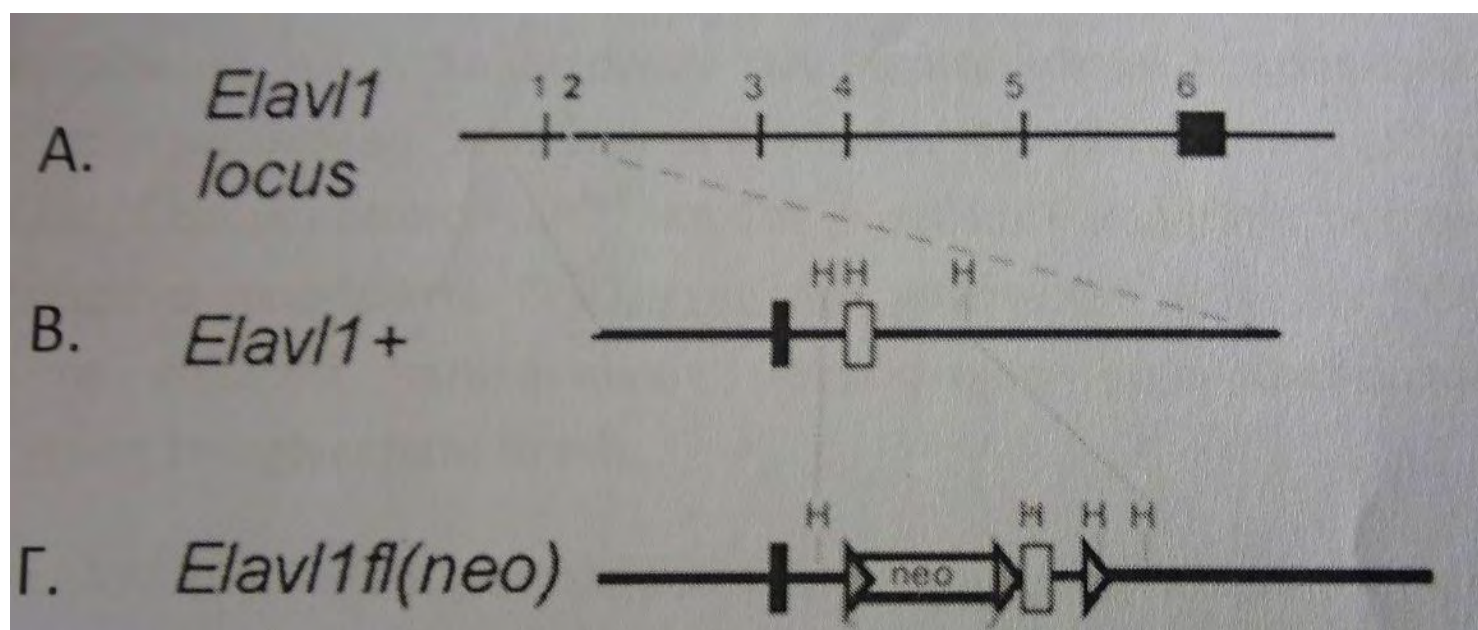
## 3.1 Διάγραμμα ροής εργασίας

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω, η πορεία των πρωτοκόλλων παρουσιάζεται σχηματικά ως εξής:



### 3.2 Διαγονιδιακά συστήματα

Τα BMX2 είναι μια αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά μακροφάγων που πρόερχεται από BMDMs που δημιουργήθηκε για να μοιράζονται όσο το δυνατόν περισσότερα χαρακτηριστικά με αυτά και να υποκαθιστούν σε μελέτες που απαιτούν μεγάλο αριθμό κυττάρων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική ως μακροφάγα φυσικού τύπου. Στο γονιδίωμα τους, το εξόνιο 2 του γονιδίου *Elavl-1* που κωδικοποιεί την HuR βρίσκεται ανάμεσα σε 2 LoxP τοποθεσίες μαζί με το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης II (neomycin phosphotransferase II, NPTII), το οποίο προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό νεομυκίνη. Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει μετά την έκφραση της Cre ρεκομπινάσης στα κύτταρα αυτά, να απενεργοποιηθεί το γονίδιο *Elavl-1*, ώστε να μπορέσουμε να μελετήσουμε τις επιδράσεις της αποσιώπησης της HuR στους μηχανισμούς πώλωσης των μακροφάγων.



Εικόνα 5 Γονιδιακή στόχευση του γονιδίου *Elavl-1*

- A. Η περιοχή του γονιδίου *Elavl-1* στο χρωμόσωμα 8 του ποντικού
- B. Αναλυτικότερη περιγραφή της περιοχής του *Elavl-1* που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του τεχνητού αλληλίου
- Γ. Η προβλεπόμενη περιοχή μετά τον ανασυνδυασμό για τη δημιουργία *Elavl-1*<sup>fl(neo)</sup>. Με άσπρο απεικονίζεται το εξόνιο 2 που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης AUG καθώς και την αλληλουχία του πρώτου μοτίβου αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif, RPM). Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις LoxP.

Yiakouvakı A et al, Myeloid cell expression of the RNA-binding protein HuR protects mice from pathologic inflammation and colorectal carcinogenesis. *J Clin Invest.* 122(1):48-61 (2012)

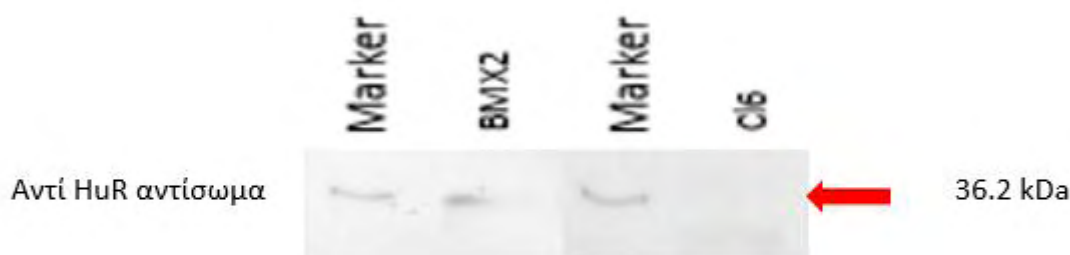
Η αθανатоποίηση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Dr Danuta Radzioch, McGill University health center, Montreal, Canada. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση απομονωμένων κυττάρων από το μυελό των οστών ποντικίου με γονότυπο  $Elavl-1^{fl(neo)/fl(neo)}$  με ανασυνδυασμένο ρετροϊό που έφερε τα ογκογονίδια *v-raf* και *v-myc*. Από την διαδικασία απομονώθηκαν τρεις κλώνοι, από τους οποίους ο δεύτερος (BMX2) κρίθηκε πιο σταθερός και μακροσκοπικά παρουσιάζει μεγαλύτερες ομοιότητες με τα μακροφάγα.

Για τη δημιουργία κυττάρων που δεν εκφράζουν τη HuR, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με το γονότυπο  $Elavl-1^{fl/fl}$  τα οποία διασταυρώθηκαν με ποντίκια που είχαν στο γονιδίωμά τους το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της λυσοζύμης (LysCre). Η λυσοζύμη είναι ένα γονίδιο που εκφράζεται ιδιόσυστατα στα μακροφάγα. Έτσι, στα μακροφάγα είχαμε έκφραση της Cre ρεκομπινάσης λόγω του υποκινητή της. Η έκφραση αυτή είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή του ενζύμου της Cre ρεκομπινάσης, η οποία έδρασε στα σημεία lox P εκατέρωθεν του δεύτερου εξωνίου της HuR, αφαιρώντας το και σταματώντας την παραγωγή της HuR στα μακροφάγα κύτταρα των ποντικών αυτών. Από τα ποντίκια αυτά απομονώθηκαν κύτταρα από το μυελό των οστών όπου και αθανатоποιήθηκαν όπως τα BMX2. Αυτή η κυτταρική σειρά ονομάστηκε Clone 6 (Cl 6).

### 3.3 Επιβεβαίωση των επιπέδων έκφρασης της HuR σε BMX2 και Cl6

Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι δύο παραπάνω κυτταρικές σειρές παράγουν ή όχι τη HuR, πραγματοποιήσαμε ανοσοσύτρωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HuR

A.



B.



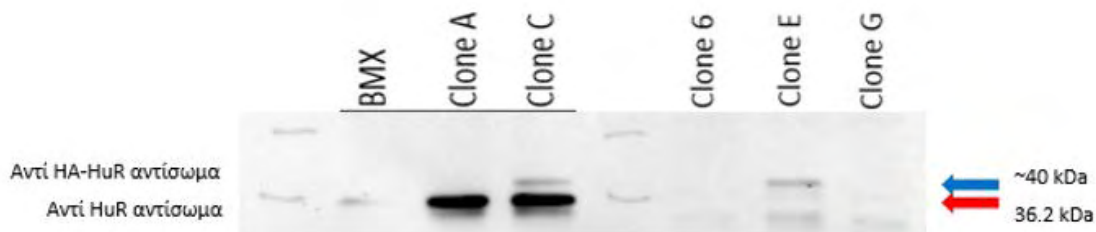
Εικόνα 6. Έκφραση της HuR σε BMX2 και Cl6. Στην μεμβράνη A έχουμε το Western blot αντίσωμα έναντι της HuR όπου και βλέπουμε παρουσία της στα κύτταρα BMX2. Αντίθετα στον Cl6 δεν παρατηρείται κάποιο σήμα στο κατάλληλο μοριακό βάρος υποδεικνύοντας την απουσία έκφρασης της HuR στα συγκεκριμένα κύτταρα. Το μοριακό βάρος της HuR είναι 36,2 kDa και στην μεμβράνη B έχουμε την χρώση με Ponceau που χρησιμοποιείται ως μέτρο ποσοτικοποίησης

Στην εικόνα 6.A βλέπουμε πρώτα τα κύτταρα φυσικού τύπου (BMX2) να εκφράζουν τη HuR καθώς παρατηρείται σήμα στο κατάλληλο μοριακό βάρος. Στη συνέχεια έχουμε κύτταρα που υπολείπονται της HuR (Cl6) στα οποία δεν υπάρχει κάποιο σήμα, επιβεβαιώνοντας την έλλειψη έκφρασης της πρωτεΐνης στην κυτταρική σειρά αυτή. Στην 6.B έχουμε και τη χρώση της μεμβράνης με Ponceau για σχετική ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

### 3.4 Δημιουργία μακροφάγων που υπερεκφράζουν τη HuR και μακροφάγων KO που επανεκφράζουν τη HuR

Έχοντας στην κατοχή μας μακροφάγα αγρίου τύπου και HuR-KO, πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Με τον τρόπο αυτό καταφέραμε να εισάγουμε και σε φυσιολογικά μακροφάγα και σε HuR-KO το πλασμίδιο το οποίο είχε το γονίδιο της HuR και στο τέλος της το tag της HA. Έτσι τα διαμολυσμένα φυσιολογικά μακροφάγα παράγουν την ενδογενή και την εισαγωμένη HuR, έχοντας σαν αποτέλεσμα έναν κυτταρικό κλώνο που υπερπαράγει την HuR. Αντίθετα τα μακροφάγα του Cl6 λόγω της απουσίας ενδογενούς έκφρασης της HuR, εκφράζουν μόνο την HA-HuR που εισάγαμε δημιουργώντας μια κυτταρική σειρά που επανανεκφράζει σε ένα ποσοστό την HuR, έναν διασωθέντα φαινότυπο (rescued phenotype). Για να διαπιστωθεί η επιτυχία της μεταμόλυνσης των BMX2 και Clone 6 κυττάρων με το πλασμίδιο που περιείχε το γονίδιο HuR-HA tag, πραγματοποιήθηκε Western Blot με αντίσωμα έναντι της χιμαιρικής πρωτεΐνης HuR-HA tag.

A.



B.



Εικόνα 7 A. Με το κόκκινο βέλος βλέπουμε την έκφραση της ενδογενούς HuR στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των 36.2 kDa και με το μπλε βέλος έχουμε την έκφραση της εισαγόμενης HuR στα ~40 kDa. Βλέπουμε έκφραση της ενδογενούς μόνο στα BMX2 στον Cl A ενώ για τον Cl C έχει έκφραση και της HA-HuR. Ο Cl6 αναμενόμενα δεν έχει εκφράζει καμία από τις 2 HuR όπως και ο Cl G που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Τέλος ο Cl E εκφράζει μόνο την HA-HuR όπως περιμέναμε.

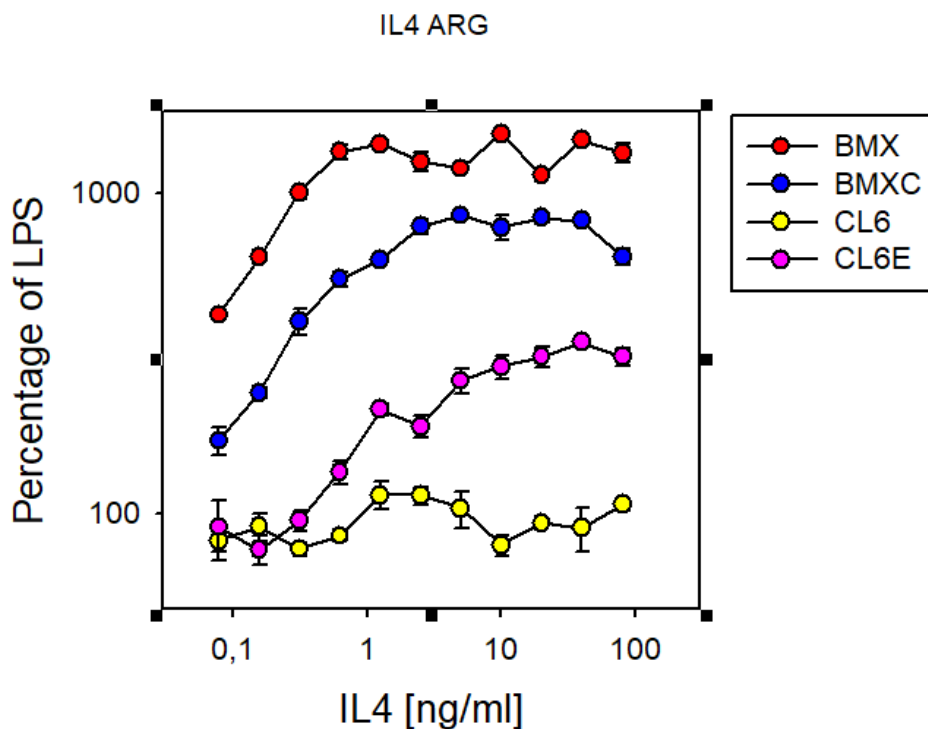
B. Φωτογραφία της παραπάνω μεμβράνης μετά από χρώση με Ponceau red για την ποσοτικοποίηση των 6 δειγμάτων ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη παρεμφερούς συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε όλες τις διαδρομές.

Στην εικόνα 7 έχουμε τα αποτελέσματα της ανοσοσύτωσης με το αντίσωμα της HA-HuR. Στην πρώτη διαδρομή είναι τα φυσιολογικά μακροφάγα που δεν υπέστησαν κάποια τροποποίηση και δεν πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή κάποιου πλασμιδίου. Εντοπίζεται έστω και αχνά ένα μοναδικό σήμα της ενδογενούς HuR χωρίς την παρουσία σήματος της HuR-HA tag. Στη δεύτερη και τρίτη στήλη έχουμε φυσιολογικά μακροφάγα στα οποία έχει εισαχθεί το πλασμίδιο που περιέχει το HuR-HA tag γονίδιο με τη διαφορά ότι στον Clone A δεν παρατηρείται κάποια ανιχνεύσιμη έκφραση της HuR-HA ενώ στον Clone C έχουμε σήμα πάνω από την ενδογενή HuR υποδεικνύοντας την έκφραση της HuR-HA. Στην τέταρτη διαδρομή βρίσκονται κύτταρα του Clone 6 τα οποία δεν έχουν υποστεί κάποια προσθήκη πλασμιδίου με το HuR-HA. Για τον λόγο αυτό δεν ανιχνεύουμε κάποιο σήμα στο μοριακό βάρος που εμφανίζεται η HuR-HA στους άλλους κλώνους που την εκφράζουν και καμία έκφραση της ενδογενούς HuR όπως ήταν αναμενόμενο. Στην πέμπτη θέση έχουμε κύτταρα του Clone 6 τα οποία μεταμολύνθηκαν με πλασμίδια που είχαν το γονίδιο HuR-HA tag και το εκφράζουν όπως φαίνεται από το σήμα που πήραμε ενώ ταυτόχρονα έχουμε σχεδόν μηδενικό σήμα από την ενδογενή HuR. Τέλος, είναι κύτταρα Clone 6 στα οποία έχει εισαχθεί μόνο ένα πλασμίδιο με το γονίδιο της GFP και για αυτό δεν έχουμε κάποιο σήμα ενδογενούς HuR ή HuR-HA.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέξαμε τις κυτταρικές σειρές Cl C και Cl E στα πειράματα που ακολουθήσαν ως σύστημα υπερέκφρασης της HuR και διάσωσης του φαινοτύπου αντίστοιχα.

### 3.5 Μακροφάγα που υπερεκφράζουν τη HuR και μακροφάγα του διασωθέν φαινότυπου δεν είναι ικανά να πολωθούν προς τη κατάσταση M2 στον ίδιο βαθμό με τα φυσικά τύπου μακροφάγα

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία οι επιδράσεις που έχουν η IFN και η IL-4 στα μακροφάγα και πιο συγκεκριμένα στην πόλωσή τους. Δεν είναι όμως απολύτως ξεκάθαρο ποιες είναι οι ελάχιστες συγκεντρώσεις που χρειάζονται για να παρατηρηθούν φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα, καθώς επίσης και πως συμπεριφέρονται τα μακροφάγα καθώς αυξάνουμε την συγκέντρωση αυτών των αγωνιστών. Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκαν δοκιμασίες χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές σειρές: BMX2, Clone C, Clone 6 και Clone E. Κάθε μία από αυτές καλλιεργήθηκε σε μικροπλάκα 96 φρεατίων και επωάστηκαν με IFN και IL-4 με ή χωρίς LPS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ξεκινώντας από τα 80 ng/ml και με διαδοχικές αραιώσεις φτάνουμε στην χαμηλότερη τιμή ίση με 0,0781 ng/ml καθώς και μία συγκέντρωση των IFN και IL-4 ίση με 0 σαν control. Στη συνέχεια το υπερκείμενο κάθε πιάτου χρησιμοποιήθηκε για δοκιμάσια ανίχνευσης NO με τη μέθοδο Griess και τα κύτταρα που έμειναν προσκωλλημένα στο πάτο των φρεατίων χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ουρίας με το τροποποιημένο πρωτόκολλο αργινάσης 1 των Classen, Lloberas και Celada για ευρεία ανάλυση δειγμάτων.



Εικόνα 8. Μέτρηση συγκέντρωση της ουρίας, η οποία κανονικοποιήθηκε σε σύγκριση με το δείγμα στο οποίο δεν προστέθηκε IL-4 αλλά μόνο LPS. Οι μετρήσεις έγιναν από κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί σε ένα εύρος συγκεντρώσεων IL-4: 0, 0.0781, 0.12625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 και 80 ng/ml για διάστημα 24 ωρών.

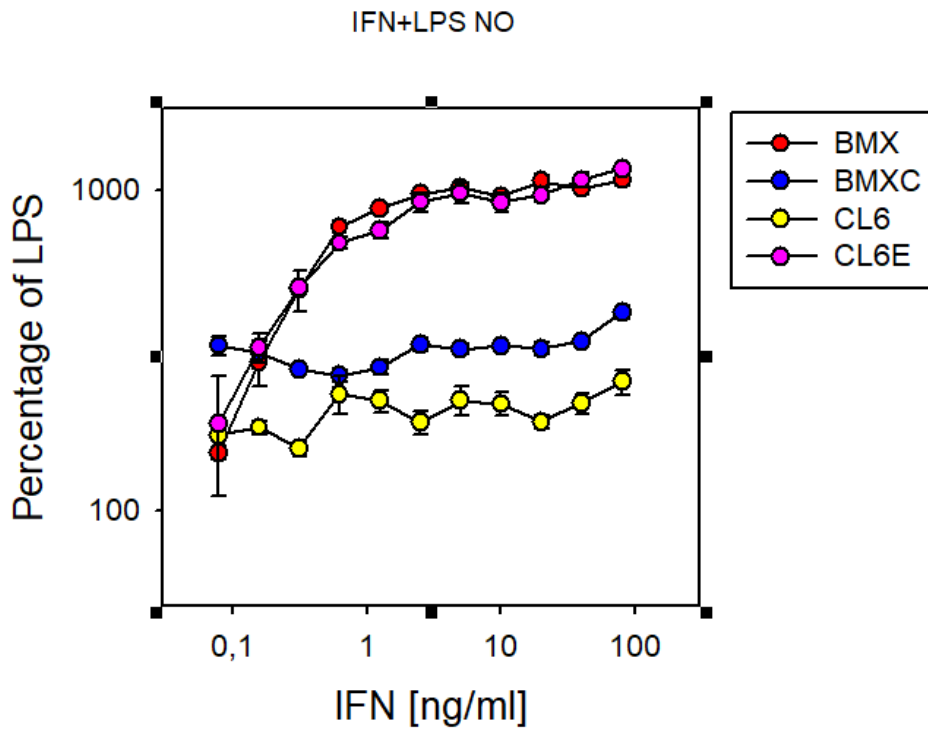


Βλέπουμε στην εικόνα 8 πως παρουσία IL-4 τα BMX2 αποκρίνονται με μια καμπύλη δόσης-απόκρισης. Για συγκεντρώσεις από 0-0.3125 ng/ml IL-4 παρατηρούμε πως αύξηση ισούται και αύξηση στην ποσότητα της ουρίας που παράγεται. Έπειτα στις συγκεντρώσεις 0.625-20 ng/ml η παραγωγή της ουρίας είναι σχετικά σταθερή και δεν αυξάνεται και τέλος στις συγκεντρώσεις 40 και 80 ng/ml βλέπουμε πως πέφτει η συγκέντρωση της παραγόμενης ουρίας. Οι υπόλοιπες τρεις κυτταρικές σειρές δεν φαίνεται να έχουν κάποια απόκριση σε καμία συγκέντρωση IL-4.

Τα BMX C και ο Cl6 E παρατηρείται πως αποκρίνονται με μια παρόμοια καμπύλη δόσης-απόκρισης σε μικρότερο βαθμό από τα μακροφάγα που υπερεκφράζουν τη HuR και ακόμα μικρότερο ο διασωθέν φαινότυπος καθώς επίσης φτάνουν πλατό στην παραγόμενη ουρία όταν η συγκέντρωση της IL-4 είναι 5 ng/ml.

Ο Cl6 φαίνεται να παράγει μια μικρή ποσότητα ουρίας ως αποτέλεσμα της επώασης με την IL-4. Αντίθετα από τις άλλες κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, η απόκριση αυτή δεν επηρεάζεται από καμία συγκέντρωση IL-4 που χρησιμοποιήθηκε και παρέμεινε σταθερή.

### 3.6 Μακροφάγα με διασωθέν φαινότυπο μπορούν να πολωθούν στον ίδιο βαθμό με μακροφάγα φυσικού τύπου ενώ υπερέκφραση της HuR αδυνατεί να έχει παρόμοιο αποτέλεσμα



Εικόνα 9. Μέτρηση συγκέντρωσης εκκρινόμενου NO, η οποία κανονικοποιήθηκε σε σύγκριση με το δείγμα στο οποίο δεν προστέθηκε IFN- $\gamma$  αλλά μόνο LPS. Οι μετρήσεις έγιναν από κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί σε ένα εύρος συγκεντρώσεων IFN- $\gamma$ : 0, 0.0781, 0.12625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 και 80 ng/ml για διάστημα 24 ωρών και σε LPS 100 ng/ml για 16 ώρες.

Φαίνεται στην εικόνα 9 ότι παρουσία IFN- $\gamma$ +LPS, τα BMX2 και CL6 E εκκρίνουν μεγάλες συγκεντρώσεις NO όπου όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  αυξάνεται και η συγκέντρωση του NO εκθετικά μέχρι τα 2.5 ng/ml IFN- $\gamma$  όπου σταθεροποιείται η έκκριση NO. Έπειτα η συγκέντρωση του NO σταθεροποιείται και δεν αυξάνεται με τη συνεπακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης της IFN- $\gamma$ . Στους CL6 και BMXC υπάρχει μια απόκριση η οποία είναι αρκετά χαμηλότερη σε σύγκριση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές. Επιπροσθετως, η συγκέντρωση του NO, σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους, παραμένει σταθερή και είναι ανεξάρτητη από οποιαδήποτε συγκέντρωση της IFN- $\gamma$ .

### 3.7 Σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν τη μεταβολική κατάσταση των μακροφάγων επηρεάζονται εντονότερα κατά την πόλωση προς τη κατάσταση M2

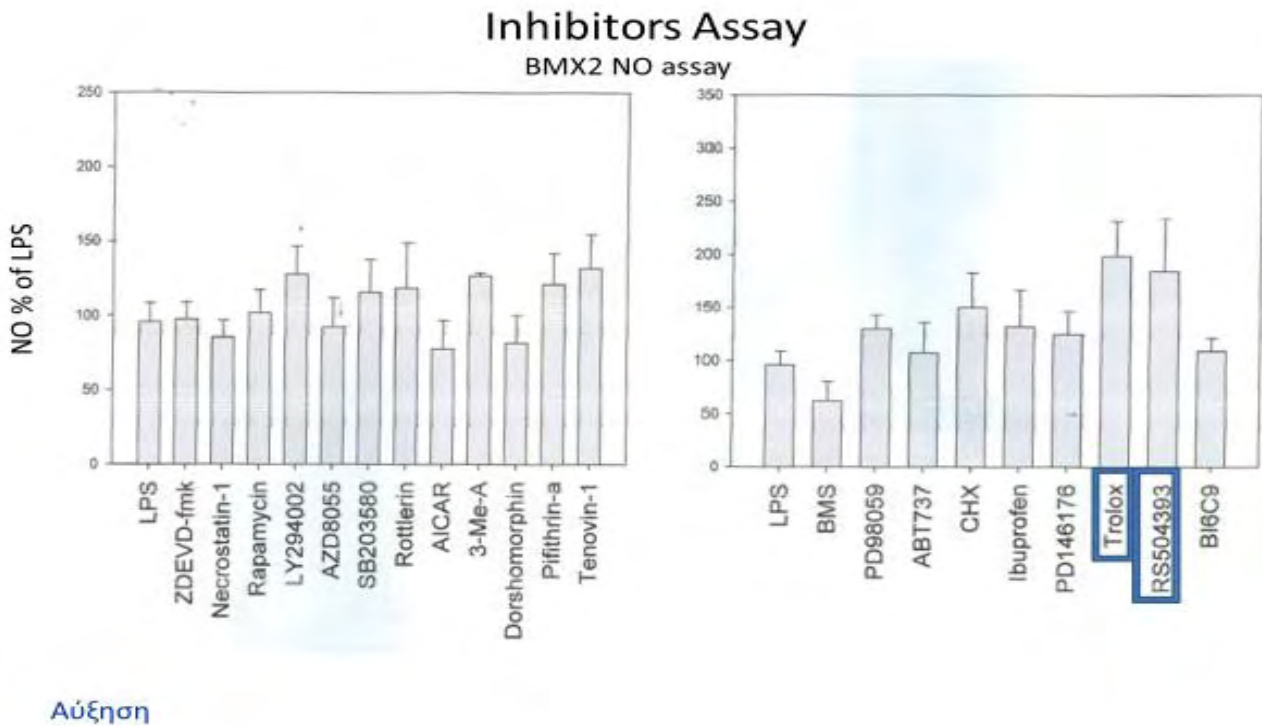
Θέλοντας να μελετηθούν ποια σηματοδοτικά μονοπάτια, που μπορούν να επηρεάσουν την πόλωση προς M1 ή M2, επηρεάζονται από την απουσία της HuR, καλλιεργήθηκαν κύτταρα BMX2 και Clone 6 σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Έπειτα προστέθηκε ένα εύρος αναστολέων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια χωρίς ή με LPS έχοντας συνολικά τέσσερα πιάτα, δύο BMX2 χωρίς ή με LPS και δύο Clone 6 χωρίς ή με LPS. Αυτή είναι η λίστα με όλους τους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν:

Αναστολέας	Πρωτεΐνη στόχος
ZDEVD-fmk	Caspase-3
Necrostatin-1	RIPK1
Rapamycin	mTORC1
LY294002	PI3-K
AZD8055	mTORC1/2
SB203580	p38 MAPK
Rottlerin	PKCδ

AICAR	AMPK
3-Me-A	PI3K
Dorshomorphin	AMPK
Piffithrin-a	p53
Tenovir-1	p53
BMS	IKK
PD98059	MEK1,2
ABT737	BCL-2
CHX	Ριβόσωμα
Trolox	
RS504393	CCR2
BI6C9	Bid

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της HuR στην πόλωση προς M1, χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο και των τεσσάρων πιάτων για την δοκιμασία ανίχνευσης νιτρικού οξειδίου με τη μέθοδο Griess. Από τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί στον πάτο των πιάτων, τα δύο πιάτα με αναστολείς και LPS χρησιμοποιήθηκαν για την δοκιμασία ανίχνευσης της αργινάσης με το τροποποιημένο πρωτόκολλο που έχει αναφερθεί πιο πριν. Τα εναπομείναντα δύο πιάτα με αναστολείς και

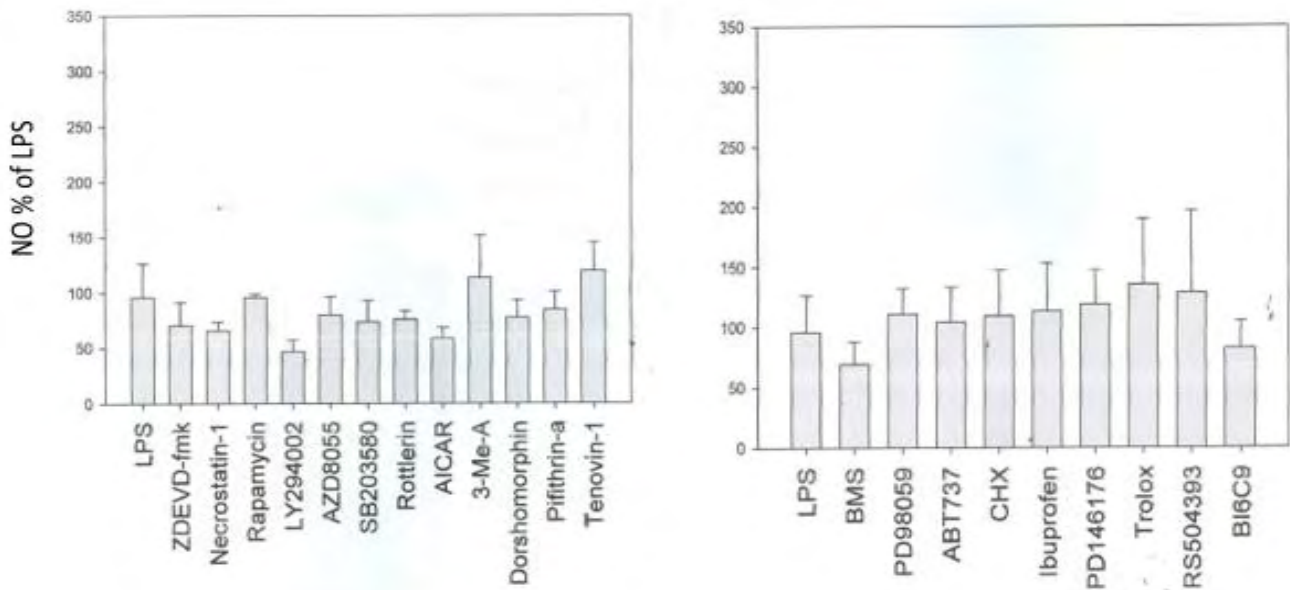
χωρίς LPS χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμασία με χρώση crystal violet προκειμένου να διαπιστώσουμε τον κυτταρικό θάνατο, καθώς πολύ από τους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να έχουν τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα σκοτώνοντας τα και έτσι να έχουμε μειωμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου ή ουρίας η οποία θα ανταποκρίνεται σε χαμηλό αριθμό κυττάρων και όχι σε μειωμένη πόλωση των κυττάρων παρουσία των αναστολέων. Έτσι έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα παραγωγής NO ή αργινάσης ως ποσοστό του LPS, όπου 100% θεωρείται η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων παρουσία μόνο LPS και όχι κάποιου αναστολέα. Τέλος, να σημειωθεί ότι στα παρακάτω γραφήματα έχει υπολογιστεί το ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων λόγω τοξικότητας κάποιων αναστολέων, μετά τη χρώση με crystal violet.



Εικόνα 10. Αντίδραση των BMX2 στη πόλωση προς M1 μετά από επώαση με 10 ng/ml IFN- $\gamma$  + 100 ng/ml LPS. Το παραγώμενο NO που ανιχνεύθηκε κανονικοποιήθηκε ως ποσοστό επί την μέτρηση του δείγματος που επώαστηκε μόνο με LPS και λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας.

## Inhibitors Assay

### Cl6 NO Assay

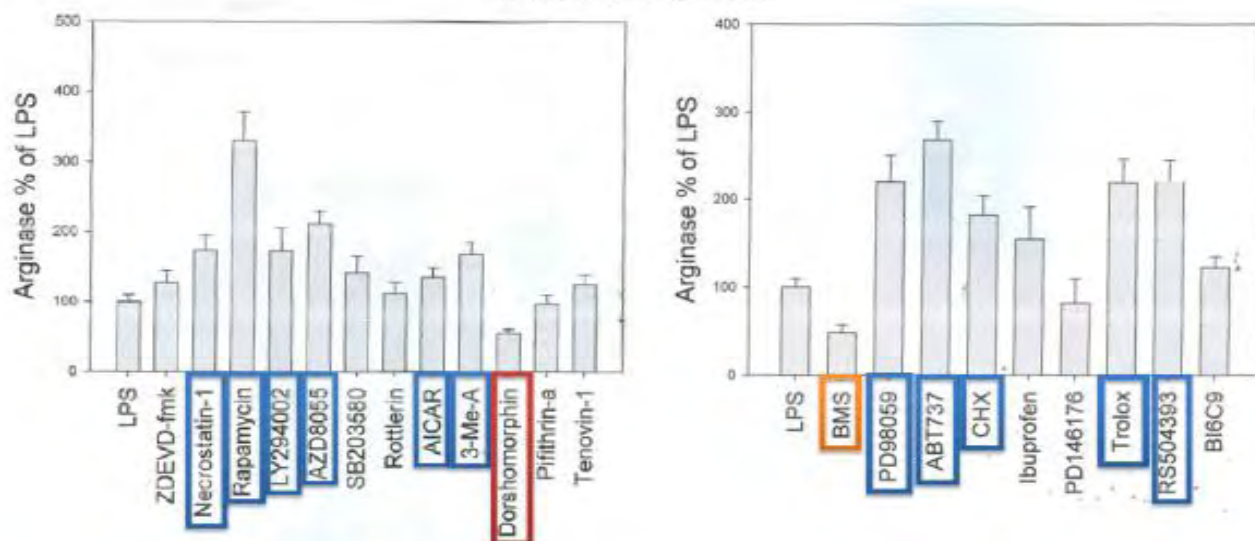


Εικόνα 11. Αντίδραση των Clone 6 στη πόλωση προς M1 μετά από επώαση με 10 ng/ml IFN- $\gamma$  + 100 ng/ml LPS. Το παραγώμενο NO που ανιχνεύθηκε κανονικοποιήθηκε ως ποσοστό επί την μέτρηση του δείγματος που επώαστηκε μόνο με LPS και λειτουργήσε ως θετικός μάρτυρας.

Στις εικόνες 10 και 11 βλέπουμε την αντίδραση των BMX2 και CL6 όταν διεγέρθηκαν με IFN- $\gamma$  ενώ ταυτόχρονα επώαστηκαν με μια πληθώρα αναστολέων σηματοδοτικών μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα στην εικόνα 10 οι μόνοι αναστολείς που μπόρεσαν να επηρεάσουν την παραγωγή NO από τα BMX2 ήταν το Trolox και το RS504393, όπου υπάρχει μια αύξηση της τάξεως του 100% του εκκρινώμενου NO σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. Κάτι παρόμοιο δεν συμβαίνει στο ίδιο πείραμα με κύτταρα Cl6 στην εικόνα 11, καθώς κανένας αναστολέας δεν φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή του NO σε σημαντικό βαθμό. Συνεπώς η HuR επηρεάζει θετικά την πόλωση προς M1 και μάλλον τα μονοπάτια που μπλοκάρουν το Trolox και το RS504393 ρυθμίζουν αρνητικά την εμπλοκή της HuR προς τον M1 φαινότυπο.

## Inhibitors Assay

### BMX2 Arginase Assay



Αύξηση

Μείωση

Χαμηλός αριθμός κυττάρων

Εικόνα 12. Αντίδραση των BMX2 στη πόλωση προς M2 μετά από επώαση με 10 ng/ml IL-4 + 100 ng/ml LPS. Παραγόμενη ουρία που ανιχνεύθηκε είναι συνάρτηση της ενεργότητας της Αργινάσης 1 και κανονικοποιήθηκε ως ποσοστό επί την μέτρηση του δείγματος που επώαστηκε μόνο με LPS και λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας.

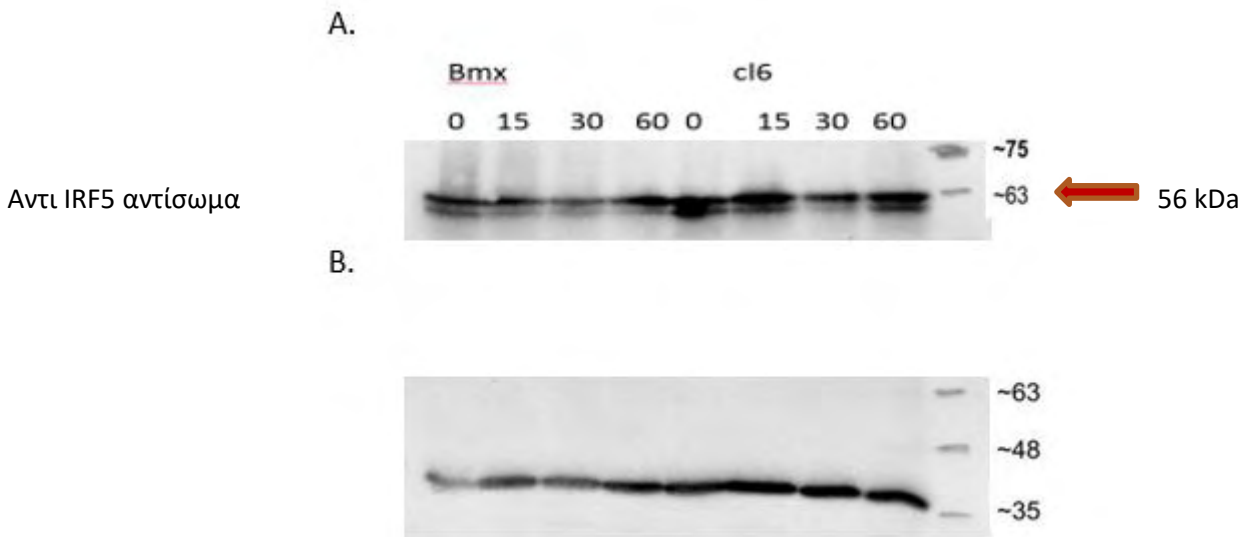
Κατά την επώαση BMX2 με τους ίδιους αναστολείς και διέγερση με IL-4 φαίνεται στην εικόνα 12 ότι περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια να παίζουν ρόλο στην πόλωση προς M2. Πιο συγκεκριμένα παρουσία 11 αναστολέων η αργινάση 1 αυξάνεται κατά 100% το λιγότερο σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα και 1 αναστολέα να προκαλεί αισθητή μείωση της αργινάσης 1. Άξιο αναφοράς είναι πως μεγαλύτερη επαγωγή της αργινάσης 1 συμβαίνει παρουσία της ραπαμυκίνης, γνωστού αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης mTOR καθώς επίσης και του μοναδικού αναστολέα που μειώνει την αργινάση και αυτός είναι η Dorsomorphin, επιλεκτικός αναστολέας της AMPK. Άρα αρκετά μονοπάτια επηρεάζουν την πόλωση προς M2 όπου όταν αναστέλλονται και παρουσία της HuR βλέπουμε ενίσχυση της παραγωγής αργινάσης 1. Η δοκιμασία της αργινάσης με τους αναστολείς πραγματοποιήθηκε και για κύτταρα HuR KO αλλά λόγω κάποιων τεχνικών δυσκολιών, τα δείγματα καταστράφηκαν. Το πείραμα επαναλήφθηκε στο εργαστήριο και έδειξε μια πιθανή συμμετοχή της HuR στα μονοπάτια που εμπλέκουν την MTORC1.

### **3.8 Αξιολόγηση έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην πύλωση προς M1/M2 παρουσία και απουσία της HuR**

Θέλοντας να εμβαθύνουμε περισσότερο στο πως η απουσία της HuR επηρεάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την πύλωση προς M1 και M2, επιλέξαμε 3 μεταγραφικούς παράγοντες για να αξιολογήσουμε την διαφορική τους έκφραση ανάμεσα στα φυσικού τύπου μακροφάγα και σε αυτά που υπολείπονται της HuR. Πιο συγκεκριμένα, για την κατάσταση M1 επιλέχτηκε ο μεταγραφικός παράγοντας που βρίσκεται στο τέλος τους σηματοδοτικού μονοπατιού ενεργοποίησης από το LPS, ο IRF5. Για την M2 επιλέχθηκαν 2 μεταγραφικοί παράγοντες γνωστοί ότι βρίσκονται στο τέλος του σηματοδοτικού μονοπατιού της IL-4 και του υποδοχέα της και δρουν συνεργατικά για την επιτυχημένη ενεργοποίηση πολλών χαρακτηριστικών γονιδίων της κατάστασης M2, ο Stat6 και ο KLF4.

#### **3.8.1 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα IRF5 δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της HuR**

Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ο IRF5 παίζει ένα καίριο ρόλο κατά την M1 πύλωση των μακροφάγων μαζί με τον NF-κΒ, καθώς απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στα M1 μακροφάγα και μπορεί να επάγει την μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-12. (52) Δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένο κατά πόσο επηρεάζεται η ποσότητα ή/και η δράση του IRF5 από την απουσία της HuR. Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε την ποσότητα του IRF5 σε κύτταρα BMX2 και Cl6 μετά από ενεργοποίηση με IFN-γ. Η επώαση έγινε για 15, 30 και 60 λεπτά καθώς και για 0 λεπτά σαν θετικός μάρτυρας. Στα 4 πρώτα πηγαδάκια έχουμε 0, 15,30 και 60 λεπτά της IFN-γ με κύτταρα BMX2 και στα 4 επόμενα 0,15,30 και 60 λεπτά IFN-γ.



Εικόνα 13. Α. Western Blot με αντίσωμα έναντι του IRF5 στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των ~56 kDa. Πρώτ\_α βλέπουμε την απόκριση των μακροφάγων παρουσία HuR μετά από 0, 15, 30 και 60 λεπτά επώασης με την IFN-γ. Έπειτα έχουμε την απόκριση του Cl6 στην IFN-γ πάλι για διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτά

Β. Εμφάνιση της πρωτεΐνης GAPDH στην ίδια μεμβράνη χρησιμοποιώντας την ως μέτρο ποσοτικοποίησης.

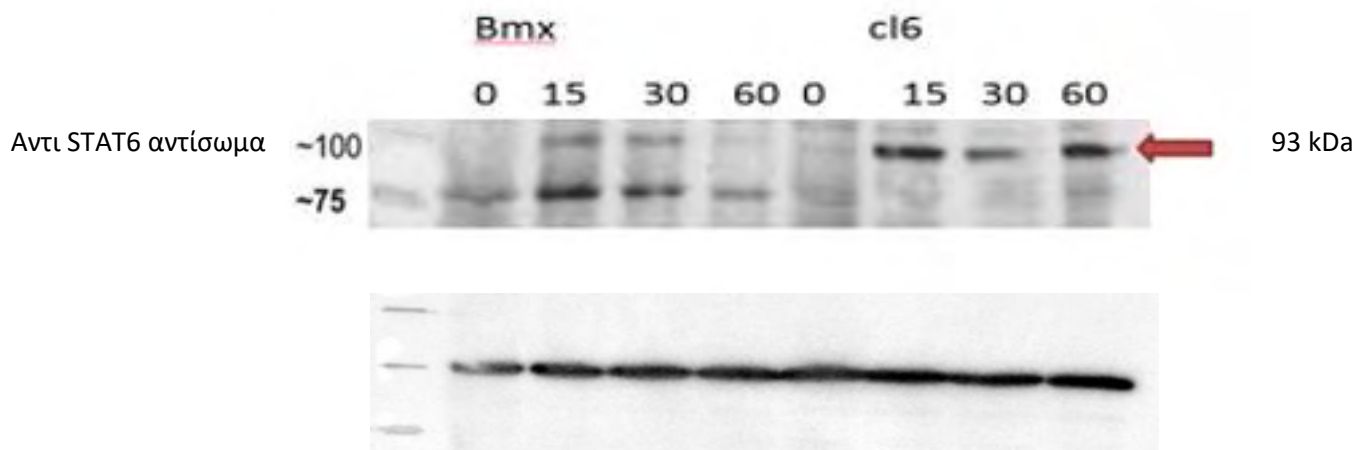
Με μια πρώτη ματιά φαίνεται στην εικόνα 13, ότι ανεξαρτήτως του χρόνου επώασης με την IFN-γ, δεν βλέπουμε διαφορές στην ποσότητα του IRF5 παρουσία ή απουσία της HuR. Επιπροσθέτως η έκφραση του IRF5 στα BMX2 ίσως να φανεί αρχικά μικρότερη σε σχέση με τον Cl6, κάτι που όμως δεν ισχύει αν λάβουμε υπόψην μας την ποσοτικοποίηση μέσω GAPDH που έγινε. Συνεπώς και μεταξύ των BMX2 και Cl6 δεν παρατηρούνται διαφορές στην ποσότητα του IRF5 ο οποίος φαίνεται να δρα στα μακροφάγα ανεξάρτητα από την παρουσία της HuR.



### 3.8.2 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT6 αυξάνεται όταν η HuR δεν εκφράζεται

Ένας από τους πρώτους μεταγραφικούς παράγοντες που θέλαμε να εξετάσουμε ως προς την συμμετοχή του στην εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων παρουσία ή απουσία της HuR, είναι ο STAT6. Ο STAT6 είναι το μόριο που βρίσκεται στο τέλος του μονοπατιού που ενεργοποιείται από την πρόσδεση της IL-4 στο υποδοχέα της και μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση γονιδίων χαρακτηριστικών της εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων.

Χρησιμοποιήσαμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις κυτταρικές σειρές BMX2 και Clone 6 και αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα STAT6, αφότου τα κύτταρα είχαν επωαστεί πρώτα με την IL-4 για 15, 30 και 60 λεπτά όπως και κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς κάποια κυτταροκίνη στο θρεπτικό μέσο τους. Η σειρά που έτρεξαν τα δείγματα στο τζελ ακρυλαμίδης είναι παρόμοια με εκείνη του προηγούμενου πειράματος. Εχουμε σήμα στο μοριακό βάρος που περιμένουμε να βρούμε τον Stat6 ~93.5 kDa.



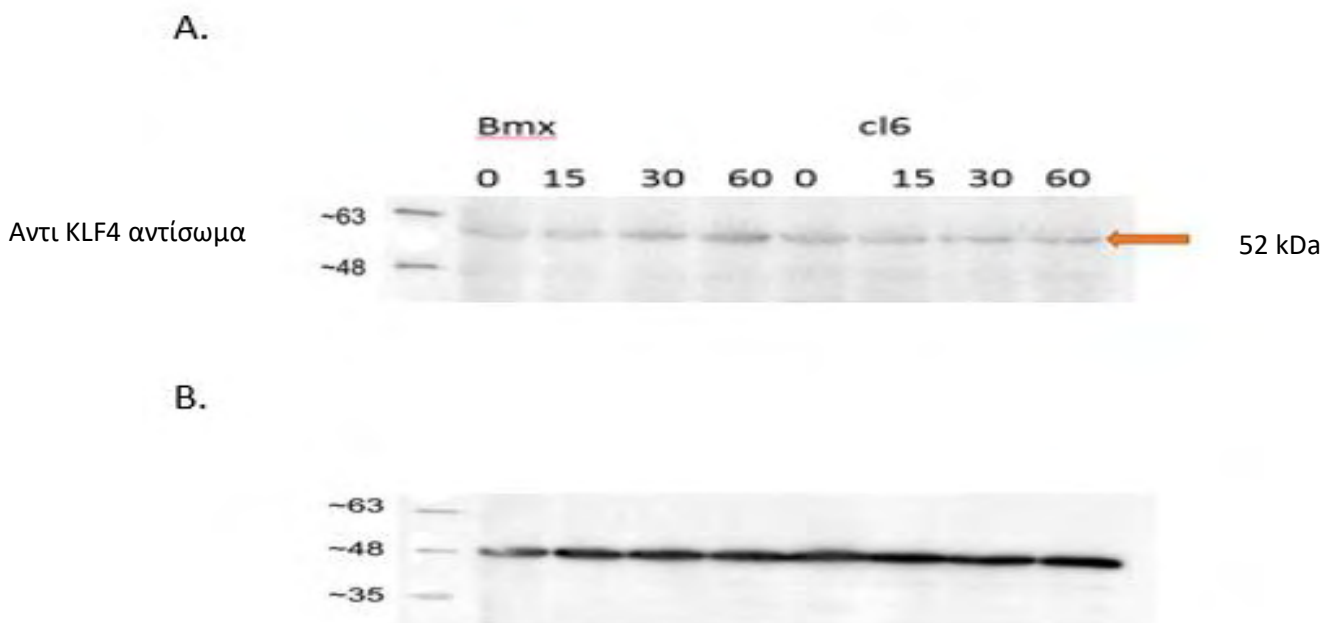
Εικόνα 14. Ανοσοσύτρωμα κατά Western μεμβράνης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα BMX2 που μεγάλωσαν παρουσία IL-4 για 0, 15, 30 και 60 λεπτά και στη συνέχεια ομοίως για κύτταρα Cl6. Το πρωτεύων αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν έναντι του μεταγραφικού παράγοντα STAT. Το σήμα παρατηρείται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των ~93,5 kDa. Η εικόνα από κάτω πρόκειται για την ανίχνευση της GAPDH στην ίδια μεμβράνη ως μέτρο ποσοτικοποίησης των δειγμάτων.

Στη μεμβράνη της εικόνας 14 έχουμε τα BMX2 όπου η έκφραση του STAT6 αυξάνεται στα 15 και 30 λεπτά ενώ μειώνονται στα φυσιολογικά επίπεδα στη 1 ώρα. Στον αντίποδα είναι ο Cl6 όπου από τα 15 λεπτά ως την 1 ώρα η ποσότητα του STAT6 είναι αυξημένη σταθερά.

### 3.8.3 Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 είναι μειωμένη στα κύτταρα που δεν εκφράζουν τη HuR σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου μακροφάγα

Επόμενος μεταγραφικός παράγοντας που εξετάζουμε την εμπλοκή του στην εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι ο Krüppel-like Factor 4 ή KLF4. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι υπάρχουν αλληλεπιδρασεις του KLF4 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως Stat6 ή PPARβ/δ κατά την εναλλακτική πόλωση των μακροφάγων καθώς επίσης και ότι για μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση από τον Stat6 σε χαρακτηριστικά γονίδια της M2 πόλωσης όπως το Arg1 είναι απαραίτητη η παρουσία του KLF4 (53). Εμείς θέλαμε να δούμε αν κατά την εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων, η απουσία της HuR θα επηρέαζε την έκφραση του KLF4.

Κύτταρα BMX2 και Clone 6 επώαστηκαν παρουσία IL-4 για 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους 15, 30 και 60 λεπτά καθώς και κύτταρα απουσία της. Έπειτα παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα διάφορα κύτταρα και έτρεξαν σε τζελ ακρυλαμίδης με την ίδια σειρά και στα 2 προηγούμενα πειράματα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι για τον εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα KLF4, ο οποίος έχει μοριακό βάρος 51.8 kDa. Ανιχνεύεται ένα σήμα στο αντίστοιχο μοριακό βάρος σύμφωνα με τον marker.



Εικόνα 15. Α. Μembrάνη με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων BMX2 και Cl6. Στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων αυτών είχε προστεθεί IL-4 για 0, 15, 30 και 60 λεπτά. Τα πρώτα 4 είναι τα δείγματα των κυττάρων BMX2 και τα υπόλοιπα 4 του Cl6. Η membrάνη επώαστηκε με πρωτεΐων αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 και έχουμε σήμα στο σωστό ύψος των ~52 kDa.

Β. Εικόνα της ίδιας membrάνης έπειτα από επώαση με αντίσωμα έναντι της GAPDH για ποσοτικοποίηση των πρωτεΐων στα δείγματα.

Παρουσία της HuR η ποσότητα του KLF4 παραμένει σταθερή μέχρι τα 15 λεπτά. Στα 30 λεπτά φαίνεται μια αύξηση η οποία εντείνεται στην 1 ώρα επώασης με την IL-4. Αντίθετα, όταν απουσιάζει η HuR δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην ποσότητα του KLF4 σε κανέναν από τα 4 χρονικά σημεία όπως φαίνεται στην εικόνα 15.

## 4.Συζήτηση

---

Η πόλωση των μακροφάγων είναι μια πολύ σύνθετη κυτταρική διεργασία που έχει σαν αποτέλεσμα την δραματική αλλαγή στον φαινότυπο του μακροφάγου. Μαζί με αυτόν, τα κύτταρα αποκτούν και νέες λειτουργίες, όπως κυτταροτοξικότητα, οι οποίες αν δεν βρίσκονται υπό συνεχή και αυστηρό έλεγχο μπορούν να αποδειχτούν περισσότερο βλαβερές παρά ωφέλιμες για τον οργανισμό και τους περιβάλλοντα ιστό. Για τον λόγο αυτό, τα μακροφάγα έχουν αναπτύξει ένα πολύ-επίπεδο σύστημα οργάνωσης και ελέγχου των σημάτων και των μορίων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πόλωση τους.

Το πρώτο επίπεδο ελέγχου έγκειται κατά την μεταγραφή, όπου μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων είναι ικανοί να ρυθμίσουν και να επάγουν τη πόλωση προς το φαινότυπο M1, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλουν τη πόλωση προς M2 και αντίστροφα. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχονται ανωδικά από ένα περίτεχνο δίκτυο σηματοδότησης που ξεκινά από υποδοχείς στην επιφάνεια του μακροφάγου. Αυτοί δρουν σαν εφαλτήριο για την διάδοση του σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου με κύριο χαρακτηριστικό την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στόχων μέχρι να φτάσει το μήνυμα στους κατάλληλους μεταγραφικούς παράγοντες. Παρ' όλα αυτά, η παραπάνω διαδικασία δεν είναι αρκετή για την σωστή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Για τον λόγο αυτό, στα μακροφάγα η διαδικασία της πόλωσης ελέγχεται και σε ένα ακόμα μεταγενέστερο επίπεδο, στο μετα-μεταγραφικό. Κατά τον μετα-μεταγραφικό έλεγχο, κύρια μόρια ρυθμιστές είναι οι λεγόμενες πρωτεΐνες δέσμησης του RNA (RBPs). Αυτές οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες στο mRNA και ρυθμίζουν την χρόνο ημιζωής του και έτσι ουσιαστικά ρυθμίζουν και την παραγωγή της πρωτεΐνης του αντίστοιχου mRNA.

Στη παρούσα μελέτη έχουμε σαν πρότυπο μόριο τη HuR, μια καίριας σημασίας RBP, που είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στην ρύθμιση του χρόνου ημιζωής πολλών σημαντικών mRNA των μακροφάγων. Χρησιμοποιώντας ένα σύστημα κυτταρικών σειρών που προσομοιώνουν στο μέγιστο δυνατό τα ενδογενή μακροφάγα, καθώς και κύτταρα που είτε δεν εκφράζουν τη HuR είτε την υπερεκφράζουν, προσπαθούμε να μάθουμε πως ρυθμίζεται η διαδικασία της πόλωσης. Πιο συγκεκριμένα μελετώντας την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που είναι γνωστό πως εμπλέκονται στην πόλωση των μακροφάγων, θέλουμε να δούμε πως αλληλεπιδρά το μεταγραφικό επίπεδο ρύθμισης με το μεταμεταγραφικό και τι ρόλο παίζει η παρουσία ή η απουσία της HuR σε αυτό το πολύπλοκο δίκτυο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια επισκόπηση για τη δημιουργία των δύο κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ως μακροφάγα φυσικού τύπου και ως μακροφάγα που υπολείπεται η HuR, ονόματι BMX2 και Cl6 αντίστοιχα. Μέσω Western Blot και τη χρήση

αντισώματος έναντι της HuR ανιχνεύσαμε σήμα της στα κύτταρα φυσικού τύπου το οποίο και απουσίαζε από τα κύτταρα του Cl6.

Στη συνέχεια, εισήχθη με τη χρήση ενός πρωτόκολλου ηλεκτροδιάτρησης σε κύτταρα BMX2 και Cl6 ένα πλασμίδιο το οποίο έφερε το γονίδιο της HuR μαζί με τον επίτοπο HA. Αυτή η εισαγωγή είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο νέων κυτταρικών σειρών, μίας που εκφράζει το ενδογενές γονίδιο της HuR μαζί με το εισαχθέν γονίδιο της HA-HuR. Στη κυτταρική σειρά αυτή η HuR υπερεκφραζόταν και ονομάστηκε Cl C. Στη δεύτερη, είχαμε την εισαγωγή του πλασμιδίου με την HA-HuR σε κύτταρα του Cl6, ο οποίος δεν εκφράζει κάποια ενδογενή HuR αλλά μόνο την HA-HuR. Τα μακροφάγα αυτά πρόκειται για τον διασωθέν φαινότυπο της HuR και ονομάστηκαν Cl E. Οι παραπάνω μετατροπές καθώς και οι σχετικές εκφράσεις της ενδογενούς HuR και της HA-HuR, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της HuR και του επιτόπου HA μέσω μιας ανοσοσύπωσης κατά Western.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις προσδετών που πολώνουν τα μακροφάγα προς M1 ή M2 δηλαδή IFN- $\gamma$  και IL-4 αντίστοιχα σε κύτταρα που εκφράζουν τη HuR, την υπερεκφράζουν ή δεν την εκφράζουν καθόλου. Αυτό έγινε για να διαπιστωθεί ποια συγκέντρωση είναι κατάλληλη για βέλτιστη ενεργοποίηση καθώς και αν παρατηρούνται φαινόμενα αρνητικής ανατροφοδότησης στα σηματοδοτικά μονοπάτια που πολώνουν τα κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις των προσδετών.

Κατά την πόλωση προς M2 σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις φάνηκε μειωμένη ικανότητα πόλωσης των κυττάρων πράγμα που πιθανών σημαίνει ότι ίσως να υπάρχει κάποιος μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης μεταξύ της IL-4 και του υποδοχέα της. Επιπροσθέτως, η υπερέκφραση της HuR φαίνεται να μειώνει την ικανότητα των μακροφάγων να πολώνονται προς M2 πράγμα που δείχνει ότι υπερβολική ποσότητα της HuR στο κύτταρο δεν ενισχύει την ικανότητα τους να πολώνονται αλλά αντίθετα την παρακωλύει.

Αντίθετα, στη δοκιμασία του μονοξειδίου του αζώτου, παρουσία της HuR δεν υπάρχει κάποια συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  που να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην κλασσική πόλωση των μακροφάγων. Ενδιαφέρουσα είναι η απόκριση του διασωθέν φαινότυπου της HuR που κατά την πόλωση προς M2 δεν φαίνεται να είναι ικανός να έχει παρόμοια δράση με εκείνη των BMX2 ενώ κατά την πόλωση προς M1, όχι μόνο είναι ικανός να πολωθεί αλλά το επιτυγχάνει σε επίπεδα ίδια με τα BMX2. Τα παραπάνω μαζί με το γεγονός ότι ο διασωθέν φαινότυπος εκφράζει χαμηλότερα επίπεδα της HuR απ' ότι τα BMX2 μας οδηγούν να υποθέσουμε ότι η ελάχιστη ποσότητα της HuR που χρειάζεται για να επιτευχθεί η κλασσική πόλωση είναι μικρότερη σε σύγκριση με την ποσότητα της HuR που πρέπει να υπάρχει ώστε να έχουμε μια εναλλακτική πόλωση στα μακροφάγα.

Με την χρήση των ίδιων πρωτοκόλλων NO και αργινάσης, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις στην πόλωση των μακροφάγων παρουσία ενός μεγάλου εύρους αναστολέων σηματοδοτικών μονοπατιών στο κύτταρο. Στο πείραμα ανίχνευσης μονοξειδίου του αζώτου στα BMX2, παρουσία των αναστολέων Trolox και RS504393 υπάρχει αύξηση στην συγκέντρωση του εκκρινόμενου NO κάτι που δεν παρατηρείται όταν λείπει η HuR στα κύτταρα του Cl6 όπου η παραγωγή του μονοξειδίου είναι σε βασικά επίπεδα. Πιθανώς, τα μονοπάτια που σχετίζονται με τον υποδοχέα CCR2 και την οξειδωτική κατάσταση του κυτταρού επηρέαζαν αρνητικά την πόλωση προς M1 ενώ η παρουσία της HuR έχει θετική επίδραση και θα μπορούσε να ρυθμίζει - αρνητικά αυτά τα μονοπάτια.

Σε επόμενο βήμα εξετάστηκε η ικανότητα πόλωσης προς M2 κυττάρων BMX2 παρουσία των ίδιων αναστολέων μετρώντας την παραγόμενη ουρία λόγω δραστηριότητας της αργινάσης 1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορούν να επηρεάσουν την πόλωση προς M2 είναι πολύ περισσότερα σε σύγκριση με την M1. Πιο συγκεκριμένα μειώθηκε η συγκέντρωση της ουρίας σε έναν από τους εικοσι ένα συνολικά αναστολείς που χρησιμοποιήσαμε και σε έντεκα να αυξάνεται, με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται παρουσία Rapamycin. Φαίνεται επίσης πως από τους έντεκα αυτούς αναστολείς, οι τέσσερις αναστέλλουν το μονοπάτι της PI3K/Akt/mTOR οπότε πιθανώς το μονοπάτι αυτό να έχει κομβικό ρόλο στην αρνητική ρύθμιση της εναλλακτικής πόλωσης των μακροφάγων.

Δυστυχώς, λόγω του ότι το πρωτόκολλο της μέτρησης της αργινάσης 1 τροποποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας για την μέτρηση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα από τον Α. Προσίλη, δεν είχαν λυθεί κάποια τεχνικά ζητήματα και συνεπώς, τα δείγματα των κυττάρων HuR-KO καταστράφηκαν. Παρ' όλα αυτά, το πείραμα επαναλήφθηκε σε μετέπειτα χρόνο στο εργαστήριο και έδειξε μια πιθανή εμπλοκή της HuR στα μονοπάτια συμμετέχει η mTORC1.

Στο τελευταίο τμήμα της πτυχιακής μελετήθηκε πως επηρεάζονται τελικά μόρια στα σηματοδοτικά μονοπάτια των μακροφάγων από την απουσία έκφρασης της HuR. Για τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που εκφράζουν την HuR και κύτταρα που απουσιάζει, επώαστηκαν με IFN- $\gamma$  και IL-4 0, 15, 30 και 60 λεπτά και έπειτα ανιχνεύθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες με κατάλληλα αντίσωμα μέσω ανοσοσύπωσης κατά Western. Στα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με IFN- $\gamma$  επιλέχθηκε ο IRF5, χαρακτηριστικός μεταγραφικός παράγοντας που έχει συσχετιστεί με την κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων στη βιβλιογραφία. Για τον IRF5, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του τόσο με την πάροδο του χρόνου όσο και μεταξύ των BMX2 και Cl6. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι ο IRF5 δρα φωσφορυλιωμένος και εκείνη η μορφή του να παρουσιάζει διαφορετική έκφραση παρουσία και απουσία της HuR.

Για την εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων παρατηρήθηκε η διαφορετική έκφραση δύο κομβικών μεταγραφικών παραγόντων, του STAT6 και του KLF4. Παρουσία της HuR, η έκφραση του STAT6 αυξήθηκε ελάχιστα 15 και 30 λεπτά για να επιστρέψει στις βασικές τιμές στη 1 ώρα ενώ απουσία της είχαμε μια σταθερά αυξημένη έκφραση του Stat6 από τα 15 λεπτά μέχρι την 1 ώρα και μεγαλύτερης έντασης απ' ότι στα BMX2. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μας έδωσαν μια ξεκάθαρη εικόνα και μαζί με το γεγονός ότι και ο STAT6 χρειάζεται να φωσφορυλιωθεί και να σχηματίσει διμερή για να ενεργοποιήσει γονίδια, μας κάνουν να υποθέτουμε ότι πρέπει να μελετηθεί και ο φωσφορυλιωμένος STAT6 παρουσία και απουσία HuR για να έχουμε ολοκληρωμένη εικόνα στο αν η HuR επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι του STAT6.

Τέλος, ανιχνεύθηκε ο KLF4 σε κύτταρα BMX2 για 0, 15, 30 και 60 λεπτά και φάνηκε ότι υπάρχει μια αύξηση στην ποσότητα του στα 30 λεπτά η οποία κορυφώθηκε στα 60 λεπτά. Όταν απουσίαζε η HuR, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην ποσότητα του KLF4 σε σύγκριση με τα βασικά επίπεδα ανεξαρτήτως της χρονικής διάρκειας. Τα παραπάνω συνηγορούν σε μια ισχυρή πεποίθηση ότι η HuR βοηθάει στο να δράσει ο KLF4 μαζί με τον STAT6 στα γονίδια στόχους. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτή η βοήθεια, δεν είναι ξεκάθαρος ακόμα και μπορεί να περιλαμβάνει την σταθεροποίηση mRNA πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι ενεργοποίησης του KLF4.

Είναι προφανές πως η παρούσα διπλωματική επιχειρεί να συμβάλλει στην κατανόηση του ρόλου της HuR στα σηματοδοτικά μονοπάτια της πόλωσης των μακροφάγων. Κρίνεται αναγκαίο να γίνουν περισσότερες μελέτες εις βάθος όπου θα μπορέσουμε να χαρακτηρίσουμε ποιες ακριβώς πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την HuR κατά την πόλωση προς M1 ή M2 και με ποιο τρόπο καταφέρνει η HuR να ρυθμίζει αρνητικά ή θετικά την δράση των πρωτεϊνών αυτών ώστε τα μακροφάγα να μπορέσουν να ανταποκριθούν γρήγορα και αποτελεσματικά στις ανάγκες του περιβάλλοντος. Επιπροσθέτως, γνωρίζουμε ότι απώλεια ρύθμισης του ελέγχου των κλασικά ή εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Συνεπώς, όσο καλύτερα γνωρίζουμε τον τρόπο που λειτουργεί ένα καίριας σημασίας μόριο για την σωστή πόλωση όπως η HuR, τόσο πιο αποτελεσματικές και στοχευμένες θεραπείες μπορούν να δημιουργηθούν για ασθένειες που οφείλονται στην απορρύθμιση του μηχανισμού της πόλωσης των μακροφάγων.

## Βιβλιογραφία

---

1. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr;9(4):259-70. doi: 10.1038/nri2528.
2. Thomas A. Wynn , Ajay Chawla & Jeffrey W. Pollard. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445-55. doi: 10.1038/nature12034.
3. Akira S, Misawa T, Satoh T, Saitoh T. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes Obes Metab.* 2013 Sep;15 Suppl 3:10-8. doi: 10.1111/dom.12151.
4. Takeuchi O1, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
5. Akira S1, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
6. Ruslan Medzhitov. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435 (24 July 2008) | doi:10.1038/nature07201.
7. Fullerton JN, Gilroy DW, Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Aug;15(8):551-67. doi: 10.1038/nrd.
8. Mosser DM1, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008 Nov;Chapter 14:Unit 14.2. doi: 10.1002/0471142735.im1402s83.
9. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643.
10. Taniguchi T, Takaoka A. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 May;2(5):378-86.
11. Schroder K1, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89. Epub 2003 Oct 2.
12. Matsumoto M, Tanaka N, Harada H, Kimura T, Yokochi T, Kitagawa M, Schindler C, Taniguchi T. Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol Chem.* 1999 Jun;380(6):699-703.
13. Fernando O. Martinez and Siamon Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. doi: 10.12703/P6-13
14. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.
15. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
16. Christopher J. Ferrante and Samuel Joseph Leibovich. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012 Feb; 1(1): 10–16. doi: 10.1089/wound.2011.0307
17. Robert M Anthony, Joseph F Urban, Jr, Farhang Alem, Hossein A Hamed, Cristina T Roza, Jean-Luc Boucher, Nico Van Rooijen, and William C Gause. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* 2006 Aug; 12(8): 955–960.
18. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011 Jul;216(7):753-62. doi: 10.1016/j.imbio.2011.01.001.
19. Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S, Capron M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000 Jul;68(1):125-30.
20. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature.* 2007 May 3;447(7140):92-6. Epub 2007 Apr 22.
21. J. Zamorano, M.D. Rivas, M. Pérez-G. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunología Vol. 22 / Núm 2/ Abril-Junio 2003: 215-224*
22. Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional Control of Macrophage Polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jun;33(6):1135-44. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301453



23. Anderson CF1, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002 Jul;72(1):101-6.
24. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73(2):209-12.
25. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 1998 May;63(5):521-33.
26. Lurier EB, Dalton D, Dampier W, Raman P, Nassiri S, Ferraro NM, Rajagopalan R, Sarmady M, Spiller KL. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology.* 2017 Jul;222(7):847-856. doi: 10.1016/j.imbio.2017.02.006.
27. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677-86.
28. Rószter T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460. doi: 10.1155/2015/816460.
29. Yulei Chen, Siyuan Zhang, Qizhi Wang, and Xiaobo Zhang. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *J Hematol Oncol.* 2017; 10: 36.
30. Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun;14(6):361-76. doi: 10.1038/nri3682.
31. Bjur E, Larsson O, Yurchenko E, Zheng L, Gandin V, Topisirovic I, Li S, Wagner CR, Sonenberg N, Piccirillo CA. Distinct translational control in CD4+ T cell subsets. *PLoS Genet.* 2013 May;9(5):e1003494. doi: 10.1371/journal.pgen.1003494.
32. Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):281-8. doi: 10.1038/ni.1699.
33. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 2008 Jun 18;582(14):1977-86. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.004.
34. Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Mar;14(3):153-65. doi: 10.1038/nrm3525.
35. Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):777-93. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.011.
36. González-Terán B, Cortés JR, Manieri E, Matesanz N, Verdugo Á, Rodríguez ME, González-Rodríguez Á, Valverde ÁM, Martín P, Davis RJ, Sabio G. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- $\alpha$  translation in LPS-induced hepatitis. *J Clin Invest.* 2013 Jan;123(1):164-78. doi: 10.1172/JCI65124.
37. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448.
38. Zubiaga AM, Belasco JG, Greenberg ME. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol.* 1995 Apr;15(4):2219-30.
39. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraprolin. *Science.* 1998 Aug 14;281(5379):1001-5.
40. Gratacós FM, Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010 Nov-Dec;1(3):457-73. doi: 10.1002/wrna.26.
41. Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- $\alpha$ . *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4154-63.
42. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(20):3168-81. doi: 10.1007/s00018-008-8252-6.
43. Brooks SA, Blackshear PJ. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun-Jul;1829(6-7):666-79. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.02.003.

44. Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, Schenkman DI, Gilkeson GS, Broxmeyer HE, Haynes BF, Blakeshear PJ. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetruprolin (TTP) deficiency. *Immunity*. 1996 May;4(5):445-54.
  45. Lu JY1, Sadri N, Schneider RJ. Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev*. 2006 Nov 15;20(22):3174-84.
  46. Sadri N, Schneider RJ. Auf1/Hnnpd-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;129(3):657-70. doi: 10.1038/jid.2008.298.
  47. Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jun;10(6):430-6. doi: 10.1038/nrm2694.
  48. Phillips K, Kedersha N, Shen L, Blakeshear PJ, Anderson P. Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2011-6.
  49. Simarro M, Giannattasio G, Xing W, Lundequist EM, Stewart S, Stevens RL, Orduña A, Boyce JA, Anderson PJ. The translational repressor T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) is a key modulator of Th2 and Th17 responses driving pulmonary inflammation induced by exposure to house dust mite. *Immunol Lett*. 2012 Aug 30;146(1-2):8-14. doi: 10.1016/j.imlet.2012.04.001.
  50. Yiakouvaki A, Dimitriou M, Karakasiliotis I, Eftychi C, Theocharis S, Kontoyiannis DL. Myeloid cell expression of the RNA-binding protein HuR protects mice from pathologic inflammation and colorectal carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):48-61. doi: 10.1172/JCI45021. Epub 2011 Dec 27.
  51. Katsanou V, Papadaki O, Milatos S, Blakeshear PJ, Anderson P, Kollias G, Kontoyiannis DL. HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell*. 2005 Sep 16;19(6):777-89.
  52. Thomas Krausgruber, Katrina Blazek, Tim Smallie, Saba Alzabin, Helen Lockstone, Natasha Sahgal, Tracy Hussell, Marc Feldmann & Irina A Udalova. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature Immunology* 12, 231–238 (2011)
  53. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2736-49. doi: 10.1172/JCI45444. Epub 2011 Jun 13.
-