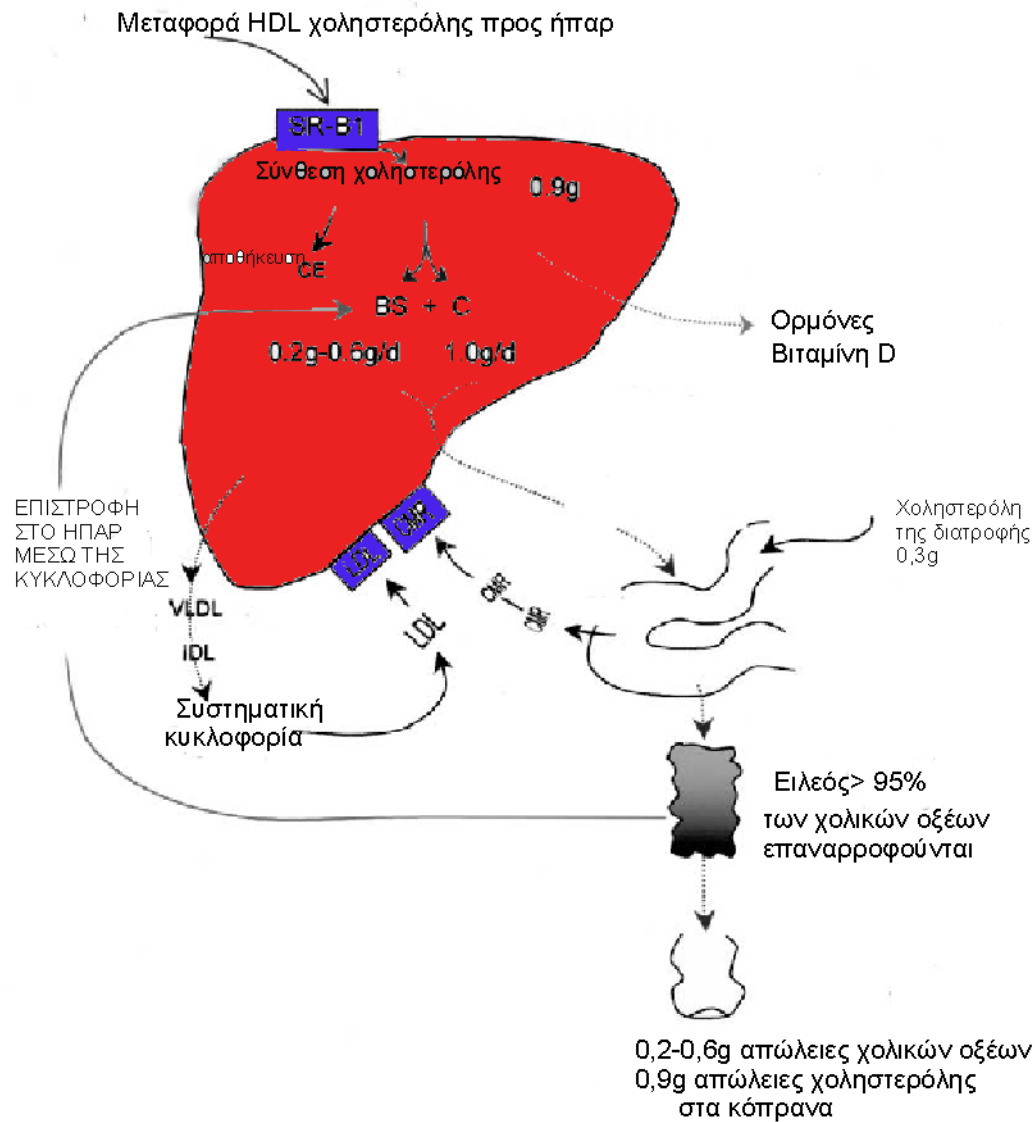


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος της ‘Μικρής Ετεροδιμερούς Συνεργού’ πρωτεΐνης (Short Heterodimer Partner ή SHP) στο μεταβολισμό των χολικών οξέων.



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΤΣΟΥΜΑΝΗ ΝΑΤΑΛΙΑ
ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ ΑΣΠΑΣΙΑ

Τ.Ε.Ι ΚΡΗΤΗΣ -ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΗΤΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΗΤΕΙΑ 2004

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου Δρ. Ασπασία Σπυριδάκη, καθηγήτρια εφαρμογών του Τ.Ε.Ι Κρήτης. Η συμβολή της ήταν πολύ μεγάλη. Το ίδιο το θέμα είχε τεράστιο ενδιαφέρον και επίσης μου έδωσε τη δυνατότητα να δουλέψω εργαστηριακά στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης και συγκεκριμένα τον Δρ. Γεώργιο Τσιώτη, Λέκτορα Βιοχημείας που μας έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε τα πειράματά μας στο εργαστήριο του, υπό την εποπτεία του. Η συμβολή του ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς μας έδειξε όλες τις τεχνικές. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γιάννη Ταλιανίδη ο οποίος μας παρείχε το βιολογικό υλικό από τα ποντίκια που μελετήσαμε από το τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο και μου έδειξαν πολλά πράγματα στο πειραματικό μέρος με βάση την εμπειρία τους.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στα πλαίσια της πτυχιακής αυτής εργασίας πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση του μεταβολισμού της χοληστερόλης, της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, του ρόλου των λιποπρωτεϊνών στο μεταβολισμό της χοληστερόλης όπως και του ρόλου των πυρηνικών υποδοχέων FXR (φαρνεζόλη X υποδοχέας), LXR (υποδοχέας X συκωτιού) και LRH (ομόλογος υποδοχέας του συκωτιού). Ειδικότερα έγινε μελέτη της SHP(μικρή ετεροδιμερής συνεργός).

Το ερευνητικό μέρος της εργασίας βασίστηκε στη μελέτη διαγονιδιακών ποντικών στα οποία είναι γενετικά υπερεκφρασμένη η πρωτεΐνη SHP. Το ποντίκι ως είδος έχει χρησιμοποιηθεί συχνά τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη της χοληστερόλης και του μεταβολισμού των χολικών οξέων, δεδομένου ότι μεταβολίζει τη διαιτητική χοληστερόλη με ένα τρόπο παρόμοιο με τον άνθρωπο. Το ποντίκι και ο άνθρωπος χρησιμοποιούν τη χαμηλή πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) ως αρχικό μεταφορέα χοληστερόλης στο συκώτι (Sullivan et al, 1993). Επιπλέον στο ποντίκι, ο έλεγχος έκφρασης της στερόλης 7α-υδροξυλάσης (CYP7A1) είναι παρόμοιος με αυτόν του ανθρώπου και επηρεάζεται από τη διαιτητική χοληστερόλη με τον ίδιο τρόπο (Horton et al, 1995).

Συγκεκριμένα, στο πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες της έκφρασης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στα ηπατικά κύτταρα του γενετικά τροποποιημένου και του φυσιολογικού ποντικίου. Η προσέγγιση αυτή αποσκοπεί στον εντοπισμό των ενδιάμεσων βιοχημικών σταδίων της βιοσύνθεσης χολικών οξέων, τα οποία ελέγχονται από την SHP.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. Apo = apolipoprotein = απολιποπρωτεΐνη
2. CDCA =chenodeoxycholic acid= χενοδεοχολικό οξύ
3. CE =cholesterol ester= εστέρας της χοληστερόλης
4. CETP = cholesterol ester transfer protein= εστέρας της χοληστερόλης που μεταφέρει πρωτεΐνη
5. CPF =CYP7A1 promoter factor= υποκινητικός παράγοντας της CYP7A1
6. CYP7A1 = cholesterol 7-hydroxylase= στερόλη 7α-υδροξυλάση
7. CYP27A1 =cholesterol 27 hydroxylase= η στερόλη 27α-υδροξυλάση
8. EHC = enterohepatic circulation=εντεροηπατική κυκλοφορία
9. FXR = farnesoid X receptor= φαρνεζόλη X υποδοχέας
10. HDL =high-density lipoprotein= λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
11. LRH= liver receptor homolog= ομόλογος υποδοχέας του συκωτιού
12. HMG CoA=3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A= αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-συνένζυμο A
13. HNF4α=hepatocyte nuclear factor =ηπατοκυτταρικός ορμονικός παράγοντας 4
14. IBABP = ileal bile acid-binding protein=ειλεϊκά χολικά οξέα –που δεσμεύουν πρωτεΐνη
15. IBAT = ileal bile-acid transporter= ειλεϊκά χολικά οξέα μεταφορείς
16. LDL =low-density lipoprotein= χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
17. LPL = lipoprotein lipase=λιποπρωτεϊνική λιπάση
18. LXR = liver X receptor= υποδοχέας X συκωτιού
19. OATP = organic anion transporter=οργανικό μεταφέρον ανιόν
20. PLTP = phospholipid transfer protein=φωσφολιπιδική μεταφέρουσα πρωτεΐνη
21. RXR = retinoid X receptor=ρετινοϊκός X υποδοχέας
22. SHP =short heterodimer partner=μικρός ετεροδιμερής συνεργάτης
23. SREBP = sterol response element-binding protein=πρωτεΐνη που δεσμεύει το στοιχείο απόκρισης των στερολών
24. TG =triglyceride=τριγλυκερίδια
25. VLDL = very low density lipoprotein=πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
26. PXR=pregnane X receptor=πρεγνάνιος X υποδοχέας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

1.1 Χολικά Οξέα

1.1.2 Απορρόφηση των χολικών Οξέων και μεταβολισμός

1.1.3 Έλεγχος της σύνθεσης και της έκκρισης χολικών οξέων

1.2 Χοληστερόλη

1.2.1 Η βιοσύνθεση της χοληστερόλης

1.2.2 Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης

1.3 Λιπίδια

1.4 Κύριες κατηγορίες των λιποπρωτεϊνών

1.4.1 Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

1.4.2 Οι απολιποπρωτεΐνες

1.4.3 Τα ένζυμα

1.4.4 Οι υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών

1.5 Ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

2.2 Μέθοδοι χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών

2.2.1 Ηλεκτροφόρηση

2.2.2 S.D.S Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

2.2.3 Μη αποδιατακτικές πηκτές

2.2.4 Δύο Διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (native PAGE/S.D.S PAGE)

2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών από σκώτι ποντικού

2.4 Μέθοδος BRADFORD

2.5 Βαθμίδωση σουκρόζης (sucrose gradient)

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών του ποντικού

3.2 Προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης των

κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

3.3 Ανάλυση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

3.4 Διαβάθμιση σουκρόζης

3.5 Ανάλυση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

5. Βιβλιογραφία

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

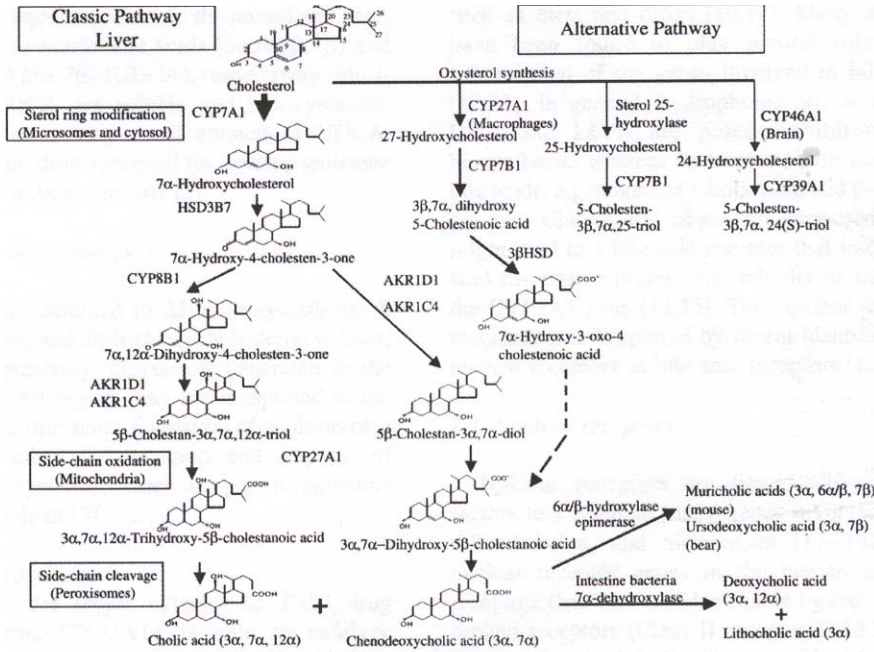
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα χολικά οξέα είναι το κύριο προϊόν της αποικοδόμησης της χοληστερόλης και η βιοσύνθεσή τους λαμβάνει χώρα στο συκώτι. Η αυξημένη λήψη λίπους με την τροφή αυξάνει την έκκριση των χολικών οξέων από το ήπαρ και κατά συνέπεια αυξάνεται και η συγκέντρωση αυτών στο έντερο. Τα χολικά οξέα ενεργοποιούν την φαρνεζόλη X υποδοχέα (FXR) η οποία συντελεί στην καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της υδροξυλάσης της 7 χοληστερόλης (CYP7A1). Το ένζυμο αυτό καταλύει το πρώτο και κινητικά καθοριστικό στάδιο στο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των χολικών οξέων από χοληστερόλη.

Το FXR προστατεύει με αυτό τον τρόπο τα ηπατικά κύτταρα από τη συσσώρευση χολικών οξέων. Η ενεργοποίηση του FXR με τη σύνδεση των χολικών οξέων επάγει τη μεταγραφή της SHP. Η SHP είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας χωρίς περιοχή δέσμευσης για DNA, δρα ως συγκαταστολέας της σύνθεσης των χολικών οξέων και αλληλεπιδράει με μια σειρά άλλων πυρηνικών υποδοχέων. Ποντίκια που στερούνται το γονίδιο της SHP παρουσιάζουν αυξημένη σύνθεση χολικών οξέων και απώλεια της ικανότητας καταστολής της έκφρασης της CYP7A1.

1.1 ΧΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ.

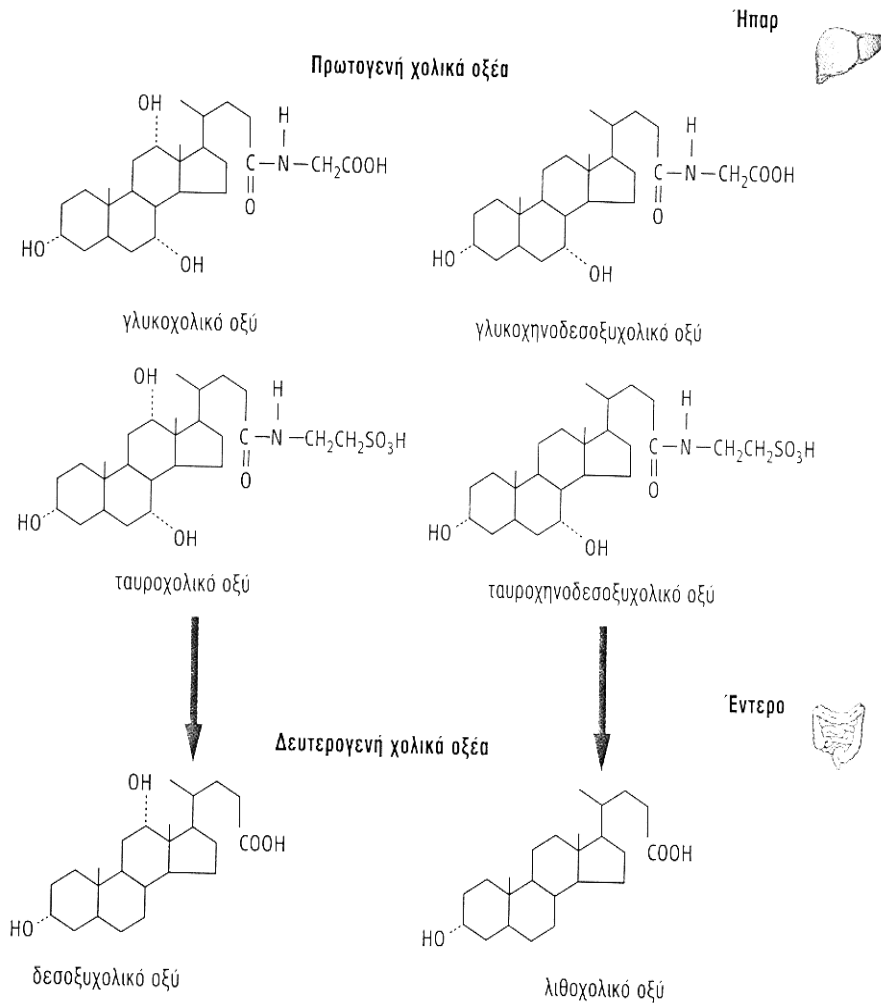
Τα χολικά οξέα αποτελούν το 50% περίπου του ξηρού βάρους της χολής. Έχουν ένα στεροειδή πυρήνα και συνθέτονται από χοληστερόλη από τα ηπατικά κύτταρα .



Σχήμα 1. Οι οδοί βιοσύνθεσης των χολικών οξέων

Τα κύρια χολικά οξέα τα οποία συντίθενται από το ήπαρ καλούνται πρωτογενή χολικά οξέα. Αυτά είναι το χολικό οξύ (3 υδροξυλομάδες) και το χηνοδεοξυχολικό οξύ (2 υδροξυλομάδες). Η παρουσία καρβοξυλομάδων και υδροξυλομάδων καθιστούν τα χολικά οξέα πολύ πιο διαλυτά από όσο είναι η χοληστερόλη από την οποία συντίθενται. Τα βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα αφυδροξυλιώνουν τα χολικά οξέα προς σχηματισμό δευτερογενών χολικών οξέων. Κυριότερα δευτερογενή χολικά οξέα είναι τα δεοξυχολικό οξύ (από αφυδροξυλίωση του χολικού οξέος) και το λιθοχολικό οξύ (από αφυδροξυλίωση του χηνοδεοξυχολικού οξέος). Η χολή περιέχει πρωτογενή αλλά και δευτερογενή χολικά οξέα.

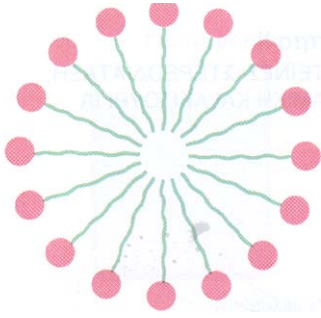
Δομή χολικών οξέων



Σχήμα 2. Δομή των χολικών οξέων

Τα πρωτογενή χολικά οξέα εκκρίνονται συνήθως συζευγμένα με γλυκίνη ή ταυρίνη. Στα συνεζευγμένα χολικά οξέα, η γλυκίνη ή η ταυρίνη είναι συνδεδεμένη με ένα πεπτιδικό δεσμό μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας ενός μη συνεζευγμένου χολικού οξέος και της γλυκίνης ή της ταυρίνης. Στο ουδέτερο σχεδόν pH του εντερικού σωλήνα, τα συζευγμένα χολικά οξέα είναι ιονισμένα σε μεγαλύτερο ποσοστό και επομένως πιο υδατοδιαλυτά από ότι τα μη συζευγμένα χολικά οξέα. Τα συζευγμένα χολικά οξέα εμφανίζονται σχεδόν όλα ως άλατα διαφόρων κατιόντων (κυρίως Na^+) και συχνά καλούνται χολικά άλατα.

Ο στεροειδής πυρήνας των χολικών οξέων είναι σχεδόν επίπεδος. Σε διάλυμα, τα χολικά οξέα έχουν όλες τις πολικές (υδρόφιλες) ομάδες –τις υδροξυλομάδες, το καρβοξυλικό τμήμα της γλυκίνης ή της ταυρίνης και τον πεπτιδικό δεσμό, στη μία επιφάνεια του μορίου. Αυτό καθιστά το μόριο του χολικού οξέος αμφιπαθές, δηλαδή έχει τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες περιοχές. Επειδή είναι αμφιπαθή, τα χολικά οξέα τείνουν να σχηματίσουν μοριακά σύμπλοκα που λέγονται μικκύλια και στα οποία η υδρόφοβη πλευρά του χολικού οξέος στρέφεται προς το εσωτερικό και μακριά από το ύδωρ και η υδρόφιλη επιφάνεια στρέφεται προς το εξωτερικό και προς το ύδωρ.



Σχήμα 3. Διάγραμμα της διατομής ενός μικκυλίου

Κάθε φορά που η συγκέντρωση των χολικών οξέων υπερβαίνει μια ορισμένη συγκέντρωση, η οποία ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, σχηματίζονται μικκύλια χολικών οξέων. Κάθε επιπρόσθετο χολικό οξύ πάνω από τη συγκέντρωση αυτή ενσωματώνεται αποκλειστικά στα μικκύλια και όχι σε μοριακό διάλυμα. Φυσιολογικά, στη χολή η συγκέντρωση χολικού οξέος είναι πολύ μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση. Οι λειτουργίες των χολικών οξέων στη γαλακτωματοποίηση των λιπών της τροφής και στο σχηματισμό μικτών μικκυλίων με τα παράγωγα της πέψης των λιπών είναι σημαντικές. Τη στιγμή που ο χυμός φτάνει στο τελικό τμήμα του ειλεού, τα λίπη της τροφής έχουν απορροφηθεί σχεδόν πλήρως. Τα χολικά οξέα απορροφούνται τότε. Συνήθως 0,5gr περίπου χολικών οξέων δεν απορροφώνται και αποβάλλονται στα κόπρανα κάθε ημέρα. Αυτή η ποσότητα αντιπροσωπεύει το 15% έως 35% της ολικής δεξαμενής χολικών οξέων και φυσιολογικά αναπληρώνεται με τη σύνθεση νέων χολικών οξέων από το ήπαρ.

Το ήπαρ είναι ένας ενδοκρινής αδένας που καταλαμβάνει το δεξί και άνω τεταρτημόριο της κοιλιακής κοιλότητας, βρίσκεται κάτω από το διάφραγμα και προστατεύεται από τις πλευρές του τοιχώματος του θώρακα. Είναι το μεγαλύτερο συμπαγές όργανο του σώματος και στους ενήλικες, έχει βάρος περίπου 1,5kg. Περίπου 75% της αιματικής ροής προς το ήπαρ παρέχεται από την πυλαία φλέβα, που προέρχεται από το έντερο. Το αίμα που εξέρχεται από το ήπαρ εισέρχεται στο φλεβικό σύστημα

μέσω της ηπατικής φλέβας. Το χοληφόρο σύστημα του ήπατος απαρτίζεται από τη χοληδόχο κύστη και τους χοληφόρους πόρους.

Το ήπαρ κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό λόγω των ανατομικών του συνδέσεων όσο και των πολλών βιοχημικών του λειτουργιών. Δέχεται φλεβικό αίμα από το έντερο και όλα τα προϊόντα της πέψης που έχουν απορροφηθεί ,διέρχονται από το ήπαρ πριν εισέλθουν στη συστηματική κυκλοφορία. Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπιδίων, στο μεταβολισμό των αμινοξέων, στη σύνθεση και στη διάσπαση των πρωτεϊνών του πλάσματος και στην αποθήκευση των βιταμινών και μετάλλων. Το ήπαρ έχει επιπλέον εκκριτική λειτουργία κατά την οποία τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού εκκρίνονται σε ένα διακλαδιζόμενο σύστημα πόρων ,που ονομάζεται χοληφόρο δένδρο ,το οποίο με τη σειρά του παροχετεύεται στο λεπτό έντερο. Τα συστατικά της χολής απεκκρίνονται στη συνέχεια με τα κόπρανα.

Η πιο σημαντική ηπατική λειτουργία για το γαστρεντερικό σωλήνα είναι η έκκριση της χολής. Η χολή, την οποία παρασκευάζουν τα ηπατικά κύτταρα, περιέχει χολικά οξέα, χοληστερόλη, λεκιθίνες και χολικές χρωστικές. Όλα αυτά τα συστατικά συντίθενται από τα ηπατικά κύτταρα και απεκκρίνονται στα χοληφόρα σωληνάκια ,μαζί με ένα ισοτονικό υγρό το οποίο μοιάζει με το πλάσμα ως προς τις συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών. Τα χοληφόρα σωληνάκια συγκλίνουν σε ακόμα μεγαλύτερους πόρους και τελικά σε ένα μόνο χοληφόρο πόρο. Τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία επενδύουν τους χοληφόρους πόρους εκκρίνουν ένα υδατικό διάλυμα το οποίο είναι πλούσιο σε διττανθρακικά και συνεισφέρει στον όγκο που παρέχεται από το ήπαρ.

Στο διάστημα μεταξύ των γευμάτων, η χολή εκχέεται στο δωδεκαδάκτυλο με συστολές και μεταφέρεται στο έντερο. Στο λεπτό έντερο, τα χολικά οξέα πρώτα γαλακτωματοποιούν τα λίπη του χυλού και μετά σχηματίζουν μικκύλια με τα προϊόντα της πέψης των λιπών. Στο τελικό άκρο του ειλεού, τα χολικά οξέα επαναρροφώνται. Τα χολικά οξέα επιστρέφουν στο ήπαρ ,με το πυλαίο αίμα. Αμέσως προσλαμβάνονται από τα ηπατικά κύτταρα και επανεκκρίνονται στη χολή. Ολόκληρη η δεξαμενή των χολικών οξέων επανακυκλοφορεί δύο ή τρεις φορές ,ως απόκριση του οργανισμού σε ένα κανονικό γεύμα. Η επανακυκλοφορία των χολικών οξέων είναι γνωστή ως εντεροηπατική κυκλοφορία. Το 20% περίπου της δεξαμενής των χολικών οξέων αποβάλλεται στα κόπρανα κάθε μέρα και αναπληρώνεται με σύνθεση νέων χολικών οξέων από το ήπαρ. Η αποβολή αυτή αποτελεί ένα συστηματικό τρόπο απομάκρυνσης προϊόντων καταβολισμού της χοληστερόλης από τον οργανισμό.

1.1.2 Απορρόφηση των χολικών οξέων και μεταβολισμός

Η απορρόφηση των λιπιδίων της τροφής είναι συνήθως πλήρης όταν φτάνει στο μέσο του εντέρου. Αντίθετα, τα χολικά οξέα απορροφούνται κατά το μεγαλύτερο μέρος στην τελική μοίρα του ειλεού. Τα χολικά οξέα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη της ψυκτροειδούς παρυφής του εντέρου είτε με ενεργητική μεταφορά είτε με απλή διάχυση. Τα συζευγμένα χολικά οξέα αποτελούν τα κύρια υποστρώματα για την ενεργό απορρόφηση. Με την αποσύζευξη και την αφυδροξυλίωσή τους τα χολικά οξέα καθίστανται λιγότερο πολικά και έτσι απορροφούνται καλύτερα με διάχυση. Τα απορροφημένα χολικά οξέα απομακρύνονται από το έντερο και εισέρχονται στο φλεβικό πυλαίο αίμα. Τα ηπατικά κύτταρα αποσπούν τα χολικά οξέα και καθαρίζουν το αίμα από αυτά σε μία μόνο διέλευσή τους από το ήπαρ. Στα ηπατικά κύτταρα, τα περισσότερα αποσυζευγμένα χολικά οξέα επανασυζευγνύονται με γλυκίνη ή ταυρίνη και ορισμένα από τα δευτερογενή αυτά χολικά οξέα επανυδροξυλιώνονται. Τα ανακατεργασμένα χολικά οξέα, μαζί με τα νεοσυντεθειμένα χολικά οξέα, εκκρίνονται στη χολή.

1.1.3 Έλεγχος της σύνθεσης και της έκκρισης χολικών οξέων

Ο ρυθμός επιστροφής των χολικών οξέων στο ήπαρ επηρεάζει το ρυθμό της σύνθεσης και της έκκρισης τους. Τα χολικά οξέα στο φλεβικό πυλαίο αίμα διεγείρουν την πρόσληψη και την επανέκκριση τους από τα ηπατικά κύτταρα. Η διεργασία αυτή ονομάζεται χολαιρετική δράση των χολικών οξέων και οι ουσίες που επιτείνουν την έκκριση χολικών οξέων καλούνται χολαιρετικά. Τα ερεθίσματα έκκρισης των επανερχόμενων χολικών οξέων είναι τόσο ισχυρά ώστε ολόκληρη η δεξαμενή των χολικών οξέων επανακυκλοφορεί δύο φορές ως απόκριση σε ένα κανονικό γεύμα. Ως απόκριση σε ένα γεύμα με πολύ αυξημένο περιεχόμενο λίπους, η δεξαμενή των χολικών οξέων είναι δυνατόν να επανακυκλοφορήσει 5 και πλέον φορές.

Το ήπαρ αποτελεί την κύρια πηγή σύνθεσης και καταβολισμού της χοληστερόλης. Η οδός χηνοδεοξυχολικού/λιθοχολικού οξέος είναι η κύρια οδός απέκκρισης της χοληστερόλης και κατά συνέπεια ο ρυθμός παραγωγής των χολικών οξέων από τη χοληστερόλη μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στο πλάσμα. Με την αύξηση του ρυθμού σύνθεσης των χολικών οξέων μειώνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της χοληστερόλης,

αυξάνονται οι υποδοχείς των LDL στις μεμβράνες των ηπατοκυττάρων και κατά συνέπεια αυξάνεται η κάθαρση της LDL από το πλάσμα.

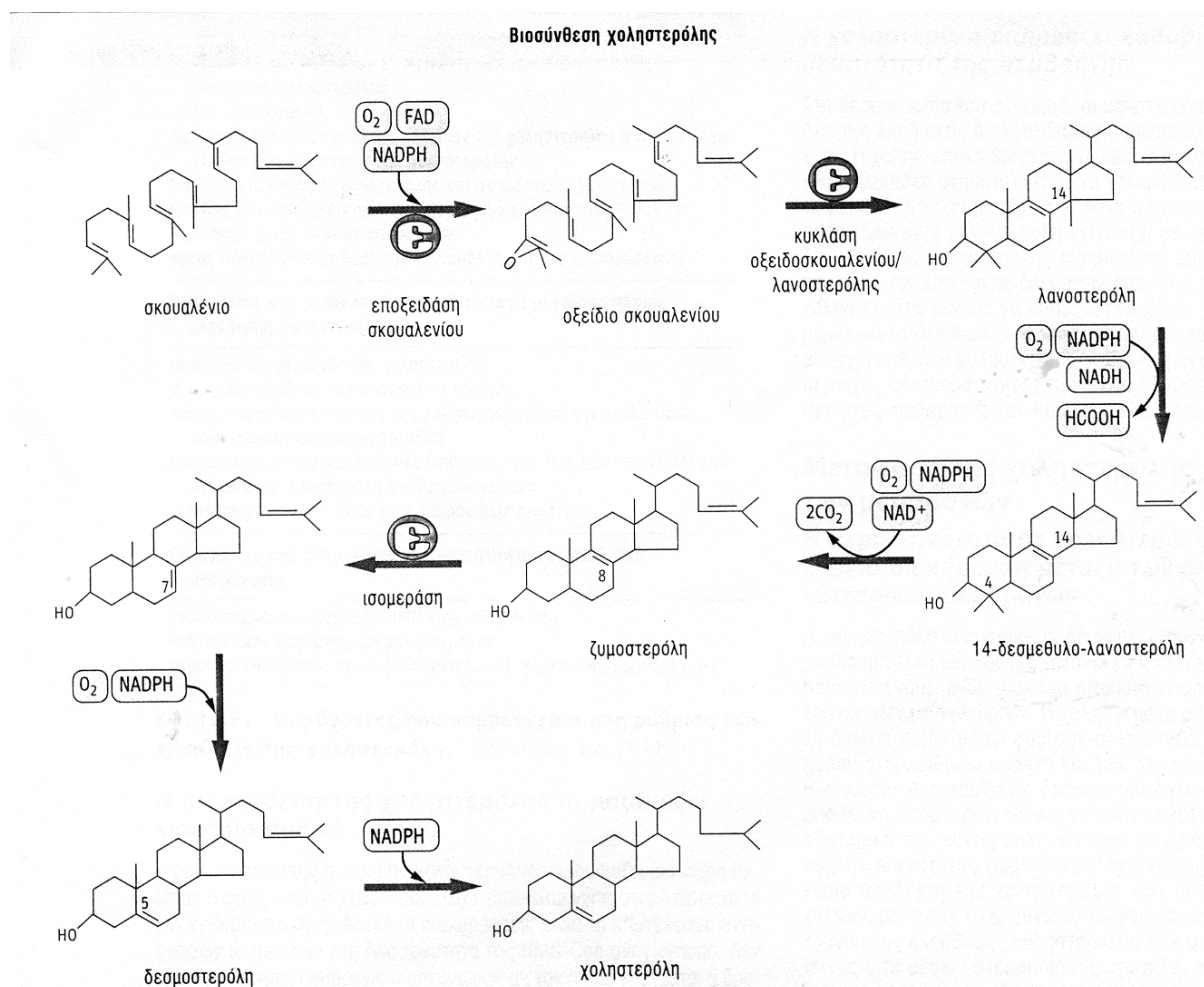
1.2 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

Η χοληστερόλη είναι ένα λιπίδιο που αποτελεί απαραίτητο συστατικό κυτταρικής μεμβράνης των θηλαστικών. Είναι πρόδρομη ένωση από την οποία συντίθενται τρεις σημαντικές κατηγορίες βιολογικά δραστικών ενώσεων: τα χολικά οξέα, οι στεροειδείς ορμόνες και η βιταμίνη D. Η χοληστερόλη έχει μοριακό βάρος 386Da και περιλαμβάνει 27 άτομα άνθρακα.

1.2.1 Η βιοσύνθεση της χοληστερόλης

Πρακτικά όλα τα κύτταρα του ανθρώπου έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη. Από ποσοτικής πλευράς ωστόσο, το ήπαρ αποτελεί την κύρια θέση βιοσύνθεσης χοληστερόλης, ενώ σημαντική είναι η συμβολή του εντέρου και του φλοιού των επινεφριδίων. Για τη δημιουργία των πολλών αυτών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα ή μεταξύ ατόμων άνθρακα και ατόμων υδρογόνου απαιτείται μια πηγή ατόμων άνθρακα, μια πηγή αναγωγικής δύναμης και βέβαια δαπάνη σημαντικών ποσών ενέργειας. Το ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) αποτελεί ένα υψηλής ενέργειας εναρκτήριο μόριο. Προέρχεται από διάφορες πηγές, που περιλαμβάνουν τη β-οξείδωση των μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων, την αφυδρογόνωση του πυροσταφυλικού οξέος και την οξείδωση των κετογόνων αμινοξέων όπως είναι η λευκίνη και η ισολευκίνη. Η ενέργεια παρέχεται από το αναγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-δινουκλεοτίδιο (NADPH) που παράγεται από ένζυμο της οδού της φωσφορικής πεντόζης. Η διάσπαση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) παρέχει επιπρόσθετη ενέργεια. Όλες οι αντιδράσεις αυτές της βιοσυνθετικής οδού γίνονται στο κυτταρόπλασμα, αν και μερικά από τα απαραίτητα ένζυμα είναι συνδεδεμένα με τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ρύθμιση της δραστηριότητας οποιασδήποτε μεταβολικής οδού επιτυγχάνεται συνήθως με τροποποίηση της δραστηριότητας ενός συγκεκριμένου ενζύμου, που χαρακτηρίζεται ως καθοριστικό για την ταχύτητα της οδού ένζυμο. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης γίνεται σε σχετικά πρώιμο στάδιο της συνολικής διαδικασίας με ένζυμο που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμά του ένα μόριο με έξι άτομα άνθρακα. Η αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA (HMG-CoA αναγωγή) είναι το καθοριστικό για την ταχύτητα της οδού ένζυμο, που καταλύει τη δεσμευμένη αντίδραση

η οποία καταλήγει στη σύνθεση μεβλονικού οξέος. Η σύνθεση της HMG-CoA αναγωγάσης στο ήπαρ διεγείρεται κατά τη νηστεία και αναστέλλεται από τη διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης. Η δραστηριότητα της HMG-CoA αναγωγάσης ρυθμίζεται με ομοιοπολική τροποποίηση που επάγεται με μηχανισμό ανατροφοδότησης (feed-back) από την ίδια τη χοληστερόλη και από διάφορες ορμόνες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό.



Σχήμα 4. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης

Το σκουαλένιο είναι ένα γραμμικό μόριο που μπορεί να αναδιπλώνεται ώστε να σχηματίσει δακτύλιο. Η συνθάση του σκουαλενίου είναι ένα πολύπλοκο ένζυμο που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και διευκολύνει τη συμπύκνωση δύο μορίων πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου στα πυροφωσφορικά τους άκρα. Μεσολαβούν αρκετά ενδιάμεσα προϊόντα, με τελικό προϊόν το σκουαλένιο, ένα υδρογονάνθρακα με 30 άτομα και 6 διπλούς δεσμούς που επιτρέπουν την αναδίπλωση του μορίου ώστε να σχηματίζεται ένας δακτύλιος που μοιάζει με τον πυρήνα των στεροειδών.

Τα τελικά στάδια της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης γίνονται σε μια πρωτεΐνη – φορέα. Το σκουαλένιο, η λανοστερόλη και όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα της οδού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης είναι υδρόφοβα μόρια. Παρ' όλα αυτά, οι τελευταίες αντιδράσεις της οδού γίνονται σε υδατικό μέσο, επειδή τα ενδιάμεσα προϊόντα από το σκουαλένιο και μετά αντιδρούν ενώ παραμένουν συνδεδεμένα την πρωτεΐνη φορέα.

1.2.2 Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης

Πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στη διεργασία της ρύθμισης της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στη διαιτητική πρόσληψη και το ρυθμό βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Αυτή η σχέση διασφαλίζει μια σχετικά σταθερή ημερήσια παροχή χοληστερόλης στον οργανισμό, αλλά εξηγεί ταυτόχρονα γιατί ο περιορισμός της διαιτητικής πρόσληψης μπορεί να επιφέρει μείωση της τάξης του 15% μόνο στη συγκέντρωση της κυκλοφορούσας χοληστερόλης.

Αμέσως μετά την απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο, μεταφέρεται στο ήπαρ με τη μορφή χυλομικρών. Ταυτόχρονα, η δεξαμενή της χοληστερόλης μεταφέρεται στο πλάσμα ως συστατικό διαφόρων λιποπρωτεϊνών. Η χοληστερόλη που βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή μέσα στα ηπατοκύτταρα μπορεί να προέρχεται από διάφορες δεξαμενές.

- Από de novo σύνθεση στα κύτταρα
- Από τους αποθηκευμένους ενδοκυττάριους εστέρες της χοληστερόλης με υδρόλυση
- Από τα υπολείμματα των χυλομικρών που συνδέονται με την πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον υποδοχέα της LDL(LRP) και επιτρέπουν έτσι την είσοδο στο κύτταρο χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης.
- Είσοδο χοληστερόλης στα κύτταρα μέσω της οδού που διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα των LDL. Οι LDL συνδέονται με τον ειδικό για αυτές υποδοχέα στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και εισέρχονται έτσι μέσα στα κύτταρα με τη

μορφή των επενδυμένων με κλαθρίνη κυστιδίων. Αυτά τα κυστίδια υφίστανται κάποια τροποποίηση πριν δράσουν επάνω τους τα λυσοσωματικά ένζυμα που διαχωρίζουν την LDL από τον υποδοχέα της. Τα ένζυμα αυτά αποσπών τη χοληστερόλη από τις απολιποπρωτεΐνες με τις οποίες συνδέεται και υδρολύουν τους εστέρες της χοληστερόλης προς ελεύθερη χοληστερόλη.

- Κάποια ποσότητα ελεύθερης χοληστερόλης από τις εξωκυττάριας LDL μπορεί να εισέλθει κατευθείαν στα κύτταρα.

Η HMG-CoA αναγωγή είναι το βασικό ρυθμιστικό ένζυμο για τη σύνθεση της χοληστερόλης. Η σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας ελεύθερης χοληστερόλης ενεργοποιεί 4 οδούς ρύθμισης.

- Προκαλεί μείωση τόσο της δραστηριότητας όσο και του ρυθμού σύνθεσης της HMG-CoA αναγωγής, περιορίζοντας έτσι την περαιτέρω σύνθεση χοληστερόλης. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν έχει διευκρινιστεί, αλλά πιθανόν να περιλαμβάνει την οξυγόνωση της χοληστερόλης προς πιο ισχυρούς ενζυμικούς αναστολείς. Όταν ο οργανισμός χρειάζεται χοληστερόλη, το ποσό του mRNA για τον υποδοχέα της LDL αυξάνει, και περισσότερος υποδοχέας βρίσκεται πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Η κατάσταση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με αναστολή της εντερικής απορρόφησης των χολικών αλάτων και με παρεμπόδιση της σύνθεσης χοληστερόλης
- Οδηγεί σε απευαισθητοποίηση των υποδοχέων των LDL, περιορίζοντας έτσι την οδό εισόδου της χοληστερόλης στα κύτταρα μέσω αυτών των υποδοχέων.
- Αυξάνεται ο ρυθμός της ενδοκυττάριας εστεροποίησης της ελεύθερης χοληστερόλης προς εστέρες χοληστερόλης.
- Η χοληστερόλη διέρχεται μέσα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνδέεται με τις HDL, διεργασία που προέρχεται από τη λεκιθίνη/χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση.

Παράγοντες που συμμετέχουν στη ρύθμιση των επιπέδων της χοληστερόλης

- De novo βιοσύνθεση
- Υδρόλυση των ενδοκυττάριας εστέρων της χοληστερόλης από το ένζυμο υδρολάση των εστέρων της χοληστερόλης.
- Διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης και σχηματισμός χυλομικρών

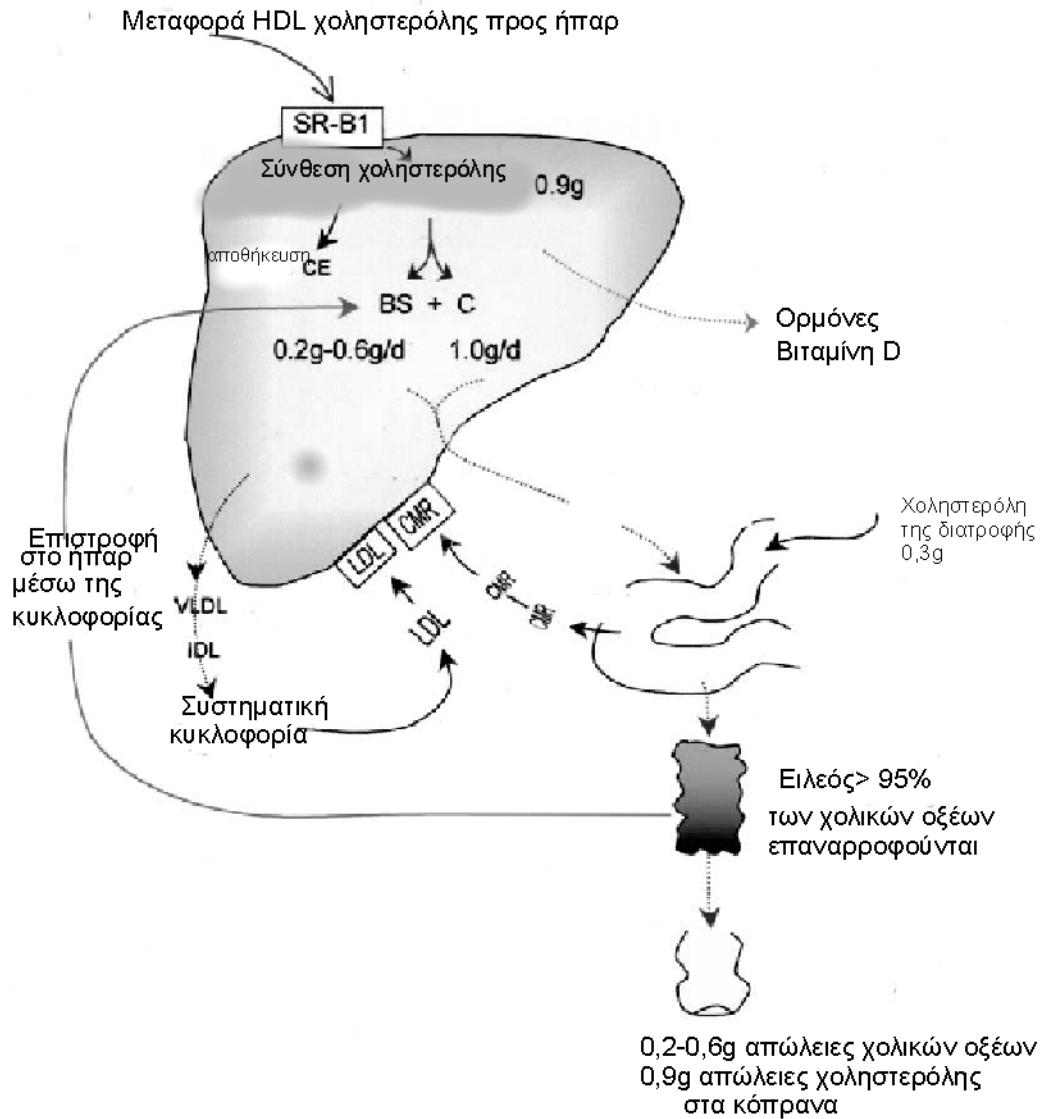
- Είσοδος των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν χοληστερόλη στα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων
- Άμεση πρόσληψη ελεύθερης χοληστερόλης από τις λιποπρωτεΐνες

Παράγοντες που μειώνουν τη συγκέντρωση της ενδοκυττάριας ελεύθερης χοληστερόλης

- Αναστολή της βιοσύνθεσης χοληστερόλης
- Απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της LDL
- Ενδοκυττάρια εστεροποίηση της χοληστερόλης από την ακυλο-CoA/χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση
- Ενσωμάτωση χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες HDL που προάγεται από τη λεκιθίνη /χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση
- Μετατροπή σε χολικά οξέα ή σε στεροειδείς ορμόνες

Παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της HMG-CoA αναγωγής

- Ενδοκυττάρια συγκέντρωση HMG-CoA αναγωγής
- Ενδοκυττάρια συγκέντρωση χοληστερόλης
- Ορμόνες : ινσουλίνη, τρι-ιωδοθυρονίνη, γλυκαγόνη, κορτιζόλη



Σχήμα 5. Η τύχη της χοληστερόλης και των χολικών αλάτων στο πεπτικό σύστημα

1.3 ΔΙΠΗΔΙΑ

Τα κύρια λιπίδια του αίματος είναι η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια. Τα λιπίδια κυκλοφορούν στο αίμα χάρη στη σύνδεσή τους με πρωτεϊνικά μόρια τα οποία ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες (apo). Η ένωση του λιπιδικού με το πρωτεϊνικό τμήμα αποτελεί τη λιποπρωτεΐνη. Χαρακτηριστικά, οι λιποπρωτεΐνες αποτελούνται από ένα κεντρικό πυρήνα που περιέχει εστεροποιημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια και ένα περιφερικό δακτύλιο αποτελούμενο από συνάθροιση αποπρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων και ελεύθερης χοληστερόλης.

Οι λιποπρωτεΐνες διακρίνονται σε 4 μεγάλες κατηγορίες: Τα χυλομικρά, οι VLDL (πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή προ-β-λιποπρωτεΐνες), οι LDL (χαμηλής

πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή β-λιποπρωτεΐνες) και οι HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή α-λιποπρωτεΐνες). Η μέτρηση της ολικής χοληστερόλης στον ορό δείχνει την ελεύθερη και την εστεροποιημένη χοληστερόλη που βρίσκονται σε κάθε μία λιποπρωτεΐνη. Το ίδιο ισχύει για τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια.

1.4 ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- A. Λιποπρωτεΐνες που μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια.
- Τα χυλομικρά: Είναι ευμεγέθη μόρια, αποτελούμενα κατά 85-95% από αμιγή τριγλυκερίδια. Συντίθενται στο έντερο μέσω της apo B48, η οποία παράγεται τοπικά. Στην κυκλοφορία τα χυλομικρά εμπλουτίζονται ταχέως και με άλλες απολιποπρωτεΐνες, όπως apo E και apo C (CI, CII, CIII). Ο ρόλος τους είναι να μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια της τροφής μετά το γεύμα από το έντερο προς τους περιφερικούς ιστούς και το ήπαρ. Τα χυλομικρά μεταβολίζονται σε 2 στάδια: α) Με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μέσω του ειδικού ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Το ένζυμο αυτό επιτρέπει την αποθήκευση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό. β) Με την πρόσληψη των προϊόντων διάσπασης των χυλομικρών, που καλούνται υπολειπόμενα σωματιδίων ("remnants"), από το ήπαρ, πιθανώς μέσω ενός ειδικού υποδοχέα
- VLDL: Είναι μεγάλα μόρια που αποτελούνται κατά 80-90% από λιπίδια (4/5 από τριγλυκερίδια και 1/5 από χοληστερόλη. Παράγονται από το ήπαρ και είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά των ενδογενών τριγλυκεριδίων. Η παραγωγή τους διεγείρεται από την αυξημένη προσφορά ελεύθερων λιπαρών οξέων (E.A.O.) στα ηπατοκύτταρα. Περιέχουν apoB100, apoE και apoC. Καταβολίζονται όπως τα χυλομικρά, σε ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL) μέσω του ενζύμου LPL. Οι IDL καταβολίζονται γρήγορα και σε φυσιολογικές συνθήκες απουσιάζουν από την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών
- B. Λιποπρωτεΐνες που μεταφέρουν τη χοληστερόλη.
- LDL: Είναι μόρια μεσαίου μεγέθους, πλούσια σε χοληστερόλη (50%) και πρωτεΐνη (25%) κυρίως αποπρωτεΐνη Β. Οι LDL αποτελούν, κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους, τα προϊόντα καταβολισμού των VLDL. Το 75% του καταβολισμού των LDL γίνεται μέσω των ειδικών LDL υποδοχέων ενώ άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν καταβολισμό από μη ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς ("scavenger" receptors). Αποτελούν σημαντική πηγή χοληστερόλης για τις

ανάγκες της στερεοειδογένεσης των ιστών, ενώ η αύξησή τους στο αίμα προκαλεί αθηρωμάτωση.

- **HDL**: Αποτελούν μόρια μικρής μοριακής μάζας, πλούσια σε αποπρωτεΐνες (κυρίως A1 και A2), φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από τους ιστούς προς το ήπαρ. Οι apoA αποτελούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν, όχι μόνο δομικά αλλά και λειτουργικά, στο μεταβολισμό των HDL. Οι HDL παράγονται και 'φορτώνονται' με λιπίδια είτε απευθείας από το ήπαρ και το έντερο είτε έμμεσα κατόπιν μεταφοράς λιπιδίων και αποπρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης των χυλομικρών και VLDL.

Ανάλογα με το βαθμό "ωρίμανσης" των HDL διακρίνουμε τις πρωτογενείς ("nascent") HDL, τις HDL3 και τις HDL2. Οι HDL2, πλούσιες σε apoA1, μεταφέρουν μεγαλύτερες ποσότητες εστεροποιημένης χοληστερόλης και είναι οι κατ'εξοχήν αντιαθηρωγόνες λιποπρωτεΐνες. Ο καταβολισμός των HDL δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος.

- **Λιποπρωτεΐνη (α) LP(α)**

Είναι μια λιποπρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει φυσικοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με την LDL αλλά περιέχει επιπλέον μια ειδική γλυκοπρωτεΐνη, την αποπρωτεΐνη (α). Η αποπρωτεΐνη (α) έχει 6 ισόμορφα, τα οποία καθορίζονται γενετικά, ενώ η δομή της εμφανίζει ισχυρή ομολογία με το μόριο του πλασμινογόνου. Ο φυσιολογικός ρόλος της λιποπρωτεΐνης (α) δεν έχει διευκρινισθεί, όμως φαίνεται να συμμετέχει στην επούλωση των τραυμάτων με την παροχή χοληστερόλης για τη σύνθεση μεμβρανών και την προαγωγή της αγγειογένεσης τοπικά. Είναι πιθανό ότι η αυξημένη LP(α) αποτελεί παράγοντα αγγειακού κινδύνου διότι κατά το 1/3 καταβολίζεται από τους μη ειδικούς υποδοχείς ("scavenger receptors") και οξειδώνεται. Η έκφραση της LP(α) καθορίζεται γενετικά έλεγχο και αξίζει να τονισθεί ότι τα επίπεδά της δεν επηρεάζονται από τη συμβατική διαιτητική θεραπεία.

1.4.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Χυλομικρά

Τα χυλομικρά συντίθενται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και η σύστασή τους περιλαμβάνει κατά πρώτο λόγο (95%) τα τριγλυκερίδια της τροφής και κατά δεύτερο (2%) τη χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια. Το πρωτεϊνικό τμήμα των χυλομικρών (κυρίως apoB48) σχηματίζεται στα εντερικά κύτταρα. Τα σχηματισμένα χυλομικρά διαπερνούν τη βασική μεμβράνη, εισέρχονται στα λεμφικά αγγεία (θωρακικός πόρος) και στη συνέχεια κυκλοφορούν στο αίμα όπου εμπλουτίζονται από πρωτεΐνες μέσω μεταφοράς από τις HDL (apo C και apoE). Η παραμονή τους στην κυκλοφορία διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα. Ο καταβολισμός των χυλομικρών συνεπάγεται ταχεία παροχή τριγλυκεριδίων, δηλαδή ενέργειας, στους ιστούς. Όλοι οι ιστοί, πλην του εγκεφάλου, διαθέτουν λιποπρωτεϊνική λιπάση και κατά συνέπεια μπορούν να προσλαμβάνουν τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών. Περίπου 80% των εξωγενών τριγλυκεριδίων προσλαμβάνονται από το λιπώδη και το μυϊκό ιστό και 20% από τους άλλους ιστούς. Η προοδευτική "απολιπιδίωση" των χυλομικρών οδηγεί στο σχηματισμό των υπολειπόμενων σωματιδίων (remnants), τα οποία είναι σωματίδια εμπλουτισμένα σε εστεροποιημένη χοληστερόλη και apoB. Αυτά, λόγω της σύστασής τους καταβολίζονται ευκολότερα απ' ό,τι τα χυλομικρά, μέσω του ήπατος από τους LRP υποδοχείς.

2. Ο μεταβολισμός των VLDL

Οι VLDL μεταφέρουν τα ενδογενή τριγλυκερίδια προς τους ιστούς, αλλά σε αντίθεση με τα χυλομικρά που καταβολίζονται άμεσα, αυτές μετατρέπονται κυρίως σε LDL. Αρχικά, οι VLDL υδρολύονται από την LPL, απελευθερώνοντας τριγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα και το παραμένον μόριο αποτελεί τα υπολειπόμενα σωματίδια των VLDL (IDL). Κατά τη μετατροπή αυτή συμβαίνουν σημαντικές ανακατανομές λιπιδίων οι οποίες επηρεάζουν όλες τις λιποπρωτεΐνες. Τα μόρια VLDL, χάνοντας μέρος των τριγλυκεριδίων μέσω της LPL, ελαττώνονται σε μέγεθος και σταδιακά αποδίδουν τα λιπίδια της επιφάνειάς τους (κυρίως φωσφολιπίδια) για το σχηματισμό των πρωτογενών ("nascent") HDL. Ταυτόχρονα, μεταφέρονται τριγλυκερίδια από τις VLDL προς τις HDL ενώ μεταφέρεται χοληστερόλη από τις HDL προς τις VLDL. Οι ανταλλαγές αυτές γίνονται μέσω ενός ενζύμου του Μεταφορέα του Εστέρα της Χοληστερόλης (CETP).

Αποτέλεσμα των ανταλλαγών αυτών είναι ο σχηματισμός των IDL, οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη, apoB και apoE. Μέρος των IDL χάνεται μέσω των υποδοχέων LRP, ενώ το υπόλοιπο μετατρέπεται σε LDL μέσω της ηπατικής λιπάσης. Συνολικά, το 50% περίπου των VLDL μετατρέπεται τελικά σε LDL.

3. Ο μεταβολισμός των LDL

Η παραγωγή των LDL γίνεται είτε απευθείας από το ήπαρ, είτε μέσω καταβολισμού από τις VLDL, όπως προαναφέρθηκε. Στην τελευταία αυτή μετατροπή ο ρόλος της ηπατικής λιπάσης είναι σημαντικός. Η παραγωγή των LDL από τις VLDL υπόκειται σε πολύπλοκη ρύθμιση όπου έχουμε ανασχηματισμό των μορίων μέσω ανταλλαγών λιπιδίων. Το μέγεθος και η πυκνότητα των VLDL προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα των LDL. Για παράδειγμα, οι μεγάλες VLDL "απολιπιδιώνονται" σε μεγάλο βαθμό μέσω της Ηπατικής Λιπάσης (HL) και οι σχηματιζόμενες LDL είναι μικρές σε μέγεθος και πυκνές.

Ο φυσιολογικός καταβολισμός των LDL γίνεται μέσω των ειδικών LDL υποδοχέων, σε ποσοστό 75%. Το ήμισυ του καταβολισμού αυτού γίνεται μέσω του ήπατος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης γενικότερα. Σε ένα 25% οι LDL καταβιβάζονται μέσω των ειδικών υποδοχέων οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στα μακροφάγα και ονομάζονται 'καθαριστές' (scavenger) υποδοχείς. Οι πληθυσμοί της LDL που καταβιβάζονται μέσω αυτών των υποδοχέων είναι πιο επιρρεπείς σε οξειδωση και κατά συνέπεια σε πρόκληση αθηρωμάτωσης. Οι μικρές - πυκνές LDL ακολουθούν το μεταβολικό αυτό δρόμο γι' αυτό θεωρούνται αθηρωγόνες. Η σύνδεση των LDL στους υποδοχείς γίνεται μέσω της apoB και apoE. η τελευταία όμως συνδέεται πιο έντονα στον υποδοχέα. Συνολικά υπάρχουν περί τους 100.000 υποδοχείς.

Η χοληστερόλη που απελευθερώνεται μέσα στο κύτταρο μετά τη σύνδεση των LDL με τον υποδοχέα, ασκεί αρνητική ρυθμιστική δράση που έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή συσσώρευσης χοληστερόλης. Η δράση αυτή ασκείται στο ένζυμο υδροξυ-μεθυλ- συνένζυμο Α (HMG-CoA) αναγωγάση, το οποίο είναι το ένζυμο-κλειδί της ενδοκυττάριας σύνθεσης χοληστερόλης. Επίσης, η ενδοκυττάρια χοληστερόλη αναστέλλει τη σύνθεση των υποδοχέων LDL οπότε ελαττώνεται η είσοδος της χοληστερόλης. Το σύστημα αυτό συντονίζει τη σχέση ενδογενούς- εξωγενούς χοληστερόλης ώστε να υπάρχει σταθερή διαθεσιμότητα χοληστερόλης στο κύτταρο. Σε ορισμένους ιστούς όπου η ανάγκη για χοληστερόλη είναι ιδιαίτερα σημαντική όπως στα

επινεφρίδια, ο αριθμός των LDL υποδοχέων είναι μεγάλος. Η μερική ή πλήρης έλλειψη των υποδοχέων LDL όπως και η παρουσία 'ελαττωματικών' υποδοχέων είναι υπεύθυνες για τη λεγόμενη οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία.

4. Ο μεταβολισμός των HDL (και το σύστημα της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης)

Αρχικά, οι HDL παράγονται, κυρίως από το ήπαρ και το έντερο, ως "πρωτογενείς" HDL και έχουν μορφή δισκοειδών μορίων. Οι HDL αυτές είναι οι αρχικοί αποδέκτες της περίσσειας ελεύθερης χοληστερόλης από την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης την οποία μεταφέρουν προς το ήπαρ. Αυτή η ελεύθερη χοληστερόλη εστεροποιείται από το ένζυμο Λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλοτρανσφεράση (LCAT), εισέρχεται στον πυρήνα της λιποπρωτεΐνης και σταδιακά οι δισκοειδείς πρωτογενείς HDL μετατρέπονται σε σφαιρικές HDL (HDL3). Η διαδικασία αυτή συνεχιζόμενη οδηγεί σε προοδευτική αύξηση των μορίων HDL, τα οποία εμπλουτιζόμενα σε χοληστερόλη μετατρέπονται τελικά σε HDL2. Οι HDL2 θεωρούνται κατ' εξοχήν αντιαθηρωγόνες λιποπρωτεΐνες διότι αποδομούν μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης προς το ήπαρ.

Εκτός της απευθείας μεταφοράς χοληστερόλης προς το ήπαρ, οι HDL χρησιμεύουν στην ανακατανομή λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών. Μέσω της πρωτεΐνης 'Μεταφορέα του εστέρα της χοληστερόλης' (CETP), εστέρες χοληστερόλης μεταφέρονται από τις HDL2 προς VLDL, IDL και υπολειπόμενα σωματίδια (remnants) και στη συνέχεια η χοληστερόλη αυτή καταβολίζεται μέσω των ανάλογων υποδοχέων. Ταυτόχρονα, η CETP μεταφέρει τριγλυκερίδια προς τις HDL2. Οι σχηματιζόμενοι HDL2 εμπλουτίζονται σε τριγλυκερίδια τα οποία υδρολύονται από την ηπατική λιπάση η οποία κατ' αυτόν τον τρόπο μετατρέπει τις HDL2 σε HDL3. Οι HDL3 αποτελούν αποδέκτες χοληστερόλης και το αποτέλεσμα είναι να επαναλαμβάνεται συνεχώς ο κύκλος HDL2-HDL3. Οι παραπάνω μηχανισμοί αποτελούν το σύστημα της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης, το οποίο είναι κατ' εξοχήν αντιαθηρωγόνο, διότι απομακρύνει τη χοληστερόλη από το αρτηριακό τοίχωμα.

Ο καταβολισμός των HDL δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Τα κύρια όργανα που προσλαμβάνουν και μεταβολίζουν τις HDL είναι το ήπαρ, τα επινεφρίδια, οι όρχεις

και οι ωσθήκες. Αξίζει να τονισθεί ότι οι HDL προσφέρουν μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης για στεροειδογένεση απ' ότι οι LDL. Πρόσφατα, απομονώθηκε ο 'καθαριστής'(scavenger) υποδοχέας SR-BI ο οποίος εκφράζεται στα όργανα καταβολισμού των HDL. Η HDL συνδεόμενη στον υποδοχέα αυτόν δεν αποδομείται, αλλά απλώς μεταφέρει χοληστερόλη προς τα κύτταρα στόχους.

1.4.2 ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Αποτελούν το πρωτεϊνικό τμήμα της λιποπρωτεΐνης. Εκτός του δομικού ρόλου χρησιμεύουν στην αναγνώριση των λιποπρωτεϊνών από τον υποδοχέα και ως ενεργοποιητές ή αναστολείς ενζύμων. Οι κύριες αποπρωτεΐνες είναι η apoA1, apoB, apoCII και apoE.

ApoA1: Συντίθεται στο ήπαρ και το έντερο και η παραγωγή της διεγείρεται από τα οιστρογόνα. Η apoA1 ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT το οποίο επιτρέπει την εστεροποίηση της χοληστερόλης εντός των HDL. Απαντάται κυρίως στις πρωτογενείς HDL και στις HDL2 και παίζει ουσιώδη ρόλο στην ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Είναι η κατ' εξοχήν αντιαθηρωγόνος απολιποπρωτεΐνη. Το υπεύθυνο γονίδιο της σύνθεσής της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11.

Apo B: Αποτελείται από την apo B48 (χυλομικρά) και apoB100 (VLDL, IDL, LDL). Η apo B48 συντίθεται στο έντερο ενώ η apo B100 στο ήπαρ. Αυτή η τελευταία είναι απαραίτητη για την ηπατική σύνθεση των VLDL ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται αναλλοίωτη στις VLDL, IDL και LDL. Η apo B100 αποτελεί το 90% των αποπρωτεϊνών των LDL και γι' αυτό υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ LDL και apoB. Αναγνωρίζεται από τον ειδικό υποδοχέα B-E ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνη για τον καταβολισμό των LDL. Το γονίδιο της apoB βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2.

Apo CII: Ανήκει στην κατηγορία των apoC η οποία περιλαμβάνει 3 ισοπρωτεΐνες (CI, CII, CIII). Κύρια δράση της apo CII είναι η διέγερση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Επί απουσίας της παρατηρείται το σύνδρομο υπερχυλομικροναϊμίας. Το υπεύθυνο γονίδιο της apo CII βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19.

Απο Ε: Κυκλοφορεί σε 3 ισόμορφα (E2, E3, E4) που διαφέρουν ανάλογα με την παρουσία κυστεΐνης ή αργινίνης στις θέσεις 112 και 152. Τα ισόμορφα αυτά καθορίζονται γενετικά από ένα σύστημα 3 αλληλόμορφων γονιδίων που βρίσκονται στον ίδιο επίτοπο. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτουν 6 διαφορετικοί φαινότυποι, 3 ομοζυγώτες (E2-E2, E3-E3, E4-E4) και 3 ετεροζυγώτες (E3-E2, E4-E3, E4-E2). Η σύνδεση των ισόμορφων με τον υποδοχέα Β-Ε ποικίλλει. Τα ισόμορφα E3 και E4 συνδέονται φυσιολογικά ενώ η σύνδεση του E2 μειονεκτεί. Η διαταραγμένη αυτή σύνδεση προκαλεί τη διαταραχή του καταβολισμού κυρίως των IDL και κατά συνέπεια τα άτομα με φαινότυπο E2/E2 έχουν προδιάθεση για εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας.

Πίνακας 1. Οι αποπρωτεΐνες και οι κύριες λειτουργίες τους.

| Απολιποπρωτεΐνη | Κύρια λιποπρωτεΐνη | Κύρια λειτουργία |
|------------------------|---------------------------|---|
| ApoAI | HDL | Δομική πρωτεΐνη των HDL Ενεργοποίηση της LCAT |
| ApoAII | HDL | Δομική πρωτεΐνη των HDL Ενεργοποίηση ηπατικής λιπάσης |
| ApoAIV | HDL, χυλομικρά | Ενεργοποίηση LPL και LCAT |
| ApoB100 | VLDL, IDL, LDL | Δομική πρωτεΐνη των VLDL, LDL Σύνδεση με LDL υποδοχείς |
| ApoB48 | Χυλομικρά, remnants | Δομική πρωτεΐνη χυλομικρών |
| ApoCII | Χυλομικρά, VLDL | Κύριο συνένζυμο για LPL |
| ApoCIII | Χυλομικρά, VLDL, HDL | Αναστολέας σύνδεσης στους LDL υποδοχείς |
| ApoE | Remnants, VLDL, LDL, HDL | Σύνδεση με LDL υποδοχέα, σύνδεση με υποδοχέα LRP |
| Apo(α) | LP(α) | Δομική πρωτεΐνη για LP(α) Αναστολέας της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου |

1.4.3 ΤΑ ENZYMA

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση

Είναι το ένζυμο κλειδί της κατανομής τριγλυκεριδίων στους ιστούς. Υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και των VLDL, τις οποίες μετατρέπει σε υπολειπόμενα σωματίδια, απελευθερώνοντας μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η πλήρης έλλειψη του ενζύμου δημιουργεί υπερχυλομικροναϊμία, ενώ μερική έλλειψη προκαλεί μικτή υπερλιπιδαιμία ή υπετριγλυκεριδαιμία. Παρουσιάζει μεγάλη δομική ομολογία με την ηπατική και παγκρεατική λιπάση όχι όμως και με την ορμονοευαίσθητη λιπάση του λιπώδους ιστού, της οποίας ο ρόλος είναι να ελευθερώνει λιπαρά οξέα μόνο από τα λιποκύτταρα. Η LPL βρίσκεται σε όλους τους ιστούς, πλην του εγκεφάλου, έχει βραχεία ημίσεια ζωή και χρησιμοποιεί ως συνένζυμο την apo CII.

Η ρύθμιση της LPL διαφέρει ανάλογα με τον ιστό που τη χρησιμοποιεί και την εκάστοτε διατροφική κατάσταση. Κατά τη διάρκεια της νηστείας, παρατηρείται αυξημένη LPL των μυών και χαμηλή του λιπώδους ιστού έτσι ώστε τα τριγλυκερίδια να κατευθύνονται προς τους μύες, οι οποίοι τα χρησιμοποιούν ως καύσιμο. Κατά τη μεταγευματική περίοδο όπου δεν υπάρχει άμεση ενεργειακή ανάγκη, αυξάνει η LPL του λιπώδους ιστού με σκοπό την αποθήκευση των τριγλυκεριδίων της τροφής. Η ινσουλίνη είναι η ορμόνη που κυρίως ρυθμίζει (αυξάνει) τη δράση της LPL ενώ παράγοντες που αναστέλλουν τη δράση της είναι ο 'Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων' (tumor necrosis factor ή TNF), η ιντερλευκίνη 1 (IL1) και η apoCII. Η LPL απελευθερώνεται από τα τριχοειδή των αγγείων στο πλάσμα με την επίδραση της ηπαρίνης.

Η ηπατική λιπάση (HL)

Παράγεται και δρα κυρίως στο ήπαρ, μεταφέρεται όμως και ασκεί επικουρική δράση στα τριχοειδή των επινεφριδίων, ωοθηκών και όρχεων. Υδρολύει τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεϊνών και είναι κύρια υπεύθυνη για τη μετατροπή των IDL σε LDL και των HDL2 σε HDL3. Τα αυξημένα επίπεδα της

HDL που παρατηρούνται στην παχυσαρκία και τα σύνδρομα ινσουλινοαντίστασης είναι υπεύθυνα για την ελάττωση της HDL στα σύνδρομα αυτά. Η ηπατική λιπάση διαφέρει από την LPL διότι δεν χρησιμοποιεί την apoCII ως συνένζυμο και διότι δεν υπάρχει σε όλους τους ιστούς.

Η λεκιθίνο- χολοστερολο-ακυλοτρανσφεράση (LCAT)

Είναι γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ και ενσωματώνεται στις HDL. Εστεροποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη που βρίσκεται στην επιφάνεια των HDL και σταδιακά η εστεροποιημένη αυτή χοληστερόλη διεισδύει στον πυρήνα της λιποπρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο το ένζυμο βοηθάει στη σταδιακή μεταφορά από τους ιστούς προς το ήπαρ προοδευτικά μεγαλύτερης ποσότητας χοληστερόλης. Η apoA1 διεγείρει τη δράση της LCAT.

Η πρωτεΐνη (CETP)

Συμβάλλει στη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις HDL προς τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες κυρίως τις VLDL, IDL και remnants. Ταυτόχρονα, μεταφέρονται τριγλυκερίδια από τις παραπάνω λιποπρωτεΐνες προς τις HDL. Η πρωτεΐνη CETP παίζει κύριο ρόλο στην ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών και η παρουσία της επηρεάζει ιδιαίτερα το μεταβολισμό των HDL. Είναι πιθανό ότι η CETP παίζει ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης.

1.4.4 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- **Οι LDL υποδοχείς:**

Ο υποδοχέας LDL επιτρέπει τη μεταφορά της χοληστερόλης στα κύτταρα των ιστών μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος επηρεάζει όλη την ομοιόσταση της χοληστερόλης. Ο υποδοχέας εκτός των LDL αναγνωρίζει και άλλες λιποπρωτεΐνες που φέρουν apoB και apoE δηλαδή χυλομικρά, υπολειπόμενα σωματίδια (remnants), VDL και IDL και για αυτό ονομάζεται υποδοχέας B-E. Οι HDL δεν αναγνωρίζονται γενικά από τον υποδοχέα. Ο υποδοχέας LDL είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται από 5 διακριτούς επιτόπιους οι οποίοι

καθορίζουν τη βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Η σύνθεση του υποδοχέα γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το υπεύθυνο γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19.

- **LDL receptor-related protein (LRP).**

Αποτελεί ξεχωριστό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης, ο οποίος εκφράζεται κυρίως στο ηπατοκύτταρο. Αναγνωρίζει και συνδέει τις λιποπρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε apoE δηλαδή τα υπολειπόμενα σωματίδια των χυλομικρών και των VLDL, όχι όμως και τις LDL.

- **HDL υποδοχέας:**

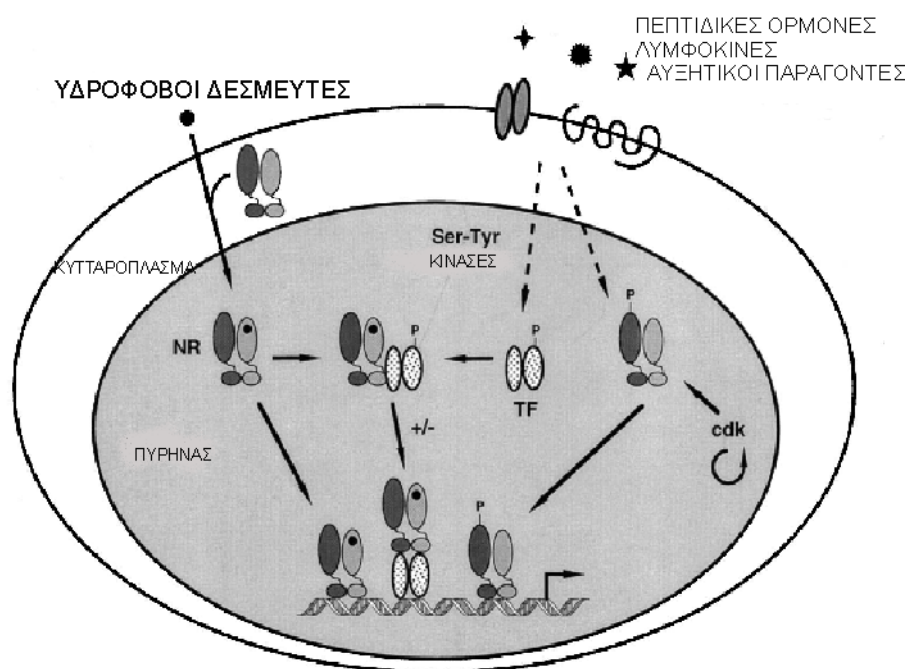
Ο μεταβολισμός των HDL παρέμενε αδιευκρίνιστος μέχρι πρόσφατα. Το 1996 η ομάδα του Krieger απομόνωσαν έναν scavenger υποδοχέα SR-BI ο οποίος φαίνεται ότι συνδέει και καταβολίζει τις HDL. Η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα επιτρέπει την πρόσληψη της χοληστερόλης HDL στα κύτταρα στόχος - κυρίως ήπαρ, επινεφρίδια, όρχεις, ωοθήκες. Πιθανόν όμως να υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς καταβολισμού των HDL.

1.5 ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι υποδοχείς είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με τα μόρια – αγγελιοφόρους φυσιολογικών μηνυμάτων. Η αλληλεπίδραση είναι πάντα εξειδικευμένη και ακολουθεί τους κανόνες των κλασικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και δεσμευτών (ligands). Οι δεσμευτές των υποδοχέων μπορεί να ανήκουν σε οποιαδήποτε κατηγορία ενώσεων (ιόντα, υδατάνθρακες, αμινοξέα, πρωτεΐνες, λιποειδή, ορμόνες κλπ).

Άλλοι υποδοχείς είναι καθηλωμένοι σε μεμβράνες οπότε οι δεσμευτές των υποδοχέων αυτών είναι υδρόφιλες ουσίες, οι οποίες δεν μπορούν να διαπεράσουν την μεμβράνη διότι αλληλεπιδρούν υποχρεωτικά με τους υποδοχείς τους προκειμένου να διαπεράσουν το λιπιδικό φράγμα ή προκειμένου να επηρεάσουν το εσωτερικό του κυττάρου με κάποιο μηχανισμό, χωρίς οι ίδιοι οι δεσμευτές να χρειάζεται να μουν μέσα στο κύτταρο ή στο υποκυτταρικό οργανίδιο. Αντίθετα, οι υδρόφοβες ενώσεις – μηνύματα (π.χ. οι στεροειδείς ορμόνες) δε χρειάζεται να έχουν τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των μεμβρανών επειδή μπορούν εύκολα να περάσουν μέσα στο κύτταρο. Οι υποδοχείς των ενώσεων αυτών είναι ενδοκυτταρικοί.

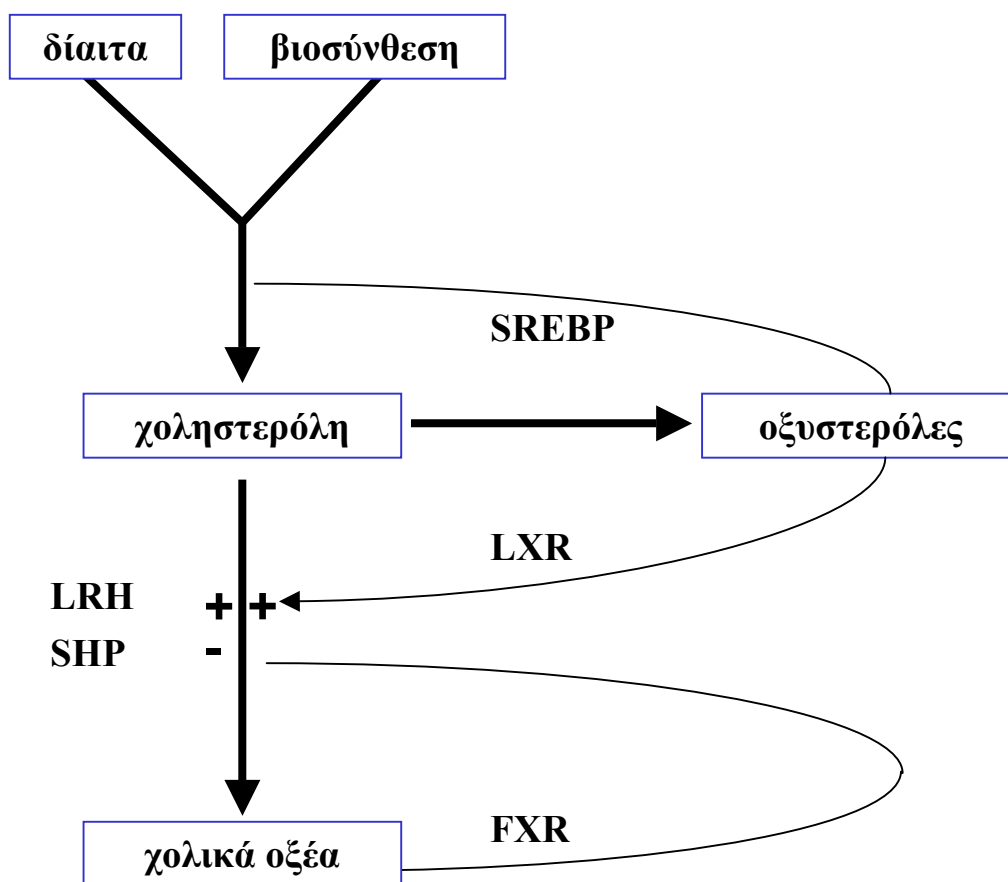
Οι πυρηνικοί υποδοχείς παρέχουν τη δυνατότητα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς να ελέγχουν άμεσα την έκφραση γονιδίων, ανταποκρινόμενοι σε εξωκυτταρικά μηνύματα. Η δράση των υποδοχέων μπορεί να ρυθμιστεί μέσω τριών τουλάχιστον μηχανισμών (σχήμα 2): 1). Με σύνδεση ενός μικρού λιπόφιλου δεσμευτή στον υποδοχέα 2). Με ομοιοπολική τροποποίηση, που συνήθως πραγματοποιείται με φωσφορυλίωση του υποδοχέα, και 3). Μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες μεταγραφής συμπεριλαμβανομένων και πυρηνικών υποδοχέων. Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να δρουν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό για να διαμορφώσουν μια συγκεκριμένη δράση.



Σχήμα 6. Η δράση των υποδοχέων μέσα στο κύτταρο

Η χοληστερόλη είναι απαραίτητη δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, για τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών, της βιταμίνης D και των χολικών οξέων.

Ωστόσο, η αυξημένη ποσότητα χοληστερόλης στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες όπως η υπερχοληστεριναιμία, η αθηροσκλήρυνση και ο σχηματισμός χολόλιθων. Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης σε χολικά οξέα αντιπροσωπεύει το κύριο μονοπάτι αποβολής της από το σώμα και αντιπροσωπεύει περίπου τη μισή από την καθημερινή απέκκρισή της. Τα επίπεδα της εξωγενούς και της ενδογενούς χοληστερόλης στο συκώτι διατηρούνται σταθερά, σε ένα στενό εύρος συγκεντρώσεων, μέσω κυρίως μεταγραφικών μηχανισμών.



Σχήμα 7. Σχηματική παράσταση των παραγόντων μεταγραφής που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα.

LRH= liver receptor homolog= ομόλογος υποδοχέας του συκωτιού

LXR = liver X receptor= υποδοχέας X συκωτιού

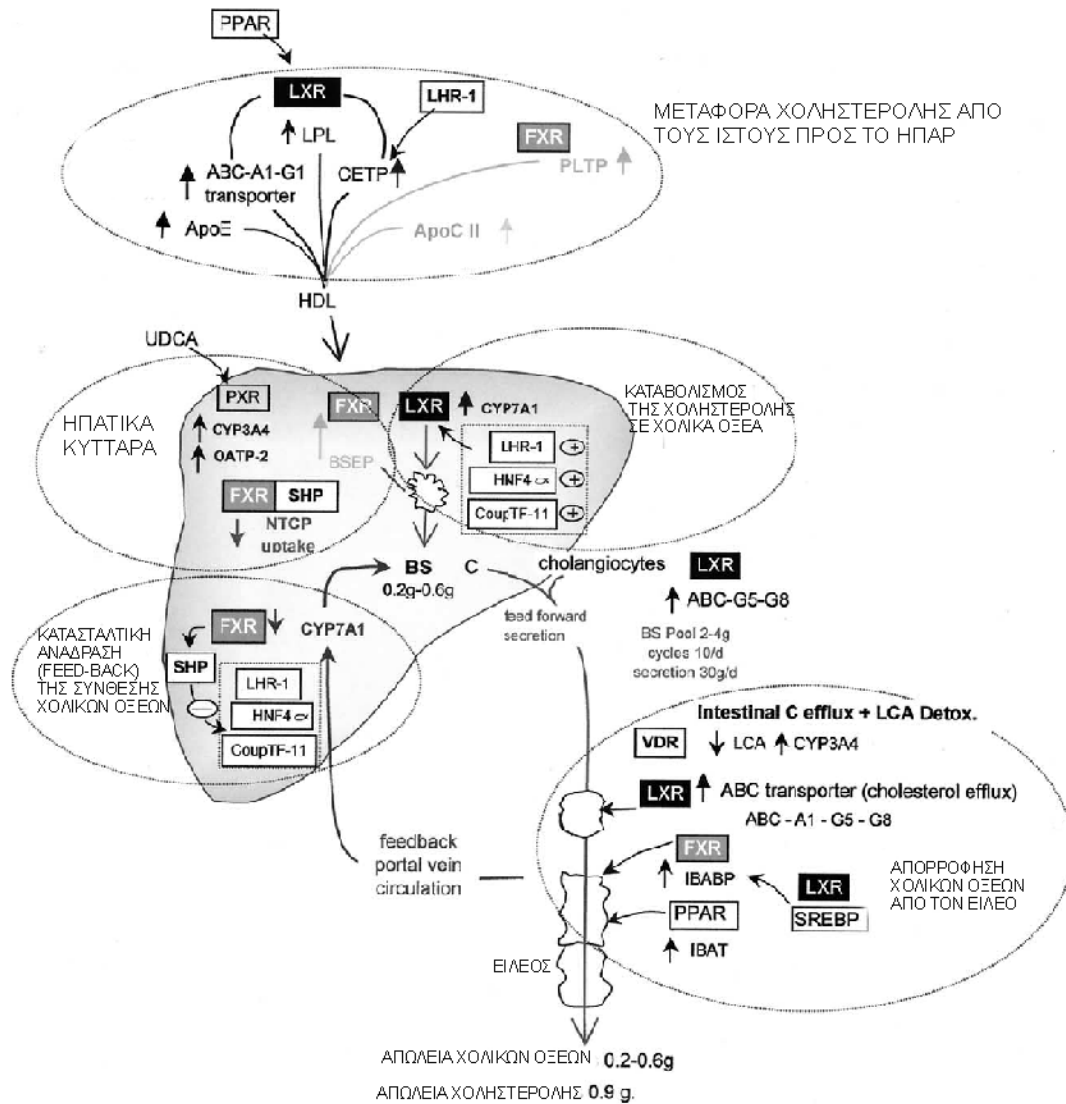
FXR = farnesoid X receptor= φαρνεζόλη X υποδοχέας

Οι SREBP (sterol response element-binding proteins) είναι μια οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών που δρουν ως παράγοντες μεταγραφής και κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία συντελούν στην καταστολή του ενζύμου HMG-CoA αναγωγάση, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνθεσης και τη συνεπαγόμενη πτώση των επιπέδων της χοληστερόλης. Ένα εξειδικευμένο ηπατικό κυτόχρωμα P450, το CYP7A1, καταλύει το πρώτο και καθοριστικό βήμα για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά οξέα. Η έκφραση της CYP7A1 και κατά συνέπεια η βιοσύνθεση των χολικών οξέων υπόκειται σε

ρύθμιση που περιλαμβάνει τη δράση μιας σειράς από πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς. (Lehmann et al., 1997; Stroup et al., 1997; Chiang,1998; Peet et al., 1998; Nitta et al., 1999; Russell,1999; Stroup and Chiang, 2000).

Τα χολικά οξέα και οι οξυστερόλες, προϊόντα οξειδωσης της πλεονάζουσας χοληστερόλης, δρουν ως σήματα που ρυθμίζουν την ενεργότητα ενός αριθμού παραγόντων μεταγραφής, επάγοντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή του ενζύμου CYP7A1. Οι οξυστερόλες ενεργοποιούν τον πυρηνικό υποδοχέα LXR, ο οποίος επάγει τη βιοσύνθεση των χολικών οξέων. Η αυξημένη συγκέντρωση χολικών οξέων αναγνωρίζεται από τον πυρηνικό υποδοχέα FXR, ο οποίος αναστέλει τη βιοσύνθεση των χολικών οξέων.

Τα LRH και SHP είναι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς, οι οποίοι εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και αναστολή αντίστοιχα της μετατροπής της χοληστερόλης σε χολικά οξέα. Έχει επικρατήσει η ονομασία ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς για εκείνους τους υποδοχείς που η ανακάλυψη τους προηγείται του προσδιορισμού του δεσμευτή τους. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν τα 5 στάδια όπου δραστηριοποιούνται οι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς .



Σχήμα 8. Οι πέντε περιοχές που πρόσφατα ανακαλύφθηκαν για την δραστηριότητα των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων και είναι διευκρινισμένες με **μαύρο χρώμα** για την LXR, με **γκρίζο** για FXR, και **με λευκό** για τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς που λαμβάνουν μέρος στην όλη διαδικασία της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Μετά από τη δέσμευση του ligand από την οξυστερόλη για την LXR ή από τα χολικά οξέα για την FXR, το μοριακό γενετικό σήμα ενισχύεται ή καταστέλλεται από τους ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Με το παραπάνω σχήμα εξηγείται ο τρόπος με τον οποίο αυτοί οι πυρηνικοί υποδοχείς συντονίζονται για να αυξήσουν ή να μειώσουν τη δράση των γονιδίων-στόχων για κάθε μια από αυτές τις περιοχές.

LRH= liver receptor homolog= ομόλογος υποδοχέας του συκωτιού/ LXR = liver X receptor= υποδοχέας X συκωτιού/ CYP7A1 = cholesterol 7-hydroxylase= στερόλη 7 α -υδροξυλάση/HNF-4=hepatocyte nuclear factor =ηπατοκυτταρικός ορμονικός παράγοντας/IBABP = ileal bile acid-binding protein=ειλεϊκά χολικά οξέα –που δεσμεύουν πρωτεΐνη /IBAT = ileal bile-acid transporter=ειλεϊκά χολικά οξέα μεταφορείς/LDL =low-density lipoprotein= χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη/LPL = lipoprotein lipase=λιποπρωτεϊνική λιπάση/LXR = liver X receptor= υποδοχέας X συκωτιού/OATP = organic anion transporter=οργανικό μεταφέρον ανιόν/PLTP = phospholipid transfer protein=φωσφολιπιδική μεταφέρουσα πρωτεΐνη /SHP =short heterodimer partner=μικρός ετεροδιμερούς συνεργάτης/SREBP = sterol response element-binding protein=στερόλη απάντηση στοιχείου – που δεσμεύει πρωτεΐνη

Η μεταφορά της χοληστερόλης προς το συκώτι εξυπηρετείται από τις ανταλλαγές λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών, τη δραστηριότητα των από-λιποπρωτεϊνών και την

εκροή της χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα. Ο πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας LXR αρχίζει αυτή τη γονιδιακή ρύθμιση με τις μεταφέρουσες ABC A1-G1 πρωτεΐνες, την apoE αποπρωτεΐνη και τη λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) ενώ η FXR αρχίζει αυτή τη ρύθμιση με την apoC και την apoA1. Η σύνθεση των χολικών οξέων αυξάνεται από την LXR και κατά συνέπεια η χοληστερόλη καταβολίζεται σε χολικά οξέα. Η καταστολή της επαναπρόσληψης των χολικών αλάτων στο ήπαρ ελέγχεται από την ανατροφοδοτική δραστηριότητα της CYP7A1 που ενεργοποιείται από την FXR και το SHP μέσα στο ηπατοκύτταρο.

Η ροή της χοληστερόλης συντονίζεται και από έξω-ηπατικά κύτταρα και από ένδο-ηπατικά κύτταρα. Η LXR είναι υπεύθυνη για την αύξηση των ABC-A1 λιποπρωτεϊνών, οι οποίες συμβάλλουν στη μεταφορά της χοληστερόλης από τους ιστούς προς το ήπαρ όπως και για την αύξηση των ABC-G5 και ABC-G8 λιποπρωτεϊνών, οι οποίες συμβάλλουν στην αποβολή χοληστερόλης από τον ειλεό. Με τους μηχανισμούς αυτούς διατηρείται ισορροπία μεταξύ της χοληστερόλης που εισάγεται στον οργανισμό, της χοληστερόλης που παράγεται στον οργανισμό και της χοληστερόλης που αποβάλλεται στα περιττώματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Η δράση των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων για την ομοίωση της χοληστερόλης.

| ΘΕΣΗ/ΔΡΑΣΗ | ΚΑΝΟΝΙΚΟ ΟΝΟΜΑ | ΣΥΝΗΘΕΣ ΟΝΟΜΑ | ΔΕΣΜΕΥΤΕΣ | ΓΟΝΙΔΙΟ ΣΤΟΧΟΣ |
|--|----------------|---|--|--|
| ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΚΩΤΙ | NR1H3 | LXR- α † | Oxysterols | ABC-A1 ApoE LPL CETP |
| | NR5A2 | LXR† with hFTF LXR† with PPAR | | |
| | NR1H4 | FXR† | Bile acids | ApoC-11 PLTP ApoA-1 |
| ΗΠΑΡ ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΣΕ ΧΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ | NR2A2 | HNF 3,4 | | |
| | | LXR† FXR† | Oxysterols Bile acids | ↑ CYP7A1 ↓ CYP7A1 |
| | NR0B2 | SHP (corepressor) for hFTF and HNF-4 α | | |
| ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΤΑ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ | NR2F2 | CouprTF-11 FXR† | Bile acids | ↑ BSEP ↓ NTCP |
| | NR1H1 | PXR† LXR† LXR† | Bile acids Oxysterols Oxysterols | ↑ CYP3A1 ↑ ABC-G1 ABC-A1 ABC-G5, ABC-G8 |
| ΧΟΛΟΑΓΓΕΙΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΛΕΠΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ | NR1H1 | VDR | LCA | ↑ CYP3A4 |
| | | PPAR† FXR† | Bile acids Bile acids | IBAT IBABP |
| ΕΙΛΕΟΣ | | PXR | Oxysterols, bile acids | See LXR, FXR, PXR, and PPAR |

LXR

Ο υποδοχέας X του ήπατος (LXR) ενεργοποιείται από οξυστερόλες. Ποντίκια που στερούνται της LXR πρωτεΐνης, δεν επάγουν την έκφραση της CYP7A1, ως απάντηση στη χοληστερόλη που προσλαμβάνεται με την τροφή. Αντίθετα, τα ζώα αυτά συσσωρεύουν μεγάλα ποσά χοληστερόλης στο συκώτι τους, όταν ταΐζονται με τροφές πλούσιες σε χοληστερόλη. Αυτά τα στοιχεία καθιερώνουν την LXR ως αισθητήρα χοληστερόλης υπεύθυνο για τη θετική ρύθμιση (αύξηση) της έκφρασης της CYP7A1. Επιπλέον, η LXR συσχετίζεται με τον ορφανό υποδοχέα SF-1, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των ενζύμων που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών (Parker, 1998.; Hammer and Ingraham, 1999).

LRH

Η ομόλογος υποδοχέας του συκωτιού (LRH) είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας, για τον οποίο αποδείχθηκε πρόσφατα (Nitta et al., 1999), ότι δεσμεύεται στον CYP7A1 υποκινητή και επάγει την έκφραση της CYP7A1.

FXR

Τα χολικά οξέα είναι φυσικοί υποκαταστάτες του πυρηνικού ορμονικού υποδοχέα X της φαρνεζόλης (FXR), ο οποίος προστατεύει το συκώτι από την τοξικότητα τους. (Format et al., 1995; Zavacki et al., 1997; Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999). Ποικίλα χολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου και του CDCA, ενεργοποιούν την FXR σε φυσιολογικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, όταν παρουσιάζεται αυξημένο το ποσό των χολικών οξέων, αυτά ενεργοποιούν το FXR, το οποίο σχετίζεται με την καταστολή έκφρασης της CYP7A1 στο ηπατοκύτταρο. Η FXR δεν καταστέλλει άμεσα την έκφραση της CYP7A1, αλλά μέσω της επαγωγής του γονιδίου που κωδικοποιεί το ορφανό πυρηνικό υποδοχέα SHP, ο οποίος καταστέλλει την έκφραση της CYP7A1 (Lu et al., 2000). Αυτό προκύπτει από πρόσφατα πειράματα όπου η έκφραση της SHP ήταν εμφανώς χαμηλότερη και μη επαγόμενη από τα χολικά οξέα, σε συκώτι ποντικών που στερούνται της FXR (Sinal et al, 2000).

SHP

Η Μικρή Ετεροδιμερής Συνεργός Πρωτεΐνη (SHP) είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας, που στερείται περιοχής δέσμευσης DNA. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να δεσμεύεται πάνω σε διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς όπως την LRH (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000; Sinal et al., 2000) και να παρεμποδίζει την ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, η SHP καταστέλλει τον θετικό (αυξητικό) ρυθμιστή του CYP7A προαγωγέα, το LRH (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000), με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης της CYP7A1 στο ηπατοκύτταρο.

Σύμφωνα με τους Lee et al (2000) η SHP δεσμεύεται πάνω στον HNF4a υποδοχέα και καταστέλλει τη μεταγραφική του δραστηριότητα. Ο ορφανός πυρηνικός παράγοντας HNF4a, που είναι ένας βασικός ρυθμιστής της έκφρασης πολλών γονιδίων στο συκώτι, σε ινσουλινοεκκριτικά παγκρεατικά β κύτταρα, και σε άλλους ιστούς, είναι επίσης ένας στόχος του SHP. Μέσα στα παγκρεατικά β κύτταρα, η HNF4a ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση της έκκρισης της ινσουλίνης από τη γλυκόζη. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις στην

ανθρώπινη HNF4a είναι αιτία μιας μορφής διαβήτη και μάλιστα του αποκαλούμενου νεανικού διαβήτη (MODY1) που χαρακτηρίζεται από μειωμένη εκκριτική απόκριση ινσουλίνης στη γλυκόζη. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη SHP οδηγούν σε μια μορφή παιδικής παχυσαρκίας, με αποτέλεσμα τα παιδιά να γεννιούνται με αυξημένο σωματικό βάρος και να έχουν υπερινσουλιναιμία. Έχει παρατηρηθεί ότι η μεταγραφική δραστηριότητα της HNF4a στα β-κύτταρα είναι ενισχυμένη σε αυτούς τους ασθενείς, λόγω της απώλειας της ανασταλτικής δράσης της από την SHP και έτσι με αυτόν τον τρόπο οδηγεί στην υπέρ έκκριση της ινσουλίνης, στη διέγερση της λιπογένεσης και στην παχυσαρκία. Κατά συνέπεια, η SHP και η HNF4a μπορούν να λειτουργήσουν μαζί για τη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης. Η δυνατότητα διακίνησης των πυρηνικών υποδοχέων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την εκδήλωση της δράσης τους. Η SHP, που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, απουσία της HNF4a (που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της στον πυρήνα) μετατοπίζεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της HNF4a (Makiko Ogata & Takeo Awaji, 2002).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφονται στην εργασία αυτή, παρατίθενται παρακάτω και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma, Fluka, Pharmacia και Roche. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν διπλά απεσταγμένο και υπερκαθαρό (διηθημένο από φίλτρο μμ).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ:

1. όξινο φωσφορικό νάτριο
2. δισόξινο φωσφορικό κάλιο
3. χλωριούχο αμμώνιο
4. χλωριούχο νάτριο
5. καυστικό νάτριο

6. θεικό αμμώνιο
7. θειικός σίδηρος
8. Ουρία
9. νιτρικός άργυρος
10. μερκαπτοαιθανόλη
11. APS (υπερθεικό αμμώνιο)
12. TEMED (N, N, N', N –Τετραμέθυλ-αιθυλαίνιο-διαμίνη)
13. Χρωστική Compassion blue
14. γλυκερόλη
15. ζάχαρη
16. Tris (Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο)
17. SDS (θεικό δωδεκακυλικό νάτριο)
18. Bromophenol blue (κυανού της βρωμοφαινόλης)
19. Acrylamide (ακρυλαμίδιο)
20. Bisacrylamide (Μπισ-ακρυλαμίδιο)
21. Γλυκίνη
22. Methanol (μεθανόλη)
23. Οξικό οξύ
24. Χρωστική Serva Blue G
25. Tricine
26. Bis Tris
27. τριχλωροξικό οξύ (TCA)
28. ακετόνη
29. αγαρόζη
30. EDTA(Αιθυλενε-διαμινο-τετραοξικό οξύ)
31. Benzamidine (βενζαμιδίνη)
32. χλωριούχο ασβέστιο
33. χλωριούχο μαγνήσιο
34. χλωριούχος χαλκός
35. υπερμαγγανικό κάλιο
36. νιτρικός άργυρος
37. K_2CO_3
38. Ethanol (αιθανόλη)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

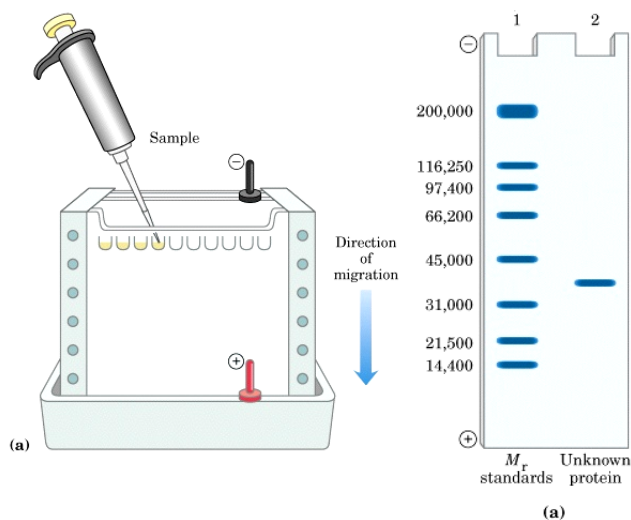
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης Tris-HCl, pH =7,4 (το πρωτόκολλο για το διάλυμα πάρθηκε από τη δημοσίευση electrophoresis 2001,22,2872-2880 Kimie Murayama)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|-------------------|--|
| Tris | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| αμινοκαπροϊκό οξύ | 1mM |
| benzamidine | 1mM |
| H ₂ O | (200ml τελικός όγκος απιονισμένο νερό) |
| Sucrose | 1mM |

2.2 Μέθοδοι χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών

2.2.1 Ηλεκτροφόρηση

Είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην κίνηση ενός φορτισμένου μορίου, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αρκετά δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν για ηλεκτροφόρηση σε μια επίπεδη πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Χρησιμοποιείται μια σύριγγα μικρόλιτρων τύπου Hemilton για την τοποθέτηση των δειγμάτων πάνω στη πηκτή. Στη συνέχεια τοποθετούμε ένα κάλυμμα πάνω από τη συσκευή και τροφοδοτούμε με ρεύμα. Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών που είναι αρνητικά φορτισμένα μετακινούνται προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος της πηκτής. Η πηκτή ως υπόστρωμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται κυρίως για δύο λόγους,: πρώτον γιατί η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις του pH και δεύτερον διότι λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, διευκολύνοντας τους διαχωρισμούς.



Σχήμα 9. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

2.2.2 SDS -ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

(Laemmli, 1970)

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων μας εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπου σαν απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε SDS το οποίο προκαλεί αποδιάταξη των διαφόρων πρωτεϊνών και διαχωρισμό τους στις διάφορες υπομονάδες, αν αποτελούνται από περισσότερα του ενός πολυπεπίδια. Ο πολυμερισμός της πηκτής προκαλείται από ελεύθερες ρίζες, οι οποίες παράγονται από τη χημική διάσπαση της ένωσης APS. Για τη σταθεροποίηση των ριζών χρησιμοποιείται η ένωση TEMED.

Διαλύματα

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl, pH =8,8 (Lower gel buffer)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|----------|
| Tris | 1500mM |
| SDS | 0,4% w/v |

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής στοίβαξης Tris-HCl, pH =6,8 (upper gel buffer)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|----------|
| Tris | 500mM |
| SDS | 0,4% w/v |

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Διάλυμα ακρυλαμιδίου

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|----------|
| Acrylamide | 30% w/v |
| Bisacrylamide | 0.8% w/v |

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Διάλυμα αποδιάταξης δειγμάτων (Sample Buffer, 2x)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|------------------------------------|----------|
| β-μερκαπτοαιθανόλη | 8,7 μl |
| 1M Na ₂ CO ₃ | 50μl |
| διάλυμα χρωστικής | 1ml |

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Διάλυμα χρωστικής

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|------------------|----------|
| Bromophenol blue | 0,1%w/v |
| SDS | 5% w/v |
| Ουρία | 16,5M |

Η β-μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται στο Sample Buffer για να συντελέσει στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στα μόρια των πρωτεϊνών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-γλυκίνη, pH =8,4 (running buffer x 10)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|----------|
| Tris | 25mM |
| Γλυκίνη | 192 mM |
| SDS | 0,1% w/v |

Προετοιμασία των gel: οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων 16 cm x 18 cm και πάχος 1 mm. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή φαίνονται παρακάτω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Διάλυμα για πηκτική διαχωρισμού (60ml) 17%

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|-------------------------------|----------|
| lower gel buffer | 15 ml |
| H ₂ O | 11ml |
| Διάλυμα ακρυλαμιδίου (AB mix) | 34ml |
| Ουρία | 4M |
| APS | 180 μlt |
| TEMED | 40μlt |

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Διάλυμα πηκτικής στοίβαξης (30 ml)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|-------------------------------|----------|
| Upper gel buffer | 7,5 ml |
| H ₂ O | 19,5ml |
| διάλυμα ακρυλαμιδίου (AB mix) | 3ml |
| Ουρία | 4M |
| APS (10% w/v) | 90 μlt |
| TEMED | 30μlt |

Τα παραπάνω διαλύματα απαερώθηκαν πριν την προσθήκη του APS (10% w/v) και του TEMED, ενώ μετά την προσθήκη των τελευταίων, τα διαλύματα ανακινήθηκαν ελαφριά ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο του διαλύματος, με αποτέλεσμα να υπάρχει ομοιομορφία στον πολυμερισμό. Μετά το τέλος του πολυμερισμού και την απομάκρυνση των gel από την ειδική συσκευή πολυμερισμού τους, μπορούν να φυλαχτούν και να αποθηκευτούν μέσα σε υγρό χαρτί στους 4⁰C ή να χρησιμοποιηθούν αμέσως.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή τάση (200V) για μία ώρα περίπου μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει στο κατώτερο άκρο των ειδικών πλακών ηλεκτροφόρησης. Στα δείγματα για την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (Sample Buffer) σε διάφορες αναλογίες και κατόπιν θερμάνθηκαν στους 52 ⁰C για 4 λεπτά, τοποθετήθηκαν για μια ελαφριά ανάδευση σε μια ειδική συσκευή (vortex), πριν την ηλεκτροφόρηση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 500g και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες πάνω στην πηκτή εμφανίζονται χρησιμοποιώντας χρώση αργύρου ή κυανού του Coomassie, που αποκαλύπτει μια σειρά από ζώνες. Η χρώση Coomassie απαιτεί πάνω από 24 ώρες για να ολοκληρωθεί το αποτέλεσμα της και η εμφάνιση των πρωτεϊνών. Μετά ,το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού.

Χρώση Coomassie blue

ΠΙΝΑΚΑΣ 12:Διάλυμα χρώσης με Coomassie blue (2 λίτρα)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|--------------------------------|----------|
| coomassie brilliant blue R-250 | 0,6 gr |
| μεθανόλη | 500 ml |
| οξικό οξύ | 200 ml |
| H ₂ O | 1300 ml |

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Διάλυμα αποχρωματισμού (1 λίτρο)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|------------------|----------|
| μεθανόλη | 50 ml |
| Γλυκίνη | 70 ml |
| H ₂ O | 880 ml |

Πρότυπες πρωτεΐνες ,δείκτες μοριακής μάζας, για SDS-PAGE (Fluka)

| | |
|---|----------|
| ▪ α-λακταλβουμίνη από βοδινό γάλα | 14.2 kDa |
| ▪ αναστολέας θρυψίνης από σόγια | 20 kDa |
| ▪ θρυψινογόνο από βοδινό πάγκρεας | 24 kDa |
| ▪ καρβονική ανυδράση από βοδινά ερυθροκύτταρα | 29 kDa |
| ▪ γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική-δευδρογωναση από μυ κουνελιού | 36 kDa |
| ▪ α-λακταλβουμίνη από το λεύκωμα αυγού κότας | 45 kDa |
| ▪ α-λακταλβουμίνη από βοδινό ορό | 67 kDa |

2.2.3 Μη αποδιατακτικές πηκτές**Διαλύματα παρασκευής****ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Διάλυμα ακρυλαμιδίου (AB-mix-buffer) stock**

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|----------------|------------|
| Ακρυλαμίδιο | 48% (w/v) |
| δισακρυλαμίδιο | 1,5% (w/v) |

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Διάλυμα Gel Buffer Bis-Tris-HCl, pH =7,0

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------------|----------|
| 6-αμινοκαπροϊκό οξύ | 1500 mM |
| Bis Tris | 1500 mM |

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου Bis-Tris-HCl, pH =7,0

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|----------|
| Bis Tris | 50 mM |

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου Bis-Tris-Tricine, pH =7,0

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|---------------|-------------|
| Tricine | 50 mM |
| Bis Tris | 15 mM |
| Serva Blue G | 0,02% (w/v) |

Προετοιμασία των πηκτών: Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, για τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων 20 x 27cm και πάχος 1,5mm

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Διάλυμα για την πηκτή διαχωρισμού (running ή separating gel)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|------------------|----------|
| Gel buffer | 20 ml |
| H ₂ O | 30,3ml |
| AB -mix | 9,7ml |
| APS | 250 μlt |
| TEMED | 50μlt |

ΠΙΝΑΚΑΣ 19: Διάλυμα για την πηκτή στοιβαξης (stecking gel)

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|------------------|----------|
| Gel buffer | 10 ml |
| H ₂ O | 18,1ml |
| AB -mix | 1,9 ml |
| APS | 100 μlt |
| TEMED | 30μlt |

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μελετήθηκαν με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδιου. Η πηκτική συμπύκνωσης είχε συγκέντρωση 3% ακρυλαμίδιο και η πηκτική διαχωρισμού είχε συγκέντρωση 8% . Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν 17% γλυκερόλη για να έχουν υψηλή πυκνότητα και να στοιβάζονται στα ‘πηγαδάκια’ της πηκτικής. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περίπου 16⁰C ,αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V) μέχρι τα δείγματα να συμπυκνωθούν στη πηκτική συμπύκνωσης και στη συνέχεια στα 150V για περίπου 12 ώρες. Στα δείγματα για την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση προστέθηκε γλυκερόλη σε διάφορες αναλογίες και κατόπιν τα αναδεύσαμε ελαφριά ,πριν την ηλεκτροφόρηση, και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 500g.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες πάνω στην πηκτική εμφανίζονται με διάλυμα σταθεροποίησης για χρώση μπλε Coomassie, που αποκαλύπτει μια σειρά από ζώνες μετά από περίπου 24 ώρες .

ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Διάλυμα σταθεροποίησης για χρώση με μπλε Coomassie:

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα |
|----------------------|-----------------|
| Μεθανόλη | 50% (v/v) |
| Οξικό οξύ | 10% (v/v) |

2.2.4 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Native PAGE/SDS PAGE)

- 1^η διάσταση: μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μελετήθηκαν με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδιου. Η πηκτική συμπύκνωσης είχε συγκέντρωση 3% ακρυλαμίδιο και η πηκτική διαχωρισμού είχε συγκέντρωση 8% ακρυλαμίδιο. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν 17% γλυκερόλη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περίπου 16⁰C, αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V) μέχρι τα δείγματα να

συμπυκνωθούν στη πηκτή συμπύκνωσης και στη συνέχεια στα 150V για περίπου 12 ώρες.

- 2^η διάσταση : SDS- PAGE

Τα διαχωρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ηλεκτροφορήθηκαν σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS- PAGE για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που αποτελούν τα σύμπλοκα αυτά. Με ένα ειδικό νυστέρι κόβουμε τη ζώνη από τη μη- αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση που περιέχει τα σύμπλοκα και μας ενδιαφέρει να μελετηθούν τα και επωάζεται για 30 λεπτά μέσα σε διάλυμα που περιέχει 1% SDS ,1% μερκαπτοαιθανόλη και στη συνέχεια σε διάλυμα με 1% SDS μόνο για 10 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία τοποθετούμε οριζόντια το δείγμα μας και η ζώνη της πηκτής σταθεροποιείται με διάλυμα για την πηκτή στοίβαξης και ηλεκτροφορείται σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής πηκτής SDS -PAGE με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μοριακή τους μάζα. Παράλληλα αναλύθηκε μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες γνωστής μοριακής μάζας για SDS -PAGE. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετήθηκε σε χρώση Coomassie blue για 24 ώρες και κατόπιν έγινε αποχρωματισμός .

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΣΥΚΩΤΙ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

Τα συκώτια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν μια προσφορά του Δρ Γιάννη Ταλιανίδη Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, από ποντίκια που γεννιούνται και μεγαλώνουν στο θάλαμο πειραματόζωων του ίδιου Πανεπιστημίου. Εμείς παραλάβαμε 2 συκώτια από ποντίκια τα οποία είχαν το ίδιο μέγεθος και ζύγισαν 1,2 gr έκαστο. Το ένα συκώτι ήταν δείγμα αναφοράς (control) και ήταν ένα φυσιολογικό συκώτι ποντικίου .Το άλλο συκώτι ήταν από ποντίκι το οποίο ήταν γενετικά τροποποιημένο και υπερέκφραζε την πρωτεΐνη SHP. Τα συκώτια μεταφέρθηκαν από το τμήμα Βιολογίας μέσα σε πάγο και βρίσκονταν μέσα σε PBS (φωσφορικό) όπου είχε επέλθει αφαίμαξη.

Στη συνέχεια πετάξαμε το φωσφορικό υγρό και κόψαμε τα συκώτια με ψαλιδάκι σε πολύ μικρά κομμάτια και στη συνέχεια τοποθετήσαμε το καθένα ξεχωριστά σε ένα γυάλινο χειροκίνητο ομογενοποιητή ενώ προσθέσαμε σε κάθε ομογενοποιητή 12,5ml

από το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης με $\text{pH}=7,5$. Στη συνέχεια με προσεκτικές κινήσεις έγινε ομογενοποίηση των συκωτιών μέχρι το σημείο όπου είχαμε ένα ομοιογενές μίγμα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διαφορετικά tube και με το αντίστοιχο control τοποθετήθηκαν φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 700g, στους 4°C . Στη συνέχεια κρατήσαμε το υπερκείμενο και πετάξαμε το ίζημα (pellet). Κατόπιν τοποθετήσαμε τα δείγματά μας σε γυάλινα σωληνάρια (tube), τα ζυγίσαμε για να έχουμε το ίδιο βάρος και τα υπερφυγοκεντρήσαμε στα 35000g, στους 4°C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε το υπερκείμενο σε διαφορετικά σωληνάρια και κρατήσαμε το ίζημα που περιέχει τις μεμβράνες. Μετά το ομογενοποίησαμε με ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιώντας ένα πινελάκι. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και για τα δύο συκώτια. Στη συνέχεια προσθέσαμε τελικό όγκο για τις μεμβράνες 3 ml buffer. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε και στο μεταλλαγμένο συκώτι και στο κανονικό συκώτι. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν με τελικό όγκο 13ml, το υπερκείμενο από τα κύτταρα του κανονικού συκωτιού σε 13 αντίστοιχα σωληνάρια του ενώ η ίδια διαδικασία με τον ίδιο τελικό όγκο ακολουθήθηκε και για το συκώτι που υπερεκφράζεται η SHP. Οι μεμβράνες, με τελικό όγκο 3ml τοποθετήθηκαν στα σωληνάρια του 1 ml και όλα μαζί τα δείγματα πλέον τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -40°C .

2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD (Bradford 1976)

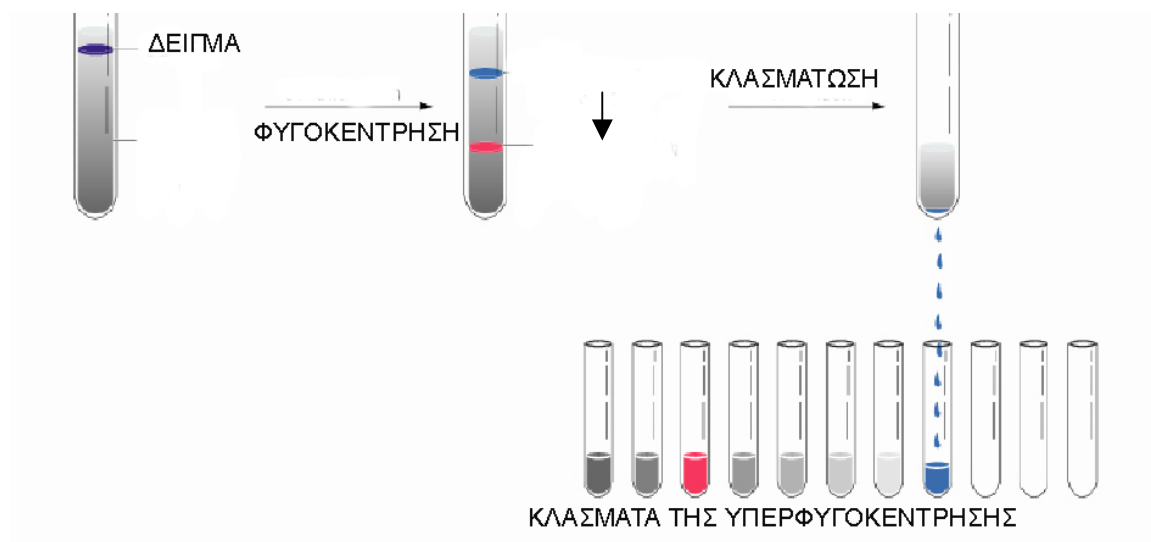
Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάφορα δείγματα. Αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις κάποιας πρωτεΐνης π.χ βόεια αλβουμίνη με βάση την απορρόφηση στο ορατό, στα 595 nm. Κατόπιν μετριέται η απορρόφηση στα 595 nm του άγνωστου δείγματος και μέσω της καμπύλης υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων. Η άμεση σχέση της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον 'δεσμό' που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και του Serva Blue G. Αυτό που πραγματικά συμβαίνει είναι το εξής: ο 'δεσμός' του Serva Blue G με μια πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής από τα 465nm στα 595nm. Μετά από δύο λεπτά από την προσθήκη της χρωστικής στο δείγμα της πρωτεΐνης έχει ολοκληρωθεί η αλλαγή στο χρώμα και διατηρείται σταθερή για περίπου μία ώρα. Τα πλεονεκτήματά της είναι η ταχύτητα της

μεθόδου και η ευαισθησία της. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει απόλυτες ποσότητες πρωτεΐνης 1 έως 20μg.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης : Αρχικά προετοιμάζω ένα ‘τυφλό’ δείγμα το οποίο αποτελείται από 900μl διάλυμα Bradford και 100μl από ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris) που έχω χρησιμοποιήσει και παραπάνω. Στη συνέχεια θα πάρω συνολικά 6 δείγματα, 3 από τα κύτταρα της SHP και 3 από τα κύτταρα από το ‘κανονικό’ και θα κάνω δοκιμές ως προς την αραίωση μέχρι να έχω το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή μέτρηση με απορρόφηση στην περιοχή 0,050 έως 0,600 Abs. Στην αρχή πήρα 100μl από κάθε δείγμα κυττάρου και τα αραίωσα με 900μl ρυθμιστικό. Στη συνέχεια από τα παραπάνω δείγματα που ήδη είχαν υποστεί αραίωση πήρα 20μl και πρόσθεσα 80μl ρυθμιστικό και 900 μl διάλυμα Bradford αλλά το διάλυμα μου ήταν αρκετά πυκνό. Στη συνέχεια πήρα 10 μl από κάθε δείγμα που είχα αραιώσει αρχικά και πρόσθεσα 80μl ρυθμιστικό και 900 μl διάλυμα Bradford. Αυτή τη φορά το διάλυμά μου ήταν κατάλληλο για μέτρηση και προχώρησα παρακάτω. Μετά από ισχυρή ανάδευση, τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά και στη συνέχεια καταγράφεται με φωτογραφικό η απορρόφηση στα 595nm, μήκος κύματος που απορροφά το σύμπλοκο χρωστικής- πρωτεΐνης. Πήραμε 3 διαφορετικές μετρήσεις από κάθε δείγμα μετρώντας την απορρόφηση και υπολογίσαμε το ποσό της πρωτεΐνης μέσω της πρότυπης καμπύλης .

2.5 Βαθμίδωση σουκρόζης (sucrose gradient)

Η προετοιμασία της βαθμίδωσης είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε μια συσκευή που ονομάζεται ‘αναμικτής βαθμίδωσης’. Γενικότερα στη συσκευή αυτή τοποθετείται διάλυμα χαμηλής πυκνότητας (10% σουκρόζη) και διάλυμα υψηλής πυκνότητας (40% σουκρόζη), συγκεντρώνονται σε ένα σωλήνα και δημιουργείται έτσι μια βαθμίδωση πυκνότητας.



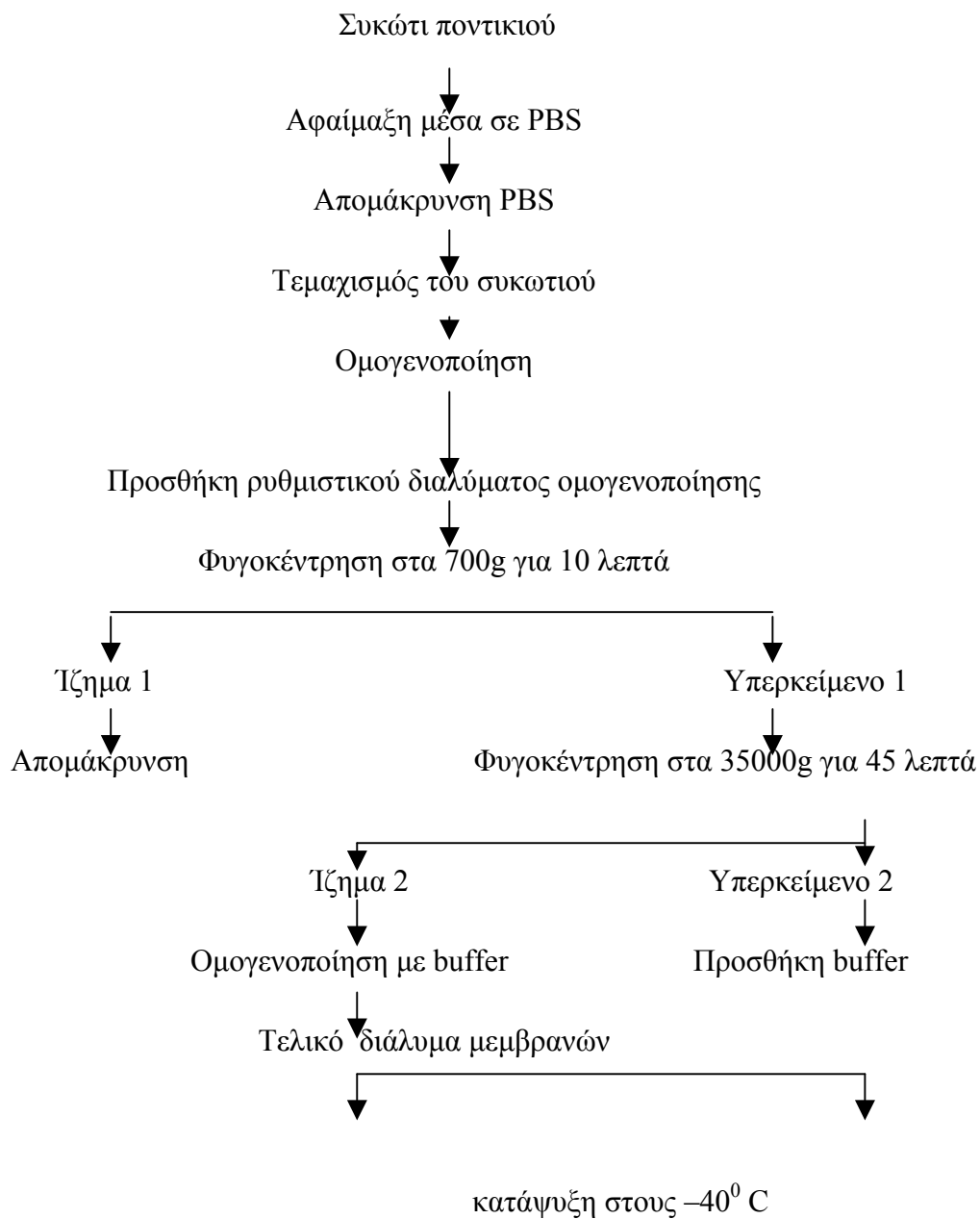
Σχήμα 10. Φυγοκέντρηση σε ζώνες.

Στη συνέχεια τοποθετούμε σε σωλήνες υπερφυγοκέντρωσης 1 ml από το δείγματά μας (Κ από το ‘κανονικό’ ποντίκι και S=από το ποντίκι που υπερεκφράζεται η SHP). Στη συνέχεια γίνεται υπερφυγοκέντρηση στις 35.000 στροφές για 16 ώρες, με στόχο να καταφέρουμε να γίνει κατανομή των πρωτεϊνών των δειγμάτων μας στις αντίστοιχες διαβαθμίσεις της σουκρόζης.

Μετά την υπερφυγοκέντρηση τα κλάσματα συλλέγονται ανά 1ml από το αραιότερο προς το πυκνότερο. Συνολικά συλλέξαμε 10 κλάσματα του 1ml για κάθε δείγμα, δηλαδή συλλέξαμε 10 δείγματα για το Κ και 10 δείγματα για το S. Τα δείγματα αυτά τα αριθμήσαμε με αύξοντα αριθμό από το 1 έως το 10.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΚΩΤΙΟΥ



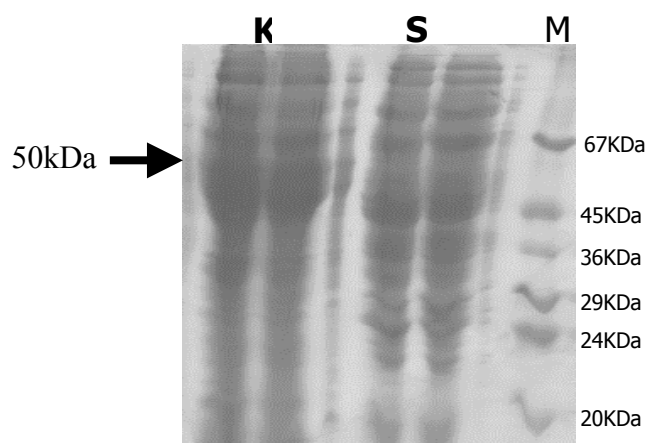
Σχήμα 11. Διαγραμματική απεικόνιση της εκχύλισης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά την εκχύλιση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από το συκώτι των ποντικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BRADFORD (Bradford 1976) για τον υπολογισμό της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Στα 1,2 gr συκωτιού βρέθηκε 50,196 mgr συνολικών πρωτεϊνών για το φυσιολογικό και 49,86 mgr συνολικών πρωτεϊνών για το διαγονιδιακό ποντίκι. Από τον παραπάνω προσδιορισμό δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές ως προς την συνολική συγκέντρωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στα δύο δείγματα.

3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Από τη σύγκριση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών παρατηρείται ότι στο δείγμα K υπάρχει μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση στην περιοχή μοριακής μάζας των 50 kDa.



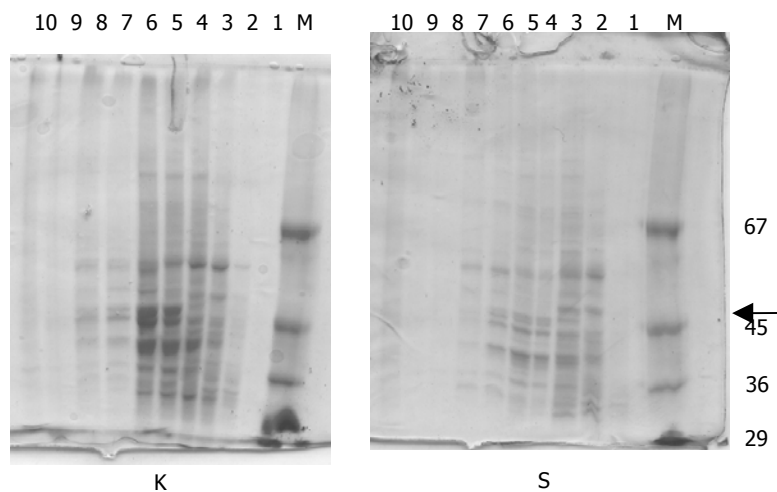
Σχήμα 12. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 17% SDS με χρώση Coomassie Blue.

K= το δείγμα που απομονώθηκε από το φυσιολογικό ποντίκι και **S**= το δείγμα που απομονώθηκε από το διαγονιδιακό ποντίκι.

3.4 ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ

Πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης 10-30% με στόχο τη μελέτη της κατανομής των πρωτεϊνών στα διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Από την ανάλυση των κλασμάτων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την πρωτεϊνική σύσταση των συμπλόκων μεταξύ των δύο δειγμάτων S και K. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εμφανίζονται στα κλάσματα 3 έως 6 τόσο στο δείγμα S όσο και στο δείγμα K. Επιπλέον επιβεβαιώνεται η μειωμένη έκφραση δύο πρωτεϊνών με μοριακό βάρος περίπου 50 kDa, στο δείγμα S.



Σχήμα 13. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 17% SDS με χρώση Coomassie Blue. **K**= κλάσματα που προέκυψαν από υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική βαθμίδωση σουκρόζης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από φυσιολογικό ποντίκι και **S**= κλάσματα που προέκυψαν από υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική βαθμίδωση σουκρόζης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από διαγονιδιακό ποντίκι.

3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

Επιχειρήθηκε η περαιτέρω ανάλυση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με διδιάστατη ηλεκτροφόρηση, με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση τους. Ωστόσο η ευκρίνεια των πηκτών δεν επέτρεψε την εξαγωγή συμπερασμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

- Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από συκώτι φυσιολογικού ποντικίου και διαγονιδιακού ποντικίου, στο οποίο ήταν γενετικά υπερεκφρασμένη η SHP.
- Υπολογίστηκε η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών είναι περίπου η ίδια και στα δύο δείγματα.
- Ανάλυση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση έδειξε ότι στο δείγμα από φυσιολογικό ποντίκι υπάρχει μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση μεγέθους περίπου 50 kDa, σε σχέση με εκείνο από το διαγονιδιακό ποντίκι. Αυτό δείχνει πιθανόν ότι η SHP δρα ως καταστολέας της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Έχουν αναφερθεί μελέτες σε ποντίκια που στερούνται του γονιδίου της SHP, στα οποία παρατηρήθηκε αυξημένη σύνθεση χολικών οξέων και απώλεια της ικανότητας καταστολής της έκφρασης της CYP7A1. Η CYP7A1 είναι το ένζυμο που καταλύει το πρώτο και είναι καθοριστικό στάδιο του ρυθμού σύνθεσης στο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των χολικών οξέων από χοληστερόλη. Δεδομένου ότι το αναμενόμενο μοριακό βάρος της CYP7A1 είναι περίπου 50 kDa, είναι πιθανό η παρατηρούμενη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο δειγμάτων να οφείλεται στην καταστολή της έκφρασης του ενζύμου αυτού στο συκώτι από το διαγονιδιακό ποντίκι.
- Η κλασμάτωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης και η ανάλυση των κλασμάτων της υπερφυγοκέντρωσης με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την πρωτεϊνική σύσταση των συμπλόκων μεταξύ των δύο δειγμάτων. Ωστόσο επιβεβαιώθηκε η μειωμένη πρωτεϊνική συγκέντρωση της μοριακής μάζας στο συκώτι από το διαγονιδιακό ποντίκι, η οποία μάλιστα αποδόθηκε σε δύο πρωτεΐνες με μοριακό βάρος περίπου 50 kDa.
- Έγινε προσπάθεια ανάπτυξης δισδιάστατου συστήματος ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από συκώτι ποντικίου. Τα πειράματα αυτά συνεχίζονται στο εργαστήριο.

- Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη προσέγγιση για τη μελέτη του ρόλου της SHP, σε πρωτεϊνικό επίπεδο.
- Η ταυτοποίηση των δύο πρωτεϊνών στην περιοχή των 50 kDa, που πιθανόν ελέγχονται από την SHP θα συμβάλει στην περαιτέρω κατανόηση του ρόλου της SHP στο μηχανισμό ομοιόστασης της χοληστερόλης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρχές φυσιολογίας –ROBERT M.BERNE, MATTHEW N-LEVY
2. Ιατρική Βιοχημεία –BAYNES –DOMINICZAK
3. Schoonjans K, Brendel C, Mangelsdorf D, Auwerx J. Sterols and gene expression: control of affluence. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529:114-25.
4. Carey MC. The enterohepatic circulation. In: Arias IM, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*. New York, NY: Raven Press, 1982:429-65.
5. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:459-81.
6. Grundy SM, Ahrens EH Jr. Measurements of cholesterol turnover, synthesis, and absorption in man carried out by isotopic kinetic and sterol balance methods. *J Lipid Res* 1971; 10:91-107.
7. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992; 31:4737-49.
8. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998; 18:219-24.
9. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, et al. A gene encoding a liver-specific ABC trans-porter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998;20:233-8.
10. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:282-7.
11. Small DM. Point mutations in the ileal bile salt transporter cause leaks in the enterohepatic circulation leading to severe chronic.
12. Cooper AD. Bile salt biosynthesis: an alternate synthetic pathway joins the mainstream. *Gastroenterology* 1997; 113:2005-8.
13. Hofmann AF, Small DM. Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Annu Rev Med* 1967; 18:333-76.
14. Hofman AF. Enterohepatic circulation of bile acids. In: Shultz SG, Forte JG, Rainer BB, eds. *Handbook of physiology (volume 3)*. New York. NY: Oxford University Press, 1989:567-96.
15. Thaysen EH, Pedersen L. Idiopathic bile acid catharsis. *Gut* 1976;17:965-70.

16. Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest* 1997; 99:1880-7.
17. Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, et al. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 1):G157-69.
18. Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 2002; 277:30559-66.
19. Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, et al. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene: involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem* 1999; 274:29749-54.
20. Zaghini I, Landrier JF, Grober J, Krief S, Jones SA, Monnot MC, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1c is responsible for cholesterol regulation of ileal bile acid-binding protein gene in vivo: possible involvement of liver-X receptor. *J Biol Chem* 2002; 277:1324-31.
21. Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, LaRusso NF. Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:11092-7.
22. Small DM, Dowling RH, Redinger RN. The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Intern Med* 1972;130:552-73.
23. Dawson PA, Oelkers P. Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:109-14.
24. St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol* 2001; 204(Pt 10): 1673-86.
25. Lecureur V, Courtois A, Payen L, Verhnet L, Guillouzo A, Fardel O. Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. *Toxicology* 2000; 153:203-19.
26. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001; 276:28857-65.
27. Oftebro H, Bjorkhem I, Skrede S, Schreiner A, Pederson JI. Cerebrotendinous xanthomatosis: a defect in mitochondrial 26-hydroxylation required for normal biosynthesis of cholic acid. *J Clin Invest* 1980;65:1418-30.
28. Setchell KDR, Heubi JE, O'Connell NC, Hofmann AF, Lavine JE. Absence of bile acid conjugation: a new inborn error in bile acid metabolism. *Hepatology* 1996; 24(4 Pt 2): 371A.

29. Balistreri WF. Inborn errors of bile acid biosynthesis and transport: novel forms of metabolic liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:145-72.
30. Josephson B. The circulation of bile acids in connection with their production, conjugation and excretion. *Physiol Rev* 1941; 21:463-86.
31. Borgseroni B, Dahlgvist A, Lundt G, Sjovall J. Studies on intestinal digestion and absorption in the human. *J Clin Invest* 1957; 36:1521-36.
32. Redinger RN. The economy of the enterohepatic circulation of bile acids in the baboon. 2. Regulation of bile acid synthesis by enterohepatic circulation of bile acids. *J Lipid Res* 1984; 25:437-47.
33. Shefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH. Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J Lipid Res* 1970; 11:404-11.
34. Kowdley KV. Ursodeoxycholic acid therapy on hepatobiliary disease. *Am J Med* 2000; 108:481-6.
35. Trauner M, Graziadei IW. Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:979-96.
36. Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res* 2002; 43:2-12.
37. Chiang JYL. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocrinol Rev* 2002; 23:443-63.
38. Hofman AF. Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents: the intestinal components of the enterohepatic circulation and the integrated system. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York, NY: Raven Press, 1994:1845-65.
39. Fitzgerald ML, Moore KJ, Freeman MW. Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J Mol Med* 2002; 80:271-81.
40. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-40.
41. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11041-8.
42. Escriva H, Delaunay F, Laudet V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 2000; 22:717-27.

43. Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:11-23.
44. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-9.
45. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrinol Rev* 1994; 15:391-407.
46. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; 81:1269-304. Database of nuclear hormone receptors. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:364-8.
47. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrinol Rev* 1999; 20:689-725.
48. A unified nomenclature system for the nuclear receptor super-family. *Cell* 1999; 97:161-3.
49. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284:1362-5.
50. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284:1365-8.
51. Rosenfeld MG, Glass CK. Co-regulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001; 276:36865-8
52. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967:7-18.
53. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000; 289:1524-9.
54. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000; 275:28240-5.
55. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:507-12.
56. Luo Y, Liang CP, Tall AR. The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J Biol Chem* 2001; 276:24767-73.

57. Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXR_α and LXR_β. *J Biol Chem* 2001; 276:43018-24.
58. Kast R, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, et al. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma tri-glyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1720-8.
59. Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275:39313-7.
60. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 2001; 276:38378-87
61. Javitt NB. 25R, 26-Hydroxycholesterol revisited: synthesis, metabolism, and biologic roles. *J Lipid Res* 2002; 43:665-70.
62. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995; 9:1033-45.
63. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529:126-35.
64. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000; 6:507-15.
65. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995; 81:687-93.
66. Tu H, Okamoto AY, Shan B. FXR, a bile acid receptor and biological sensor. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:30-5.
67. Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor super-family. *Science* 240:889–895
68. Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM 1988 Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91–94
69. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J 1998 Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19:3–17
70. Giguere V 1994 Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61–79
71. Chambon P 1996 A decade of molecular biology of retinoic acid

72. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW 1998 The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273:12101–12108
73. Glass CK 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptors monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391–407
74. Mangelsdorf DJ, Evans RM 1995 The RXR heterodimers and or-phan receptors. *Cell* 83:841– 850
75. Langen, H., Berndt, P., Roder, D., Cairns, N., Lubec, G., Foun-toulakis, M., *Electrophoresis* 1999, 20 , 907–916.
76. Tugita, A., Kawakami, T., Uchida, T., Sakai, T., Kamo, M., Mat-sui, T., Watanabe, Y., Morimasa, T., Hosokawa, K., Toda, T., *Electrophoresis* 2000, 21 , 1853–1871.
77. O'Connell, K. L., Stults, J. T., *Electrophoresis* 1997, 18, 349-359.
78. Link, A. J., Hays, L. G, Carmack, E. B., Yates, III, J. R., *Electrophoresis* 1997, 18, 1314–1334.
79. Rasmussen, R. K., Ji, H., Eddes, J. S., Moritz, R. L., Reid, G. E., Simpson, R. J., Dorow, D. S., *Electrophoresis* 1997, 18, 588–598.
80. Corthals, G. L., Molloy, M. R, Herbert, B. R., Williams, K. L., Gooley, A. A., *Electrophoresis* 1997, 18, 317–323.
81. Patton, W. F., *J.Chromatogr.B* 1999, 722, 203–223.
82. Pasquali, C., Fialka, I., Huber, L. A., *J.Chromatogr.B* 1999, 722, 89–102.
83. Jung, E., Heller, M., Sanchez, J-C., Hochstrasser, D. F., *Electrophoresis* 2000, 21, 3369–3377.
84. Garin, J. G, Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J-F, Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., Desjardins, M., *J.Cell Biol.*2001, 152, 165–180.
85. Calvo, M., Enrich, C., *Electrophoresis* 2000, 21, 3386–3395.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τίτλος: ‘ Ο ρόλος της Μικρής Ετεροδιμερούς Συνεργού Πρωτεΐνης (Short Heterodimer Partner ή SHP) στο μεταβολισμό των χολικών οξέων’

Η βιοσύνθεση των χολικών οξέων λαμβάνει χώρα στο συκώτι και αποτελεί το κύριο μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού της χοληστερόλης.

Η αύξηση της συγκέντρωσης λίπους στον οργανισμό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης των χολικών οξέων από το συκώτι και κατά συνέπεια αυξάνεται και η πυκνότητα αυτών στο έντερο.

Στο έντερο με την επίδραση της μικροβιακής χλωρίδας μετατρέπονται σε δευτερογενή χολικά οξέα.

Ο ρυθμός της σύνθεσης των χολικών οξέων ρυθμίζεται από το ένζυμο υδροξυλάση της 7^α- χοληστερόλης (CYP7A1).

Τα χολικά οξέα ενεργοποιούν τον πυρηνικό υποδοχέα FXR ο οποίος συντελεί στην καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της υδροξυλάσης της 7 χοληστερόλης (CYP7A1). Το ένζυμο αυτό καταλύει το πρώτο και κινητικά καθοριστικό στάδιο στο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των χολικών οξέων από χοληστερόλη.

Το FXR προστατεύει με αυτό τον τρόπο τα ηπατικά κύτταρα από τη συσσώρευση χολικών οξέων. Η ενεργοποίηση του FXR με τη σύνδεση του χολικού οξέως επάγει τη μεταγραφή της SHP.

Η SHP είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας χωρίς περιοχή δέσμευσης για DNA, δρα ως συγκαταστολέας της σύνθεσης των χολικών οξέων και αλληλεπιδράει με μια σειρά πυρηνικών υποδοχέων.

Οι κύριοι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς που έχουν άμεση σχέση με την SHP είναι ο υποδοχέας του συκωτιού (LXR) και ο υποδοχέας της φαρνεζόλης (FXR)

Ποντίκια που στερούνται του γονιδίου της SHP παρουσιάζουν αυξημένη σύνθεση χολικών οξέων και απώλεια της ικανότητας καταστολής της έκφρασης της CYP7A1 με άμεσο αποτέλεσμα τα ποντίκια αυτά να πεθαίνουν σε δύο μήνες από ηπατικές παθήσεις.

SUMMARY OF FINAL WORK

Title: 'The role of the Small Heterodimer Partner or SHP in metabolism of bile acids'

The biosynthesis of bile acids takes place in the liver and constitutes the main metabolic path of catabolism of cholesterol.

The increase of concentration of fat in the organism has as result the increase of excretion of bile acids from the liver and accordingly is increased also the density of these in the intestine.

In the intestine with the effect of microbial flora they are changed in secondary bile acids.

The rate of composition of bile acids is regulated by the enzyme of hydroxylase of 7 α - cholesterol (CYP7A1).

The bile acids activate the nuclear receptor of FXR who contributes in the repression of transcription of gene of hydroxylase of the 7 α - cholesterol (CYP7A1). This is a liver specific enzyme that catalyzes the first and rate-limiting step in one of the two pathways for bile acid biosynthesis.

The FXR protects with this way the hepatic cells from accumulation of bile acids. The activation of FXR with the connection of bile acid induces the transcription of SHP.

The SHP is one orphan nuclear receptor lacks the DNA-binding domain acts as corepressor the composition of bile acids and interacted with a liver nuclear receptor.

Main nuclear hormonal receptors that have direct relation with the SHP of are the receptor of liver (LXR) and the receptor of farnesol (FXR)

Mice that are deprived the gene of SHP present increased composition of bile acids and loss of faculty of repression of expression of CYP7A1 with direct result this mice to die in two months from hepatic diseases.