

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής

Μεταπτυχιακή εργασία

**“Μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που συμμετέχουν στον
μεταβολισμό της HDL από πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών και
μέλη της οικογένειας Forkhead box (FOX)”**

Κανάκη Μαρία

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Καρδάσης
Επιτροπή: Χ. Τσατσάνης, Δ. Τζαμαρίας

Ιανουάριος 2011

*University of Crete
Department of Biology*

*Post-graduate Programme
Molecular Biology-Biomedicine*

Master Thesis

***“Negative cross talk between Forkhead box (FOX) and hormone
nuclear receptors: Implication for the regulation of genes
involved in HDL metabolism”***

Kanaki Maria

*Supervisor: Professor D. Kardassis
Committee: C. Tsatsanis, D. Tzamarias,*

January 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
SUMMARY	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
Η Αθηροσκλήρωση	10
Οι Λιποπρωτεΐνες	10
Η λιποπρωτεΐνη HDL.....	11
Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και προστατευτική δράση της HDL	12
Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αύξηση της HDL	14
Ο μεταφορέας ABCA1.....	15
Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου ABCA1.....	17
Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών	20
Υποδοχείς LXR.....	22
Βιολογικός ρόλος των υποδοχέων LXR	24
Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης.	25
Ηπατική έκκριση χοληστερόλης.	26
Απορρόφηση χοληστερόλης στο έντερο	26
De novo βιοσύνθεση χοληστερόλης.....	27
Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τους υποδοχείς LXRα και LXRβ	27
Πρωτεΐνες FOXA.....	29
Ο FOXA2 στον μεταβολισμό	31
Αλληλεπιδράσεις του παράγοντα FOXA2 με άλλες πρωτεΐνες	33

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
Υλικά.....	35
Μέθοδοι.....	37
<i>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ DNA</i>	37
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)	37
Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	37
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	38
Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	38
Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων DNA (Ligation).....	38
Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού «σοκ» (Transformation).....	38
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Mini Preparation)	39
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Midi Preparation)	39
<i>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i>	40
Καλλιέργεια ευκαρυωτικών ευκαρυωτικών κυττάρων	40
Παροδικές διαμολύνσεις ευκαρυωτικών κυττάρων (Διαμόλυνση με ίζημα φωσφορικού ασβεστίου)	40
Μετρήσεις ενζυματικής δραστηριότητας γονιδίων μαρτύρων	41
Συλλογή κύτταρων με Promega Lysis Buffer	41
Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της λουσιφεράσης.....	41
Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης	41
<i>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</i>	42
Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	42
Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με Promega Lysis Buffer	42
Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με Co-IP Lysis Buffer	42

Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με WCE Lysis Buffer	42
Απομόνωση και καθαρισμός GST-Χιμαιρικών πρωτεϊνών.....	43
Μέτρηση ποσότητας πρωτεϊνών (Bradford-Lawry)	43
Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	44
Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)	44
Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης	44
Ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών in vitro (GST pull down assay).....	45
Συν-ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation)	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
ΜΕΡΟΣ Α	46
Περίληψη πρόσφατων δεδομένων	46
Ο FOXA2 αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 από τους LXR/RXR (και τους συνδέτες τους), χωρίς να εμποδίζει την πρόσδεσή τους στο LXRE. ...	49
Κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-FOXA2 και έκφρασή της σε βακτήρια E. Coli	51
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXA2 και του πυρηνικού υποδοχέα LXRα.	53
Προσδιορισμός της περιοχής του FOXA2 που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα LXRα.	55
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παράγοντα FOXO1 και του πυρηνικού υποδοχέα LXRα.....	62
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXA2 και άλλων μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών.	64
Ο παράγοντας FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή των υποκινητών των γονιδίων ApoCIII και ApoA1.....	65
Μεταφορά των απαλοιφών του FOXA2 από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 στον φορέα pcDNA3-6myc.....	67

ΜΕΡΟΣ Β	70
Επαγωγή του γονιδίου του ABCA1 από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα και LXRβ/RXRα	70
Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων που παράγουν shRNA για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα , LXRβ και έλεγχος έκφρασης τους στα κύτταρα	72
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
Ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR/RXR <i>in vitro</i> και <i>ex vivo</i> και αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από τους συνδέτες τους	77
Ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά <i>in vitro</i> με πυρηνικούς υποδοχείς και αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-στόχων τους	80
Τα ετεροδιμερή πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα και LXRβ/RXRα επάγουν το γονίδιο του ABCA1	81
Ανεύρεση νέων γονιδίων στόχων των πυρηνικών υποδοχέων LXRα και LXRβ σε ηπατικά κύτταρα	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα και του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου. Το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην αύξηση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό της HDL, όπως τα γονίδια απολιποπρωτεϊνών, των μεταφορέων της χοληστερόλης και των ενζύμων αναδιαμόρφωσης της HDL. Όλα αυτά τα γονίδια φαίνεται να ρυθμίζονται από τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών και κυρίως από τους LXRs (Liver X Receptors). Σ' αυτά τα γονίδια ανήκει και ο μεμβρανικός μεταφορέας λιπιδίων ABCA1 ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση της HDL, προάγοντας την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα προς τη φτωχή σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνη A-I. Πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστήριου μας έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2, ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας forkhead box (FOX) μεταγραφικών παραγόντων, είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα. Προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και αναστέλλει τη βασική μεταγραφή του ABCA1 καθώς και την ενεργοποίηση του από τις οξυστερόλες μέσω των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η διαλεύκανση του κατασταλτικού μηχανισμού ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 και παρόμοιας ρύθμισης άλλων γονιδίων του μεταβολισμού της HDL από τον παράγοντα FOXA2 μέσω των πυρηνικών υποδοχέων LXR/RXR.

Με μια σειρά πειραμάτων αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro* (GST pull down assays) και *ex vivo* (Co-IPs), εξετάστηκε η αλληλεπίδραση του FOXA2 με τον πυρηνικό υποδοχέα LXRα. Διαπιστώθηκε, ότι ο LXRα, μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA και ενός τμήματος της A/B περιοχής, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα FOXA2, προκειμένου ο τελευταίος να αναστείλει την μεταγραφή του γονιδίου του ABCA1. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι ο LXRα αλληλεπιδρά *in vitro* και *ex vivo* με ένα άλλο μέλος της οικογένειας των Forkhead παραγόντων, τον FOXO1. Το κοινό στοιχείο μεταξύ των FOXA2 και FOXO1 είναι η ρύθμισή τους, μέσω φωσφορυλίωσης, από το μονοπάτι της ινσουλίνης και την κινάση AKT/PKB. Ακόμη, ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά και με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς και συγκεκριμένα με τους RARα, HNF4α, LXRβ, FXR, TRβ1 και RXRα. Το εύρημα αυτό σημαίνει ότι ο παράγοντας FOXA2 μπορεί να είναι ένας γενικότερος ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων-στόχων των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών και να εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από τους παράγοντες αυτούς. Σε απόδειξη αυτής της θεωρίας δείξαμε με πειράματα μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης, ότι ο FOXA2 καταστέλλει την επαγωγή των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών CIII και AI από τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα HNF4α.

Ένας δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κατασκευή πλασμιδιακών φορέων που παράγουν shRNAs για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα και LXRβ. Ο απώτερος στόχος είναι η ταυτοποίηση γονιδίων που ενεργοποιούνται επιλεκτικά από τον έναν ή τον άλλον υποδοχέα και η αξιοποίησή τους ως εργαλεία για την αύξηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα. Με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων που εκφράζουν φορείς έκφρασης για του υποδοχείς LXRα και LXRβ παρουσία ή απουσία των φορέων έκφρασης των shRNAs αποδείξαμε την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση των shRNAs που σχεδιάσαμε.

Συμπερασματικά, οι μελέτες της παρούσης εργασίας σκοπεύουν στο να αυξήσουν τις γνώσεις μας πάνω στους μηχανισμούς ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της λιποπρωτεΐνης HDL. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα οδηγήσει μελλοντικά στη δημιουργία νέων μορίων που θα αυξάνουν τα επίπεδα της HDL, και θα μειώνουν τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου.

Λέξεις-Κλειδιά: πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, FOXA2, FOXO1, κατασταλτική ρύθμιση, ABCA1, LXRα, LXRβ

SUMMARY

There is accumulating evidence that HDL levels in plasma are inversely related with the risk of developing coronary heart disease. Efforts are currently in progress to increase the expression of genes that are involved in the biosynthesis and metabolism of HDL, such as the apolipoproteins, the cholesterol and phospholipid transporters and the HDL remodeling enzymes. The transcriptional regulation of these genes is mediated mainly by members of the hormone nuclear receptor gene superfamily and especially by LXRs (Liver X Receptors). One of these LXR target genes is the ABCA1 transporter which plays a key role in the biogenesis of HDL by promoting the efflux of cellular cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoprotein A-I. Recent data from our laboratory show that the hepatic transcription factor FOXA2, which belongs to the forkhead box (FOX) family, is a negative regulator of ABCA1 gene transcription in hepatic cells. FOXA2 binds to the ABCA1 promoter and inhibits the induction of ABCA1 gene by LXRA/RXR α heterodimers and their ligands (oxysterols and retinoids).

The goal of the present master's thesis was to study the mechanism of inhibition of ABCA1 gene transcription, as well as of other genes that are implicated in HDL metabolism, by FOXA2. To achieve this goal, we investigated potential physical interactions between FOXA2 and the nuclear receptor LXRA by utilizing protein-protein interaction assays *in vitro* and *ex vivo*. We found that these transcription factors interact physically and this interaction may account for the negative cross talk between LXR and FOXA2 on the ABCA1 gene. The domain of LXRA that is responsible for the interaction with FOXA2 is the DNA binding domain plus an additional small region of the A/B domain. LXRA also interacts physically with FOXO1, which is another member of the FOX transcription factor family that resembles FOXA2 in its negative regulation by the insulin/AKT/PKB pathway.

Furthermore, we showed that FOXA2 interacts physically with other members of the nuclear receptor family such as RAR α , HNF4 α , LXR β , FXR, TR β 1, RXR α and may thus act as a general regulator of the activity of hormone nuclear receptors and their target genes. This was established by showing that FOXA2 inhibits apolipoprotein CIII and AI gene induction by HNF4 α .

A second goal of this thesis was the construction of plasmid vectors that express shRNAs for the nuclear receptors LXR α and LXR β . The ultimate goal is to identify genes that are specifically regulated by one or the other LXR isoform and their utilization as tools to increase plasma HDL levels.

Overall, understanding the mechanisms that regulate the expression of ABCA1 and of other genes involved in HDL metabolism, is anticipated to lead to the development of new molecules that will increase HDL levels and will decrease the risk of developing atherosclerosis and coronary heart disease.

Key words: nuclear hormone receptors, FOXA2, FOXO1, suppressive regulation, ABCA1, LXR α , LXR β

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση είναι η βασική αιτία πρόκλησης στεφανιαίας νόσου (Coronary Artery Disease, CAD) και εγκεφαλοαγγειακών ασθενειών, οι οποίες προκαλούν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας παγκοσμίως. Κατά την αθηροσκλήρωση το τοίχωμα των αρτηριών παχαίνει σταδιακά, σχηματίζοντας πλάκες πλούσιες σε λιπίδια (αθηρωματικές πλάκες), με αποτέλεσμα να στενεύει η κοιλότητα της αρτηρίας. Έτσι, μειώνεται η ποσότητα αίματος που παρέχεται στα όργανα, επηρεάζοντας κυρίως τη καρδιά και τον εγκέφαλο. Οι πλάκες μπορούν να σπάσουν απότομα, προκαλώντας ένα θρόμβο αίματος και συχνά έμφραγμα μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο¹. Κλινικές μελέτες που χρησιμοποιούν στατίνες, έχουν δείξει μείωση καρδιαγγειακών γεγονότων, εξαιτίας της μείωσης της LDL στο αίμα^{2,3}. Για να μειωθούν όμως τα καρδιαγγειακά περιστατικά πάνω από 20-25%, δεν αρκεί η μείωση της LDL. Υπάρχει επομένως, μεγάλο ενδιαφέρον για θεραπευτικά μέσα που στοχεύουν άλλους παράγοντες κινδύνου.

Οι Λιποπρωτεΐνες

Για να μεταφερθεί η χοληστερόλη και άλλα λιπίδια στο αίμα, πρέπει πρώτα να πακεταριστούν σε υδατοδιαλυτά, σφαιρικά σωματίδια που ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. Αυτά τα σωματίδια είναι σύμπλοκα λιπιδίων και συγκεκριμένων πρωτεϊνών και ο μεταβολισμός τους σχετίζεται με την έναρξη και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Οι τέσσερις κύριοι πληθυσμοί λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα είναι τα χυλομικρά (chylomicrons, CM), οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας VLDL (Very Low-Density Lipoproteins), οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας LDL (Low-Density Lipoproteins) και οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας HDL (High-density lipoproteins). Κάθε λιποπρωτεΐνη έχει διαφορετική σύνθεση λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες (πίνακας 1)^{4,5}. Τα τριγλυκερίδια και οι εστέρες χοληστερόλης βρίσκονται στον πυρήνα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και περιβάλλονται από μια μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων και μη εστεροποιημένης χοληστερόλης. Στην επιφάνεια των σωματιδίων τοποθετούνται επίσης οι απολιποπρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για τη δομική ακεραιότητα των λιποπρωτεϊνών και ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις με ένζυμα, μεταφορείς λιπιδίων και κυτταρικούς υποδοχείς⁶.

Τα μεγαλύτερα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια είναι τα χυλομικρά που είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια. Εκκρίνονται από τα εντερικά κύτταρα και μεταφέρουν το λίπος της τροφής στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Λιπίδια που λαμβάνονται ή συντίθεται από το ήπαρ, ανακατανέμονται σε άλλα όργανα μέσω των VLDL και LDL. Η LDL είναι

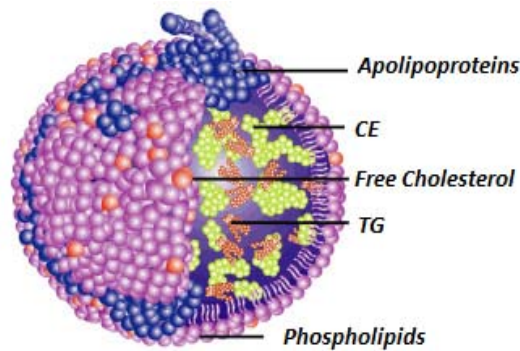
αποτέλεσμα του ενδοαγγειακού καταβολισμού της VLDL και περιέχει περισσότερη χοληστερόλη και λιγότερα τριγλυκερίδια. Η περίσσεια χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς, μεταφέρεται μέσω της HDL στο ήπαρ για έκκριση από τη χολή⁷.

Πίνακας 1. Η σύσταση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (δεδομένα από αναφορά⁸)

Lipoproteins	Apoproteins	Diameter, nm	Density, g/mL	Dry weight, ~%			
				prot	TG	CH	PL
chylomicrons	B48, AI, AII, AIV	50-200	<1.006	2	85	4	9
VLDL	B100, C, E	30-70	0.95-1.006	10	50	20	20
LDL	B100	20-25	1.006-1.063	25	10	45	20
HDL	AI, AII	8-11	1.063-1.210	55	5	15	25

Η λιποπρωτεΐνη HDL

Η HDL συντίθεται κυρίως (~80%) στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό (~20%) στο έντερο^{9,10}. Είναι η μικρότερη λιποπρωτεΐνη και αποτελείται από σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 5-15 nm. Περιέχει τη μικρότερη ποσότητα λιπιδίων, καθώς αποτελείται από περίπου 50% απολιποπρωτεΐνες και 50% λιπίδια. Ο εσωτερικός πυρήνας της περιέχει μη πολικά λιπίδια, εστέρες χοληστερόλης (15%) και μια μικρή ποσότητα τριγλυκεριδίων (5%). Στην επιφάνεια βρίσκονται πολικά λιπίδια όπως φωσφολιπίδια (25%) και απολιποπρωτεΐνες (55%). Το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL είναι η απολιποπρωτεΐνη A-I (ApoA-I, 70%) και έπειτα η απολιποπρωτεΐνη A-II (ApoA-II, 20%), ενώ άλλες απολιποπρωτεΐνες (apoE, apoA-IV, apoC και apoD¹¹ αποτελούν μικρό ποσοστό. Περίπου 60 άλλες μη-δομικές πρωτεΐνες σχετίζονται με την HDL, αλλά ο ρόλος τους δεν είναι γνωστός¹². Ανάλογα με το σχήμα, τα σωματίδια της HDL χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες : 1) προδρομη-β2 HDL (pre- β2 HDL, μικρό, φτωχό σε λιπίδια σωματίδιο), 2) δισκοειδές σωματίδιο (αποτελείται από φωσφολιπίδια και apoA-I), και 3) α-HDL (μεγάλο, ώριμο, σφαιρικό σωματίδιο). Τα σωματίδια επίσης ποικίλουν ανάλογα με τη σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες (Apo-I HDL, Apo-I/Apo-II HDL, Apo-II HDL) και το μέγεθος (HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c)¹³.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός σωματιδίου HDL (CE: Cholesterol esters, TG: Triglycerides)¹⁴

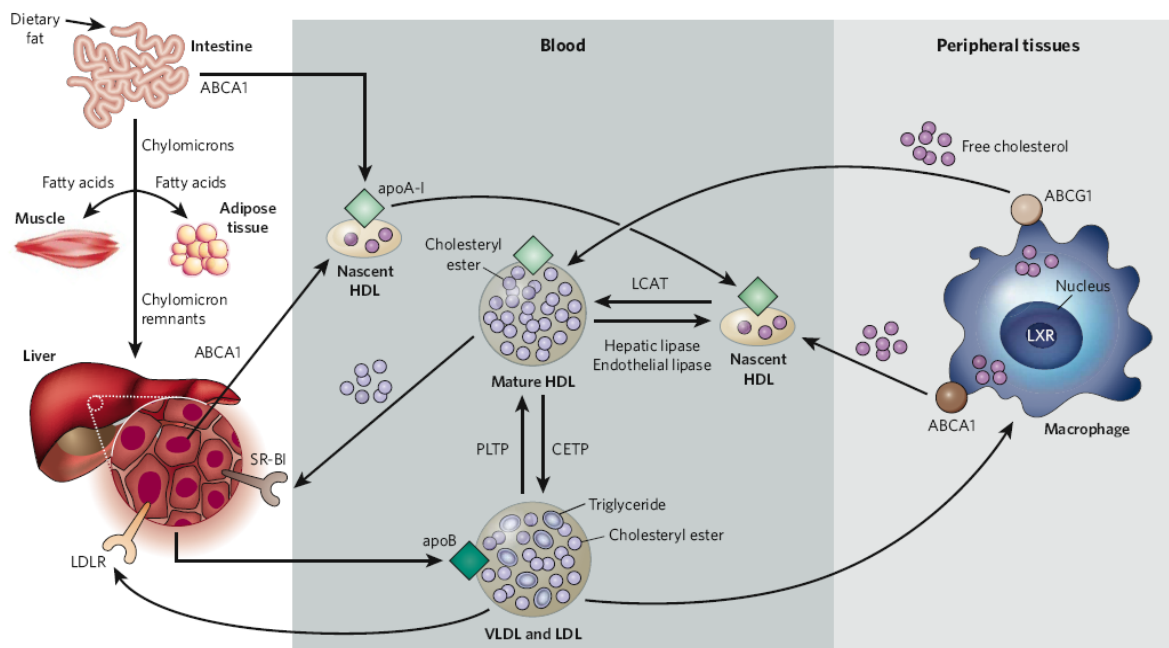
Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και προστατευτική δράση της HDL

Σε αντίθεση με την LDL, η συγκέντρωση της HDL στο πλάσμα έχει αντίστροφη σχέση με το κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης. Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η αύξηση των επιπέδων της LDL και η μείωση των επιπέδων της HDL (ή της Apo-I) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο^{15,16}, ενώ υψηλά επίπεδα της HDL φαίνεται να προστατεύουν από τη στεφανιαία νόσο¹⁵⁻²⁰. Σύμφωνα με μελέτες, μείωση της συγκέντρωσης της HDL κατά 1mg/dL, σχετίζεται με 2-3% αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές ασθένειες. Επιπλέον, αύξηση της HDL κατά 1mg/dL, σχετίζεται με 6% μειωμένο κίνδυνο θανάτου εξαιτίας καρδιαγγειακών ασθενειών, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της LDL^{21,22}.

Φαίνεται λοιπόν ότι η HDL προστατεύει από την αθηροσκλήρωση μέσω διαφόρων μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένης της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης και μηχανισμών ανεξάρτητων της χοληστερόλης²³. Η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (reverse cholesterol transport, RCT) περιλαμβάνει τη μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης μέσω της HDL από τα αφρώδη μακροφάγα (foam cells) των περιφερικών ιστών, προς το ήπαρ, με ακόλουθο καταβολισμό της χοληστερόλης ή έκκρισή της στη χολή²⁴. Στα τοιχώματα των αγγείων εστέρες χοληστερόλης που αποθηκεύονται στα μακροφάγα μπορούν να μετατραπούν σε ελεύθερη χοληστερόλη μέσω της υδρολάσης εστέρων χοληστερόλης, ενώ η ακυλοτρανσφεράση χοληστερόλης μπορεί να εστεροποιήσει τη χοληστερόλη μέσα στα μακροφάγα και να δημιουργήσει αθηρωματικά αφρώδη κύτταρα.

Η ApoAI εκκρίνεται από το ήπαρ και το έντερο ελεύθερη λιπιδίων, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ABCA1 (Adenosine triphosphate binding cassette transporter A1) που βρίσκεται στα ηπατοκύτταρα και στα μακροφάγα και αποκτά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη σχηματίζοντας τα δισκοειδή σωματίδια της HDL (pre-β-HDL)²⁵. Με τη βοήθεια της LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase), η χοληστερόλη των πρόδρομων HDL σωματιδίων μετατρέπεται σε εστέρες σχηματίζοντας ώριμη σφαιρική α-HDL (HDL₃ και HDL₂). Τα σφαιρικά σωματίδια μπορούν να προκαλέσουν

επιπλέον εκροή χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς μέσω του μεταφορέα ABCG1 των μακροφάγων. Η ώριμη HDL έχει δυο πιθανά μεταβολικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει. Στο *άμεσο μονοπάτι*, εστέρες χοληστερόλης που βρίσκονται στο σωματίο της HDL λαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω του υποδοχέα SR-B1 (Scavenger receptor type B1) και ακολούθως εκκρίνονται στη χολή^{24,26}. Κατά το *έμμεσο μονοπάτι*, εστέρες χοληστερόλης της HDL ανταλλάσσονται με τριγλυκερίδια των LDL, VLDL (σωματιδίων πλούσιων σε ApoB), μέσω της δράσης της πρωτεΐνης CETP (cholesterol ester transfer protein). Ακολούθως, οι εστέρες χοληστερόλης στα σωματίδια LDL, VLDL προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω του υποδοχέα της LDL (LDLR), ώστε να καταβληστούν και να εκκριθούν στη χολή. Αυτή η διαδικασία είναι υπεύθυνη για το 50% της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Η πλούσια σε τριγλυκερίδια HDL υδρολύεται από την ηπατική λιπάση για να σχηματιστούν μικρά HDL σωματίδια, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ξανά στη μεταφορά χοληστερόλης²⁴. Ακόμη, μεταφέρονται φωσφολιπίδια από τα σωματίδια LDL, VLDL προς την HDL μέσω της πρωτεΐνης PLTP (phospholipid transfer protein) (εικόνα 2)⁴. Η εκροή της χοληστερόλης από τα αφρώδη κύτταρα με τη μεσολάβηση της HDL ή των απολιποπρωτεϊνών της, έχει καθοριστικό ρόλο στη πρόληψη και αντιστροφή της αθηροσκλήρωσης, αφού, παρεμποδίζεται η υπερφόρτωση των μακροφάγων με χοληστερόλη, ο επακόλουθος θάνατός τους και η εξωκυττάρια εναπόθεση χοληστερόλης στα αρτηριακά τοιχώματα^{24,27}.



Εικόνα 2. Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και το μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. (VLDLs: very-low-density lipoproteins, LDLs: low-density lipoproteins, LDLR: LDL receptor, HDLs: high-density lipoproteins, LCAT: lecithin cholesterol acyltransferase, CETP: cholesteryl ester transfer protein, PLTP: phospholipid transfer protein, ABCA1: Adenosine triphosphate binding cassette transporter A1, SR-B1: Scavenger receptor type B1)⁴.

Η HDL εκτός από τον κύριο ρόλο της στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, έχει και άλλες βιολογικές ιδιότητες που συνεισφέρουν στην προστατευτική επίδραση κατά της αθηροσκλήρωσης^{21,23,28}. Με την αντι-οξειδωτική δράση της, η HDL προστατεύει και αναστρέφει την οξείδωση της LDL, ένα πρόωρο γεγονός κατά το σχηματισμό αθηροματικών πλακών, που προκαλεί και φλεγμονή στα αρτηριακά τοιχώματα²⁹⁻³¹. Η HDL προάγει τη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide ή NO) στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του ενζύμου eNOS (endothelial nitric oxide synthase) με διάφορους μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν και την αλληλεπίδραση της HDL με τον SR-B1. Έτσι, αυξάνεται η διαθεσιμότητα σε μονοξείδιο του αζώτου^{32,33}, το οποίο είναι το κύριο αγγειοδιασταλτικό επηρεάζοντας το ενδοθήλιο και τον λείο αγγειακό μυ³⁴. Ακόμη, η HDL, με τις αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητές της, εμποδίζει την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (ιντερλευκίνη 1β μακροφάγων και λευκοκυττάρων)³⁵⁻³⁸. Περίπου 50 διαφορετικές πρωτεΐνες βρίσκονται στο σωματίδιο της HDL, οι οποίες δεν είναι απολιποπρωτεΐνες αλλά εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονής¹². Η HDL επιπλέον έχει πολλαπλές αντιθρομβωτικές δράσεις, που περιλαμβάνουν την μείωση δημιουργίας της θρομβίνης και την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων. Ακόμα, προωθεί τη ροή του αίματος, αυξάνοντας την ελευθέρωση NO και τη παραγωγή προστακυκλίνης. Το NO και η προστακυκλίνη συνεργάζονται ώστε να επάγουν τη χαλάρωση του λείου αγγειακού μυ και να αναστείλουν την έκφραση αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν τον τοπικό πολλαπλασιασμό κυττάρων του λείου αγγειακού μυ^{32,36,39}.

Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αύξηση της HDL

Οι υπάρχουσες φαρμακολογικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αύξηση των επιπέδων της HDL, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: εκείνες που αυξάνουν ή τροποποιούν τα επίπεδα των συστατικών της (χοληστερόλη, ApoAI, φωσφολιπίδια) και εκείνες που ενισχύουν την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι στατίνες και το νικοτινικό οξύ (nicotinic acid-niacin). Οι στατίνες αυξάνουν τη σύνθεση της ηπατικής ApoAI και του πυρηνικού υποδοχέα PPAR-α (peroxisome proliferator activated receptor), ενώ μειώνουν τη παραγωγή της CETP με αποτέλεσμα να αυξάνουν τα επίπεδα της HDL κατά 5-15%⁴⁰⁻⁴⁴. Το νικοτινικό οξύ αυξάνει τη σύνθεση της pre-β-HDL και μειώνει τον καταβολισμό της ηπατικής ApoAI. Έτσι μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της HDL κατά 20-30%, να μειώσει τα τριγλυκερίδια κατά 40-50% και την LDL κατά >20%⁴⁵⁻⁵⁰. Παρόλα αυτά η ευρεία χρήση του νικοτινικού οξέος έχει περιοριστεί εξαιτίας των ανεπιθύμητων παρενεργειών (ναυτία, κνησμός, έμετος, αυξημένο ουρικό οξύ, αρρυθμία, ηπατική τοξικότητα κ.α.).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι φιβράτες (fibrates) οι οποίες σαν αγωνιστές του PPAR-α, επάγουν την έκφρασή του, και αυξάνουν την σύνθεση της ApoAI και

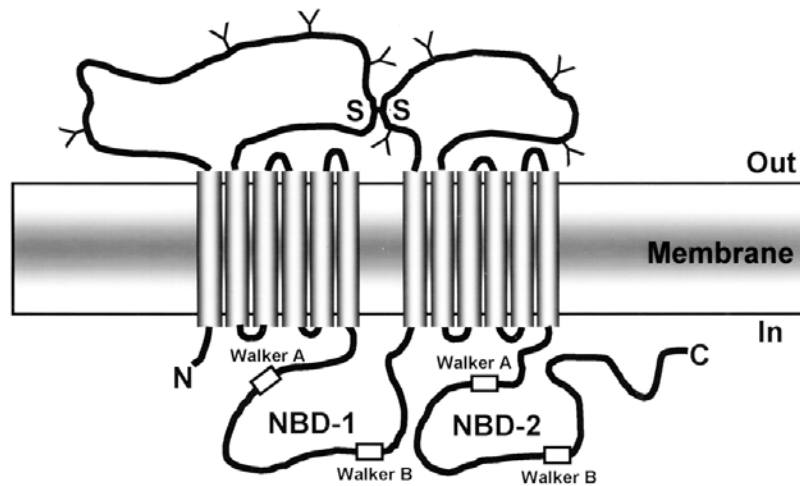
της ApoCIII^{51,52}. Έτσι, αυξάνουν τα επίπεδα της HDL κατά 10-20%, μειώνουν τα τριγλυκερίδια κατά 40-50% και την LDL κατά 10-15%^{17,18}. Επίσης, μελέτες σε ηπατοκύτταρα ποντικών δείχνουν καταστολή του ηπατικού SR-B1 σε θεραπεία με φιμπράτες, που οδηγεί σε μειωμένη «εκκαθάριση» της HDL και σε αυξημένα επίπεδά της στο πλάσμα⁵³.

Διάφορες νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στην αύξηση της HDL, είναι ήδη σε κλινική εξέλιξη. Αυτές περιλαμβάνουν αναστολείς της CETP, αγωνιστές των PPAR- α , γ , δ , ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων LXR (Liver X Receptor), FXR (Farnesoid X Receptor) και του SR-B1. Ακόμη, δοκιμάζονται θεραπείες που βασίζονται στην ApoA1 ή/και στα φωσφολιπίδια, όπως έγχυση σωματιδίων με φωσφολιπίδια ή συνθετικά φωσφολιπίδια και η έγχυση ανασυνδυασμένων συμπλόκων φωσφολιπιδίων /ApoA1 (rHDL) ή μιμητικά ApoA1 πεπτίδια^{54,55}.

Ο μεταφορέας ABCA1

Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεμβρανικό μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter, sub-family A, member 1), βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (χρωμόσωμα 9q31.1) και αποτελείται από 50 εξόνια. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 2261 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ~240 KDa⁵⁶. Ο ABCA1, έκτος από την πλασματική μεμβράνη, εντοπίζεται και σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα⁵⁷ όπου θα μπορούσε να διευκολύνει τη μεταφορά λιπιδίων στην κυτταρική επιφάνεια ή σε απολιποπρωτεΐνες που έχουν εισέλθει στο κύτταρο.

Ο ABCA1 είναι μέλος της υπερ-οικογένειας των ABC μεταφορέων που χρησιμοποιούν ATP ως πηγή ενέργειας για τη μεταφορά των λιπιδίων και άλλων μεταβολιτών δια μέσου των μεμβρανών⁵⁸. Αποτελείται από 2 μισά παρόμοιας δομής που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα. Κάθε μισό έχει μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (nucleotide binding domain, NBD) που περιέχει 2 συντηρημένα πεπτιδικά μοτίβα γνωστά ως Walker A και Walker B, τα οποία υπάρχουν σε πολλές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν ATP. Ακόμα, κάθε μισό έχει μία διαμεμβρανική περιοχή που περιέχει έξι έλικες. Ο ABCA1 έχει το αμινοτελικό άκρο (N-terminus) προσανατολισμένο στο κυτταρόπλασμα και 2 μεγάλους εξωκυτταρικούς βρόγχους που είναι αρκετά γλυκοζυλιωμένοι και συνδέονται με ένα ή περισσότερους δισουλφιδικούς δεσμούς (εικόνα 3)^{59,60}.



Εικόνα 3. Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα ABCA1. Τα Y υποδεικνύουν θέσεις γλυκοζυλίωσης και τα S-S υποδεικνύουν δισουλφιδικούς δεσμούς. (NBD-1/2: Nucleotide binding domains 1/2)⁶¹

Ο ABCA1 μέσω του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης μεσολαβεί στη μεταφορά της περίσσειας της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα σε απολιποπρωτεΐνες φτωχές σε λιπίδια, όπως η ApoA-I, που διαφορετικά θα μπορούσε να συσσωρευτεί σαν ενδοκυτταρικές λιπιδικές σταγόνες και να δημιουργηθούν αθηρωματικές πλάκες (εικόνα 2)⁶². Έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα λειτουργίας του ABCA1 (π.χ. μοντέλο εξωκύτωσης⁶³, ανάδρομης ενδοκύτωσης^{64,65}) αλλά ακόμα δεν είναι ξεκάθαρος ο μηχανισμός δράσης του. Ωστόσο, η κρυσταλλογραφική ανάλυση του βακτηριακού μεταφορέα ABC⁶⁶ προτείνει ένα πιθανό μοντέλο για το μονοπάτι απολιποπρωτεϊνών-ABCA1. Η περίσσεια χοληστερόλης ίσως συσσωρεύεται σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης προς το κυτταρόπλασμα, όπου η χοληστερόλη τείνει να κατανέμεται. Επειδή εκεί η χοληστερόλη δεν είναι προσβάσιμη στις απολιποπρωτεΐνες, πρέπει να μετατοπιστεί προς την επιφάνεια του κυττάρου για να αφαιρεθεί. Αυτές οι λιπιδικές περιοχές ίσως συναρμολογούνται κοντά στα μόρια του ABCA1 ή ο ABCA1 ίσως μετακινείται σε αυτές τις περιοχές αφού σχηματιστούν. Εκεί, ο ABCA1 σχηματίζει ένα κανάλι που προωθεί την μετακίνηση των λιπιδίων από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης προς την εξωτερική μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από ATP⁶³. Αφού λοιπόν προσδεθεί η ApoA-I στον ABCA1, λιπιδιώνεται και σχηματίζεται η πρώιμη HDL στο εξωκυττάριο περιβάλλον^{67,68}.

Μεταλλάξεις στον μεταφορέα ABCA1 προκαλούν ένα σπάνιο και σοβαρό σύνδρομο, την ασθένεια Tangier (Tangier disease, TD)⁶⁹⁻⁷³. Οι μεταλλάξεις αυτές κατανέμονται σε όλη τη πρωτεΐνη, αλλά κυρίως στη περιοχή πρόσδεσης ATP και στο αμινοτελικό άκρο^{74,75}. Εξαιτίας του ελαττωματικού ABCA1, οι απολιποπρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων δεν μπορούν να αφαιρέσουν τη χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια από τους ινοβλάστες ασθενών με TD^{76,77}. Έτσι, οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλά επίπεδα HDL στο πλάσμα και συσσώρευση

χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης στα μακροφάγα αφρώδη κύτταρα στις αμυγδαλές, στον θύμο αδένα, στο ήπαρ, στη σπλήνα, στον μυελό των οστών, στη χοληδόχο κύστη και σε άλλους ιστούς⁷⁶. Ποντίκια με απαλοιφή (knock out) του γονιδίου ABCA1 στο ήπαρ παρουσιάζουν έλλειψη της HDL και μειωμένη εκροή χοληστερόλης (φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των ασθενών Tangier^{9,78,79,80}). Αντίστροφα, η υπερέκφραση του ABCA1 στο ήπαρ ποντικών, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα^{81,82}. Ακόμη, η επιλεκτική αδρανοποίηση του γονιδίου ABCA1 στα μακροφάγα είχε μικρή ή καθόλου επίδραση στη συγκέντρωση της HDL στο πλάσμα και σημαντική αύξηση της αθηροσκλήρωσης⁸³. Ως εκ τούτου, η έκφραση του ABCA1 στο ήπαρ είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας για τη παραγωγή HDL στο πλάσμα, ενώ τα μακροφάγα έχουν μικρή επίδραση στα επίπεδα HDL στο πλάσμα. Παρόλα αυτά, ο ABCA1 των μακροφάγων είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την πρόληψη της υπερβολικής συσσώρευσης χοληστερόλης στα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος και στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα.

Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου ABCA1

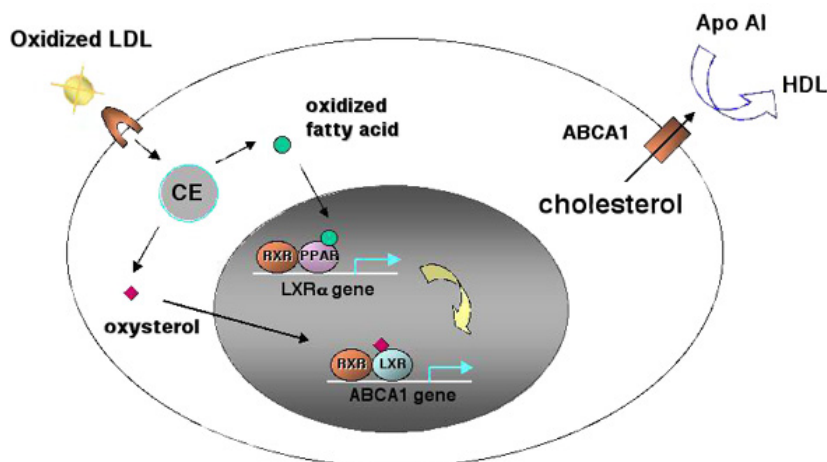
Ο ABCA1 εκφράζεται παντού, με υψηλά επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στα μακροφάγα, στα ηπατικά κύτταρα, στα κύτταρα του νεφρού, του εντέρου και του εγκέφαλου, στον αδένα του επινεφριδίου, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους τροφοβλάστες του πλακούντα⁸⁴⁻⁸⁶. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση των λιπιδίων, η έκφραση του ABCA1 ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Το τμήμα του υποκινητή -200 ως -80 bp σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής περιέχει μοτίβα πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του ABCA1 κυρίως σε απόκριση σε οξειδωμένη χοληστερόλη (οξυστερόλη) και κυκλικό AMP (cAMP)⁵⁶. Έτσι, η μεταγραφή του ABCA1 επάγεται σημαντικά από την υπερφόρτωση των κυττάρων με χοληστερόλη και μειώνεται από την ακόλουθη αφαίρεση χοληστερόλης από την ApoA-I⁷¹. Αυτή η επαγωγή συμβαίνει αποκλειστικά μέσω της ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων LXRα ή LXRβ (Liver X Receptor) και RXR (Retinoid X Receptor). Ο LXR και ο RXR σχηματίζουν ετεροδιμερή που δεσμεύονται στον υποκινητή του ABCA1 και στο πρώτο ιντρόνιο του, σε θέσεις DR4 (direct repeat- nuclear receptor binding site, βλ. παρακάτω). Οι LXRs και RXRs δεσμεύουν και ενεργοποιούνται από οξυστερόλες και ρετινοϊκό οξύ, αντίστοιχα. Η πρόσδεση του ενός ή και των δύο συνδεδωμένων μπορεί να επάγει τη μεταγραφή του ABCA1, αλλά ο συνδυασμός τους έχει συνεργατική δράση⁸⁷⁻⁸⁹. Ο υποκινητής του γονιδίου LXRα περιέχει επίσης ένα στοιχείο απόκρισης στους LXRs^{90,91}, υποδεικνύοντας ότι ο LXRα μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του ίδιου του γονιδίου του (μηχανισμός αυτο-ρύθμισης). Με τον

μηχανισμό αυτό ενισχύεται η δράση των οξυστερολών στο μονοπάτι εκροής λιπιδίων μέσω του μεταφορέα ABCA1.

Για να επάγει την έκφραση του γονιδίου ABCA1, η χοληστερόλη πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε οξυστερόλες, οι οποίες θα σηματοδοτήσουν τη συσσώρευση της περίσσειας χοληστερόλης στη μεμβράνη. Πολλές από τις οξυστερόλες παράγονται από ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, που είναι κυρίαρχα στο ήπαρ, με τις 22-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, και 24,25-epoxycholesterol να είναι οι κύριοι φυσικοί αγωνιστές των LXRs⁹². Στα μακροφάγα ο κύριος φυσικός αγωνιστής για τον LXRα και τον LXRβ είναι η 27-hydroxycholesterol, η οποία παράγεται από το ένζυμο sterol 27-hydroxylase (Cyp27)⁹³. Επομένως, η εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCA1 φαίνεται να μεσολαβείται εν μέρει από τους LXR και RXR.

Το κυκλικό AMP (cAMP, Cyclic adenosine monophosphate) ενεργοποιεί την έκφραση του ABCA1 αλλά και τη φωσφορυλίωσή του στα μακροφάγα⁹⁴⁻⁹⁶. Η απολιποπρωτεΐνη A-I ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω cAMP, και έπειτα ενεργοποιείται η κινάση PKA (protein kinase A), η οποία φωσφορυλιώνει τον ABCA1 στις σερίνες 1042 και 2054. Έτσι αυξάνεται η παρουσία του ABCA1 στην κυτταρική μεμβράνη και η ενεργότητα του, μεταφέροντας χοληστερόλη έξω από το κύτταρο⁹⁵. Ακόμα, η κινάση JAK2 (Janus kinase 2) φωσφορυλιώνει τον ABCA1, αυξάνοντας τη πρόσδεση με την Apo A-I και την εκροή της χοληστερόλης^{97,98}.

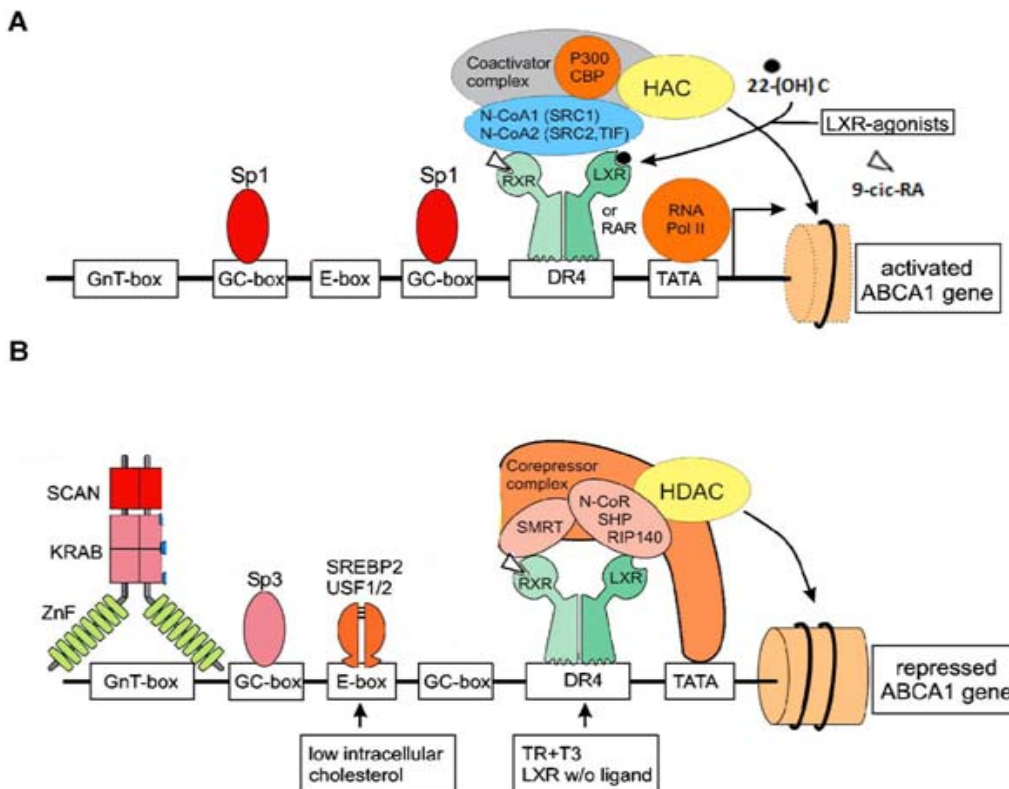
Μελέτες έχουν δείξει ακόμη ότι αγωνιστές των PPARα και PPARγ (όπως λιπαρά οξέα) επάγουν την έκφραση του ABCA1 και την εκροή της χοληστερόλης που μεσολαβείται από την ApoA-I, σε φυσιολογικά μακροφάγα, αλλά όχι σε μακροφάγα από ασθενείς με την νόσο Tangier. Από αυτούς τους αγωνιστές επάγεται ακόμη και ο LXRα, ενώ η προσθήκη ενεργοποιητών των PPAR και LXRα έχει συνεργατική δράση στην έκφραση του ABCA1. Παρόλα αυτά δεν έχει προσδιοριστεί κάποιο λειτουργικό ρυθμιστικό στοιχείο για τον PPAR στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Έτσι, φαίνεται ότι οι αγωνιστές των PPARs ίσως έμμεσα ενισχύουν την έκφραση του ABCA1, ενεργοποιώντας πρώτα το LXRα μονοπάτι (εικόνα 4)^{99,100}.



Εικόνα 4. Μοντέλο για το ρόλο των PPAR και LXR στην εκροή χοληστερόλης στα μακροφάγα¹⁰⁰

Κάποιες κυτοκίνες φαίνεται να ρυθμίζουν την μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 σε μακροφάγα και κύτταρα ηπατώματος. Αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και ο TGF-β1 (Transforming growth factor beta 1) επάγουν την μεταγραφή του ABCA1, και ενισχύουν την εκροή χοληστερόλης¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Αντίθετα, οι κυτοκίνες ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) αναστέλλουν την έκφραση του ABCA1, μέσω των μονοπατιών JAK/STAT και NF-κβ, αντίστοιχα¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Επίσης, κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες, καταστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου ABCA1. Σε αυτούς ανήκουν οι USF 1 και USF2 (upstream regulatory factors) που προσδέονται στο E-box μοτίβο του υποκινητή και ο Fra2 (fos-related gene) που προσδέεται στο μοτίβο AP-1¹⁰⁹. Ακόμη, ο ZNF202 (Zinc finger 202) προσδέεται σε επαναλήψεις GnT του υποκινητή και καταστέλλει την μεταγραφική έκφραση του ABCA1^{110,111}. Η πρωτεΐνη SP1 (η οποία διαθέτει δακτυλίους ψευδαργύρου) προσδέεται σε μοτίβα GnC και φαίνεται να έχει ενεργοποιητική δράση στον ABCA1, σε αντίθεση με την SP3, που είναι ανταγωνιστής της SP1 (εικόνα 5)¹¹².

Εκτός από μεταγραφική ρύθμιση, ο ABCA1 υπόκειται και σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Ακόρεστα λιπαρά οξέα ή κυτταροτοξικά επίπεδα ελεύθερης χοληστερόλης στα μακροφάγα, αυξάνουν την ήδη γρήγορη (χρόνος ημιζωής 1-2 ώρες) αποικοδόμηση του ABCA1^{113,114}. Αντίθετα, οι απολιποπρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων, φαίνεται να σταθεροποιούν τον ABCA1¹¹⁵.

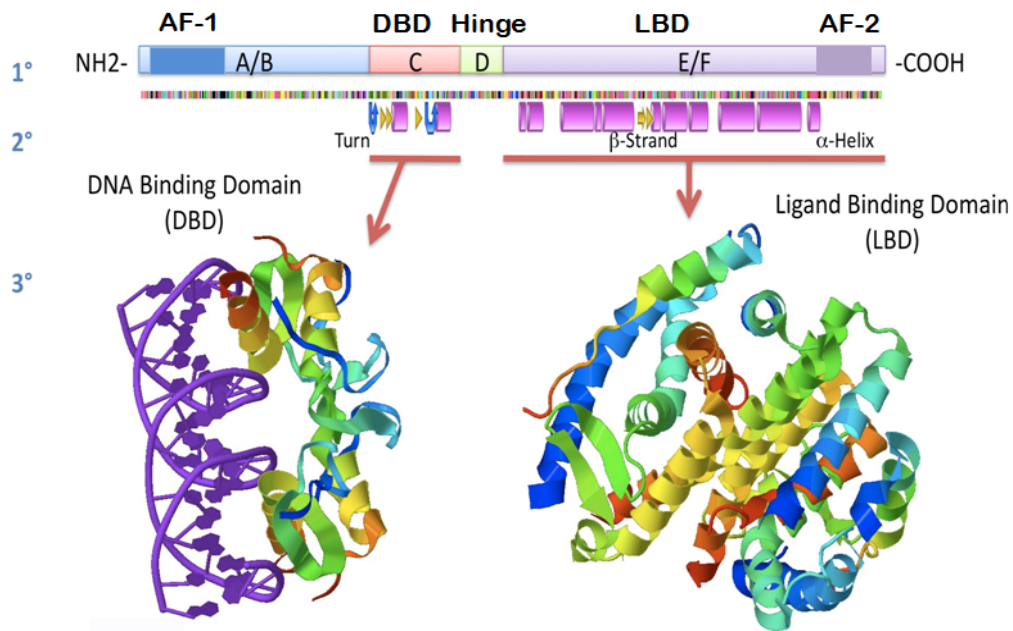


Εικόνα 5. Μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του ABCA1. (Α) Μεταγραφικοί ενεργοποιητές και (Β) καταστολείς, που προσδέονται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1¹⁰⁹

Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι ενδοκυττάριοι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων, αποκρινόμενοι σε λιπόφιλα μόρια (στεροειδή, ρετινοειδή, ορμόνες θυρεοειδούς, βιταμίνη D). Επηρεάζουν μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών, όπως τον μεταβολισμό λιπαρών οξέων, την κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την αποτοξίνωση από ξένες ουσίες¹¹⁶⁻¹²⁰. Πολλοί πυρηνικοί υποδοχείς δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από συνδέτες αλλά η μεγαλύτερη πλειοψηφία γνωστών υποδοχέων κλωνοποιήθηκαν πριν ανακαλυφθεί κάποιος συνδέτης τους και γι αυτό ταξινομήθηκαν σαν “ορφανοί” υποδοχείς (LXRα/b, FXRα/b, LHR-1, HNF4α, RXR)¹²¹. Όμως, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί ενδογενείς συνδέτες (προϊόντα μεταβολισμού λιπιδίων, λιπαρά οξέα, χολικά οξέα, παράγωγα χοληστερόλης) για κάποιους ορφανούς υποδοχείς^{122,123}.

Η δομή των πυρηνικών υποδοχέων είναι πολύ συντηρημένη και αποτελείται από πέντε δομικά στοιχεία. Η αμινοτελική περιοχή των υποδοχέων (περιοχή A/B) έχει λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-1 (activation function 1) που είναι ανεξάρτητη από συνδέτες. Η αλληλουχία και το μήκος της A/B περιοχής είναι αρκετά μεταβλητή μεταξύ των υποδοχέων (πχ GR, RXR) και μεταξύ των ισομορφών τους (RXRα, RXRβ), ενώ περιέχει ποικιλία αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από κινάσες και γι αυτό η περιοχή αυτή φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τις ειδικές επιδράσεις σε κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά είδη. Οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες-ρυθμιστικά στοιχεία ορμονών (HRE-Hormone response elements) των υποκινητών των γονιδίων στόχων, μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (περιοχή C ή DBD) η οποία αποτελείται από δύο δακτυλίους ψευδαργύρου και είναι η πιο συντηρημένη περιοχή. Η περιοχή D (ή αλλιώς hinge περιοχή εξαιτίας της ευκαμψίας της), επιτρέπει δομικές αλλαγές στη πρωτεΐνη, αμέσως μετά τη πρόσδεση του συνδέτη. Αυτή η περιοχή περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού και επηρεάζει την ενδοκυτταρική μεταφορά των πυρηνικών υποδοχέων. Η αλληλουχία της περιοχής πρόσδεσης του συνδέτη (LBD-ligand binding domain ή E περιοχή), ποικίλει ανάλογα με τον υποδοχέα, αλλά όλοι οι υποδοχείς έχουν μια κοινή δομή 11-13 α-ελίκων οργανωμένων γύρω από ένα υδρόφοβο πυρήνα, τα αμινοξέα του οποίου καθορίζουν την ειδικότητα των συνδετών (στεροειδή ορμόνες, ρετινοειδή, κλπ). Επίσης, η περιοχή αυτή απαιτείται για τον διμερισμό των υποδοχέων (ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό) και περιλαμβάνει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2 (activation function 2) που εξαρτάται από τον συνδέτη και ενεργοποιεί τη μεταγραφή μετά από πρόσδεση του συνδέτη^{116,117}. Η καρβοξυτελική περιοχή F, έχει αναφερθεί ως κατασταλτική περιοχή σε ορισμένους πυρηνικούς υποδοχείς (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς, δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των πυρηνικών υποδοχέων. (AF-1/2: activation function 1/2, DBD: DNA binding domain, LBD: ligand binding domain)¹²⁴

Οι πυρηνικοί υποδοχείς που ρυθμίζονται από στεροειδή (GR, AR, ER κ.α) σχηματίζουν ομοδιμερή, ενώ οι πυρηνικοί υποδοχείς που ρυθμίζονται από άλλους συνδέτες (VDR,PPAR, TR) και ειδικά μερικοί ορφανοί υποδοχείς (LXRα/a, FXRα/b κ.α) σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον RXR (Retinoic X Receptor) και προσδένονται στα HREs ρυθμιστικά στοιχεία ορμονών στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους¹²¹. Τα HRE περιέχουν άμεσες επαναλήψεις (DRs-Direct Repeats), ανεστραμμένες επαναλήψεις (IRs-Inverted Repeats) ή παλινδρομικές επαναλήψεις (PRs-Palindromic Repeats) της αλληλουχίας 5'-AG(G/T)TCA-3', οι οποίες διαχωρίζονται από ένα έως πέντε νουκλεοτίδια (Εικόνα 7)^{116,125}.



Εικόνα 7. Αλληλουχία του HRE στοιχείου, που δρα σαν DNA θέση πρόσδεσης για τους πυρηνικούς υποδοχείς. α) DR-4, άμεσες επαναλήψεις που διαχωρίζονται από τεσσερα νουκλεοτίδια, β) PR-2, Παλινδρομικές επαναλήψεις που διαχωρίζονται από δύο νουκλεοτίδια, γ) IR-3, ανεστραμμένες επαναλήψεις που διαχωρίζονται από τρία νουκλεοτίδια¹²⁶

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής ξεκινάει αφού ο συνδέτης προσδεθεί στον υδρόφοβο πυρήνα της περιοχής LBD. Αλλάζει η διαμόρφωση της περιοχής LBD, εμποδίζοντας την έξοδο του συνδέτη και έτσι σταθεροποιείται η δομή του υποδοχέα. Παράλληλα αλλάζει και η δομή του ετεροδιμερούς, μετατοπίζονται οι συν-καταστολείς και διευκολύνεται η αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές. Αυτά τα σύμπλοκα υποδοχέων/συν-ενεργοποιητών δρουν αναδιοργανώνοντας τη χρωματίνη και προσελκύοντας διαφόρους παράγοντες όπως, DNA εξαρτώμενες ΑΤΡασες, ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών, και τη βασική μεταγραφική μηχανή (TFIIs, RNA polII), με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων¹²⁷⁻¹²⁹.

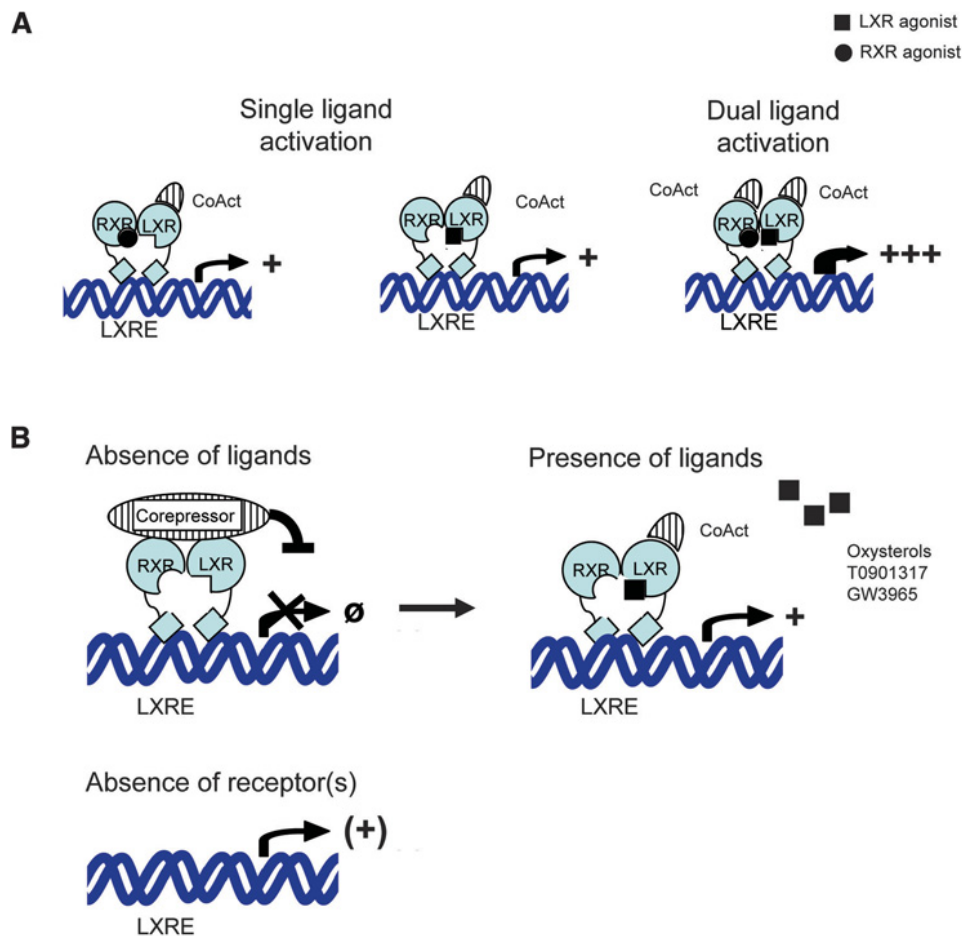
Υποδοχείς LXR

Οι LXRs (Liver X Receptors) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από συνδέτες και ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι LXRs αρχικά ταξινομήθηκαν σαν ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς, αφού δεν ήταν γνωστοί οι φυσικοί τους συνδέτες, αλλά τα επόμενα χρόνια ταυτοποιήθηκαν διάφοροι φυσικοί συνδέτες για αυτούς. Η οικογένεια των LXRs αποτελείται από δύο ισομορφές LXRα (NR1H3) και LXRβ (NR1H2), οι οποίες είναι ~78% ομόλογες στην αμινοξική αλληλουχία των περιοχών DBD και LBD¹³⁰.

Σε συνθήκες ενεργοποίησης από συνδέτες, και οι δύο ισομορφές των LXR σχηματίζουν υποχρεωτικά ετεροδιμερή με τον RXR και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της πρόσδεσής τους στα LXR ρυθμιστικά στοιχεία (LXREs) στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους. Το LXRE αποτελείται από δύο επαναλήψεις της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας AGGTCA, που διαχωρίζεται από 4 νουκλεοτίδια (DR-4 στοιχεία)¹³¹⁻¹³⁵. Τα LXR/RXR ετεροδιμερή χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να ενεργοποιούνται από συνδέτες του ενός υποδοχέα με ανεξάρτητο τρόπο. Έτσι το ετεροδιμερές αυτό ενεργοποιείται από συνδέτες του RXR (π.χ. 9 cis RA), από συνδέτες του LXR (π.χ. οξυστερόλες) ή ενεργοποιείται συνεργατικά από συνδέτες και των δύο υποδοχέων (εικόνα 8A)¹³³.

Έχει προταθεί ένα μοντέλο 3 σταδίων που περιγράφει την ενεργοποίηση από τους LXRs. Σύμφωνα με αυτό, απουσία συνδετών το ετεροδιμερές LXR/RXR καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων στρατολογώντας πρωτεΐνες συν-καταστολείς όπως ο NCoR (nuclear receptor corepressor) και ο SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor)¹³⁶⁻¹⁴⁰. Μετά τη πρόσδεση των συνδετών, το ετεροδιμερές LXR/RXR αλλάζει διαμόρφωση, αποσυνδέονται οι συν-καταστολείς και στρατολογούνται συν-ενεργοποιητές (Grip1- Glutamate receptor-interacting protein 1, PGC-1a-Peroxisome proliferator activated receptor-coactivator 1a) προκαλώντας μέγιστη ενεργοποίηση της μεταγραφής¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Επιπλέον, απουσία των πυρηνικών υποδοχέων η βασική κατασταλτική επιρροή των συμπλόκων συν-

καταστολέων που προσδένονται στο ετεροδιμερές LXR/RXR απουσιάζει και υπάρχει ενισχυμένη βασική έκφραση σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους του LXR και σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (εικόνα 8B)^{138,145}.



Εικόνα 8. Μεταγραφική ρύθμιση που μεσολαβείται από τους LXRs. A) Το ετεροδιμερές LXR/RXR μπορεί να ενεργοποιηθεί από συνδέτες του ενός υποδοχέα αλλά και από συνδέτες των δύο, προκαλώντας μέγιστη ενεργοποίηση. B) Μοντέλο ενεργοποίησης από τους LXRs. (CoAct: Co-activators, LXRE: LXR element)¹⁴⁶

Οι κύριοι φυσικοί LXR συνδέτες είναι μερικά μονο-οξειδωμένα παράγωγα της χοληστερόλης που αναφέρονται σαν οξυστερόλες. Οι πιο ισχυροί φυσικοί ενεργοποιητές – συνδέτες των LXRs, που παράγονται ενδογενώς από ενζυματικές αντιδράσεις, είναι οι 22-(R)-, 20-(S)-, 24-(S)- υδροξυχοληστερόλες, οι οποίες είναι ενδιάμεσα μόρια κατά τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών από χοληστερόλη και οι 24-(S)-, 25- εποξυχοληστερόλες, οι οποίες είναι ενδιάμεσα μόρια στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης^{147,148}. Οι 24-(S), 25- εποξυχοληστερόλες είναι ιδιαίτερα άφθονες στο ήπαρ όπου ο μεταβολισμός χοληστερόλης και η έκφραση του LXR είναι υψηλή. Οι παραπάνω οξυστερόλες φαίνεται να μην είναι παρούσες στα ανθρώπινα αφρώδη μακροφάγα, στα οποία όμως η CYP27 υδροξυλάση (sterol

27 - hydroxylase) παράγει κυρίως 27 -υδροξυχοληστερόλη, αποτελώντας τον κύριο ενδογενή συνδέτη των LXR σε αυτά τα κύτταρα⁹³.

Πιο ασθενείς συνδέτες των LXRs είναι οι 7-κετο, 7α -υδροξυ, 7β - υδροξυ, 5,6-εποξυχοληστερόλη και 3β, 5α , 6β- τριυδροξυχοληστάνη, οι οποίες ανιχνεύονται σε οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και παράγονται ενδογενώς μέσω μη-ενζυματικής οξείδωσης της χοληστερόλης από ROS (Reactive oxygen species) κατά την αποθήκευση της τροφής¹⁴⁹.

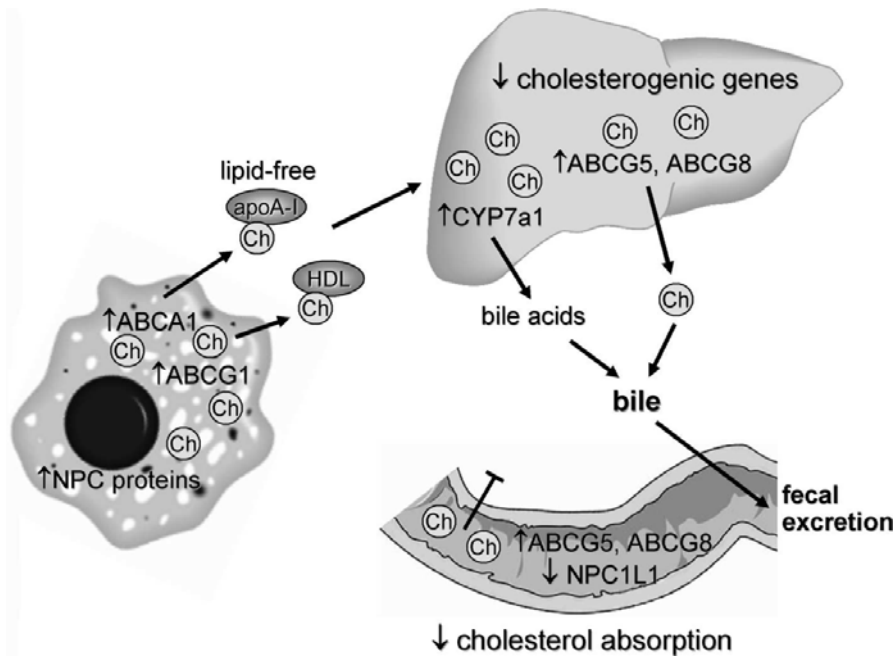
Οι περισσότεροι ενδογενείς συνδέτες των LXR ενεργοποιούν και τον LXRα και τον LXRβ με εξαίρεση τις 5,6,24-(S),25- διεποξυχοληστερολες και τα 6α-υδροξυ-χοξικά οξέα¹⁵⁰, που είναι κάπως επιλεκτικά για τον LXRα. Ακόμα έχει διαπιστωθεί ότι η D-γλυκόζη και η 6-φωσφορική D-γλυκόζη είναι ενδογενείς αγωνιστές των LXR με αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με αυτή των οξυστερολών¹⁵¹. Εκτός από τους ενδογενείς αγωνιστές, έχουν αναπτυχθεί κάποιοι συνθετικοί αγωνιστές των LXR , από τους οποίους οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι T0901317 και GW3965 που ενεργοποιούν και τους δύο LXRs^{145,152}. Βέβαια ο T0901317 δεν είναι πλήρως επιλεκτικός αγωνιστής των LXR αφού ενεργοποιεί επίσης τον PXR (Pregnane X Receptor) και τον FXR (Farnesoid X Receptor) σε μικρότερο όμως βαθμό¹⁵³.

Σε αντίθεση με τα οξειδωμένα παράγωγα χοληστερόλης που ενεργοποιούν τη μεταγραφή των LXR, το GGPP (Geranyl geranylpyrophosphate) είναι ένα ενδιάμεσο μόριο της βιοσύνθεσης χοληστερόλης που καταστέλλει τους LXRα/β, ανταγωνιζόμενο την αλληλεπίδρασή τους με συνενεργοποιητές^{154,155}. Ομοίως τα PUFA (poly- unsaturated fatty acids) μειώνουν την ενεργοποίηση των LXR, αφού ανταγωνίζονται τη πρόσδεση αγωνιστών και επομένως εμποδίζουν τη πρόσδεση των LXR/RXR ετεροδιμερών στα LXRE στοιχεία^{156,157}. Επιπλέον, το πλάσμα του ανθρώπου περιέχει διάφορα οξειδωμένα παράγωγα χοληστερόλης, που μπορούν να αποτελέσουν φυσικούς ανταγωνιστές για τους LXRα και LXRβ^{158,159}. Επομένως οι ενδογενείς LXR ανταγωνιστές μπορούν να εξισορροπούν τη δράση των LXR αγωνιστών κατά την ομοιοστάση της χοληστερόλης.

Βιολογικός ρόλος των υποδοχέων LXR

Οι υποδοχείς LXR φαίνεται να λειτουργούν σαν αισθητήρες των ενδοκυτταρικών επιπέδων στερολών προστατεύοντας τα κύτταρα από υπερ-συσσώρευση χοληστερόλης μέσω διαφόρων μηχανισμών (εικόνα 9). Ο έλεγχος της ομοιοστάσης της χοληστερόλης από τους LXR γίνεται μέσω:

1. της επαγωγής αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης
2. της έκκρισης χοληστερόλης στη χολή
3. της αναστολής απορρόφησης χοληστερόλης από την τροφή στο έντερο
4. της καταστολής της de novo σύνθεσης χοληστερόλης



Εικόνα 9. Ο ρόλος των υποδοχέων LXR στη μεταφορά και τον μεταβολισμό της χοληστερόλης. Παρουσιάζονται γονίδια που ρυθμίζονται από LXRs. (ABC: ATP-binding cassette transporters, apoA-I: apolipoprotein A-I, Ch: cholesterol, CYP7a1: cholesterol 7- α -hydroxylase, HDL: high density lipoprotein, NPC proteins: Niemann-Pick C proteins, NPC1L1: Niemann-Pick C1 like 1 protein)¹⁶⁰

Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μέσω της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (RCT Reverse cholesterol transport) η χοληστερόλη μεταφέρεται από τους περιφερικούς ιστούς του οργανισμού στο ήπαρ όπου εκκρίνεται στη χολή σαν χοληστερόλη ή σαν χολικά οξέα. Έχει διαπιστωθεί ότι κάθε βήμα στη διαδικασία της RCT ενεργοποιείται από τους LXRs. Αρχικά οι LXRs ενεργοποιούν τη μεταφορά της χοληστερόλης από τη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων προς τους αποδέκτες. Σε αυτή τη μεταφορά εμπλέκονται οι πρωτεΐνες ABCA1 και ABCG1/G4 τα γονίδια των οποίων έχουν LXRE στοιχεία, ενεργοποιούνται από τους LXRs και προωθούν την εκροή χοληστερόλης και φωσfolιπιδίων προς τις λιποπρωτεΐνες ApoA1 και ApoE και τα σωματίδια της HDL^{76,87,88,145,161-165}. Οι LXRs εμπλέκονται ακόμα στη ρύθμιση της μεταφοράς χοληστερόλης ενδοκυτταρικά. Πριν εκκριθεί, η χοληστερόλη πρέπει να μεταφερθεί από τα ενδοσώματα και τις ενδοκυτταρικές περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη προς τη πλασματική μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται από δύο μεταφορείς, τις Niemann – Pick C1 (NPC1) και C2 (NPC2) πρωτεΐνες. Οι αγωνιστές των LXR αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων NPC1/2 και επομένως διεγείρουν την κατανομή της χοληστερόλης στην πλασματική μεμβράνη, ώστε να είναι διαθέσιμη στους εξωκυτταρικούς αποδέκτες της¹⁶⁶. Ένα άλλο γονίδιο που εμπλέκεται στην ομοίωση της χοληστερόλης και επάγεται η έκφρασή του άμεσα από τους LXRs, είναι αυτό της ApoE, η οποία είναι ένα κύριο συστατικό της VLDL και των υπολειμμάτων των χυλομικρών. Αυτή η απολιποπρωτεΐνη εμπλέκεται στην

πρόσληψη της VLDL από το ήπαρ, αφού είναι ισχυρός συνδέτης του LDLR. Ακόμη, η ApoE δρα και σαν εξωκυτταρικός αποδέκτης της χοληστερόλης στο μονοπάτι εκροής μέσω ABCA1^{163,167,168}. Επιπλέον, οι LXRs ενεργοποιούν την έκφραση διαφόρων ενζύμων αναδιαμόρφωσης λιποπρωτεϊνών όπως η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL-lipoprotein lipase), η CETP (cholesterol ester transfer protein) και η πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP – Phospholipid transfer protein)¹⁶⁹⁻¹⁷². Το ένζυμο LPL καταλύει την υδρόλυση τριγλυκεριδίων των λιποπρωτεϊνών, το PLTP καταλύει την ανταλλαγή φωσφολιπιδίων μεταξύ της HDL και των λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια, ενώ το CETP μεσολαβεί στη μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης από τα σωματίδια HDL στα σωματίδια που περιέχουν ApoB για να επιστρέψει στο ήπαρ.

Ηπατική έκκριση χοληστερόλης.

Το πρώτο γνωστό γονίδιο-στόχος των LXR στα ποντίκια ήταν το Cyp7a1 που κωδικοποιεί την 7-α-υδροξυλάση χοληστερόλης κατά τη σύνθεση ηπατικών χολικών οξέων. Ο υποκινητής του γονιδίου αυτού στα ποντίκια και στους αρουραίους περιέχει LXRE στοιχείο και η μεταγραφή του ενεργοποιείται από τους φυσικούς και συνθετικούς αγωνιστές των LXR με αποτέλεσμα να ενισχύεται η σύνθεση χολικών οξέων και περιττωματικών εκκρίσεων^{148,173,174}. Αντίθετα, ο ανθρώπινος υποκινητής του Cyp7a1 δεν περιέχει στοιχείο LXRE και η μεταγραφή του δεν επάγεται από τους LXRα αγωνιστές, γεγονός που είναι υπεύθυνο για τη μεγαλύτερη ευαισθησία των ανθρώπων σε υπερχοληστερολαιμία^{175,176}. Επιπλέον η ενεργοποίηση των LXR βοηθά στην έκκριση της χοληστερόλης αυξάνοντας τη μεταγραφή των γονιδίων των μεταφορέων ABCG5 και ABCG8 στο ήπαρ^{177,178}. Οι μεταφορείς αυτοί εκφράζονται στη σωληνοειδή μεμβράνη των ηπατοκυττάρων όπου οδηγούν τη μεταφορά χοληστερόλης στη χολή¹⁷⁹.

Απορρόφηση χοληστερόλης στο έντερο

Οι μεταφορείς ABCG5/8 εντοπίζονται επίσης στη κορυφαία μεμβράνη των εντεροκυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση της χοληστερόλης από τη τροφή στο έντερο. Η έκφραση αυτών των μεταφορέων αυξάνεται με αγωνιστές των LXR και ως αποτέλεσμα μεταφέρεται περισσότερη χοληστερόλη πίσω στον αυλό του εντέρου και μειώνεται η απορρόφησή της από το έντερο^{145,177}. Αυτό το αποτέλεσμα ενισχύεται από την LXR-εξαρτώμενη έκφραση του ABCA1 ο οποίος βρίσκεται στην βασοπλευρική μεμβράνη των εντεροκυττάρων και μεταφέρει μικρή ποσότητα απορροφημένης χοληστερόλης προς την ApoA1 για τη δημιουργία HDL¹⁴⁵. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της πρωτεΐνης NPC1L1 (Niemann – Pick C1 like 1) που είναι σημαντική στη διαδικασία απορρόφησης της χοληστερόλης στο έντερο, μειώνεται από τους αγωνιστές των LXR στο ποντίκι και σε ανθρώπινα εντεροκύτταρα¹⁸⁰.

De novo βιοσύνθεση χοληστερόλης

Η χοληστερόλη που βρίσκεται στα κύτταρα μπορεί να έχει προέλθει από λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως LDLs) ή να έχει συντεθεί de novo ενδοκυτταρικά. Διάφορα ένζυμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης όπως η αναγωγάση της HMG – CoA (3-hydroxy -3-methylglutarylcoenzyme A reductase), η συνθάση του σκουαλενίου (squalene synthase) και η συνθάση του διφωσφορικού φαρνεσουλίου (farnesyl diphosphate synthase), ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη SREBP -2 (Sterol regulatory element binding protein 2). Η πρωτεΐνη SREBP-2 είναι μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται σε συνθήκες έλλειψης χοληστερόλης και διεγείρει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην σύνθεση και την πρόσληψη της χοληστερόλης¹⁸¹. Οι συνθετικοί αγωνιστές των LXR μειώνουν την ηπατική έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε αγρίου τύπου ποντίκια, ενώ ποντίκια με ελαττωματικούς LXRα ή LXRβ παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του SREBP-2 και των γονιδίων στόχων του^{174,182,183}. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι LXRs αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, παρόλο που η ρύθμιση του μονοπατιού δεν είναι εντελώς κατανοητή. Το ήπαρ μπορεί να προσλαμβάνει χοληστερόλη από την LDL του πλάσματος μέσω του υποδοχέα της LDLR του οποίου ο υποκινητής περιέχει ένα στοιχείο LXRE. Έτσι, οι πυρηνικοί υποδοχείς LXR επάγουν την έκφραση του γονιδίου LDLR παρουσία του αγωνιστή T0901317 σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοβλαστώματος¹⁸⁴.

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τους υποδοχείς LXRα και LXRβ

Παρόλο που οι δύο LXRs έχουν μεγάλη ομολογία και αποκρίνονται στους ίδιους αγωνιστές, η κατανομή τους στους ιστούς διαφέρει σημαντικά. Ο LXRα εκφράζεται υψηλά στο ήπαρ, το λιπώδη ιστό, τα μακροφάγα, τη σπλήνα, το έντερο, το νεφρό και τον πνεύμονα, ενώ ο LXRβ εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα, σε όλους τους ιστούς που ελέχθησαν^{131-133,185}.

Διάφορες μελέτες, δείχνουν ότι υπάρχει διαφορά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τις δύο ισομορφές, αφού μπορούν να ρυθμίζουν τα γονίδια-στόχους με κάποιους κοινούς μηχανισμούς, αλλά και μέσω διαφορετικών μεταγραφικών μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα, σε ποντίκια LXRα^{-/-} τα επίπεδα mRNA ηπατικών γονιδίων, μεταβολισμού χοληστερόλης ή λιπαρών οξέων (Cyp7a, SPEBPs, HMG-CoA, FAS, squalene synthase) είναι μειωμένα¹⁷⁴. Αυτά τα ποντίκια, μετά από διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη, δεν μπορούν να επάγουν την μεταγραφή του Cyp7a, το οποίο είναι σημαντικό για την σύνθεση χολικών οξέων από τη χοληστερόλη, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται χοληστερόλη στο ήπαρ. Αυτός ο φαινότυπος δεν παρατηρήθηκε σε LXRβ^{-/-} ζώα^{182,174}. Και από άλλες αναλύσεις σε ποντίκια LXRβ^{-/-} ή LXRα^{-/-}β^{-/-} φαίνεται ότι ο LXRα είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού λιπιδίων στο ήπαρ¹⁸². Επιπλέον, σε μακροφάγα από ποντίκια LXRβ^{-/-}

αλλά όχι από ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 ήταν αυξημένα, προτείνοντας ότι ο $LXR\beta$ είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης του ABCA1 στα μακροφάγα ¹⁶³. Από την άλλη πλευρά, επώαση μακροφάγων από ποντικούς $LXR\beta^{-/-}$ και $LXR\alpha^{-/-}$ με συνδέτη των LXR, έδειξαν παρόμοια αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ABCA1 και εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο LXR ισομορφές είναι εξίσου σημαντικές για την επαγωγή του ABCA1 και την εκροή της χοληστερόλης ¹⁴⁵.

Επιπλέον, σε αγρίου τύπου ποντίκια τα οποία είχαν λάβει συνδέτη των LXR (για τους $LXR\alpha$ και β), παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα HDL χοληστερόλης και αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Αντίθετα, ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$ που είχαν λάβει συνδέτη των LXR είχαν αυξημένα επίπεδα HDL χοληστερόλης αλλά όχι τριγλυκεριδίων. Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σε ποντικούς $LXR\beta^{-/-}$, που είχαν λάβει τον συνδέτη των LXR ¹⁸⁶. Φαίνεται λοιπόν, ότι η ισομορφή $LXR\alpha$ έχει τον κύριο ρόλο στην ηπατική λιπογένεση, ενώ οι $LXR\alpha$ και $LXR\beta$ είναι εξίσου σημαντικοί για την επαγωγή εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και για την αύξηση της HDL στα ποντίκια. Έτσι, υποστηρίζεται ότι αγωνιστές ειδικοί για τον $LXR\beta$, θα μπορούσαν να συνδυάσουν επαγωγή της εκροής της χοληστερόλης από τα μακροφάγα και αύξηση των επιπέδων της HDL, ενώ θα εμπόδιζαν την επαγωγή της ηπατικής λιπογένεσης.

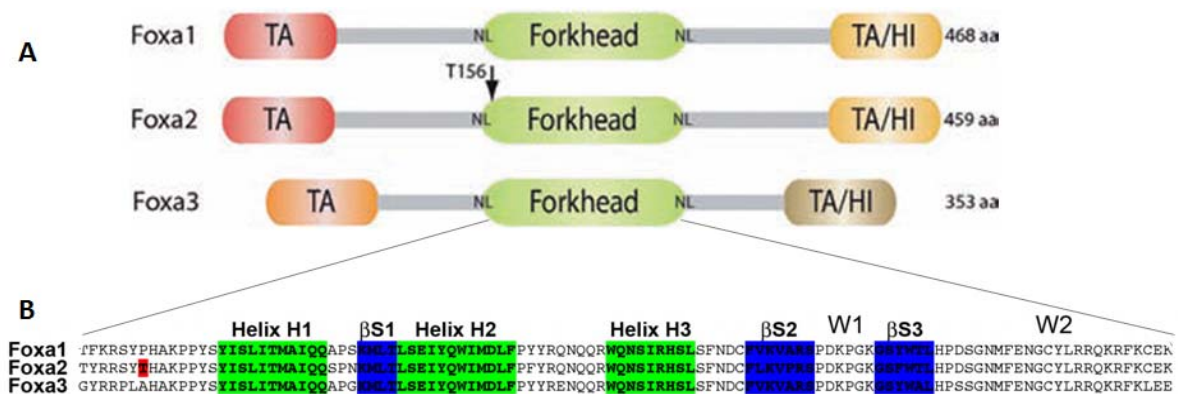
Ο μεταβολισμός της γλυκόζης επηρεάζεται επίσης, από την ενεργοποίηση των LXR υποδοχέων. Συγκεκριμένα, ο μεταφορέας γλυκόζης Glut4, έχει δειχθεί να είναι άμεσος στόχος των LXR, στον άσπρο λιπώδη ιστό, και η επαγωγή του φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη λήψη και χρησιμοποίηση της γλυκόζης από τον ιστό αυτόν. Σε ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$, αλλά όχι σε $LXR\beta^{-/-}$ ή $LXR\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$, τα επίπεδα mRNA του Glut4 ήταν μειωμένα, υποδεικνύοντας ότι η επαγόμενη από ινσουλίνη, έκφραση του Glut4 εξαρτάται από τον υποδοχέα $LXR\alpha$ ^{187,188}. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες, ο $LXR\beta$ παίζει σημαντικό ρόλο στα παγκρεατικά κύτταρα, καθώς η ενεργοποίησή του ενισχύει την εξαρτώμενη από γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης ¹⁸⁹. Αυτή η διαδικασία, αντιθέτως, φαίνεται να παρεμποδίζεται σε κύτταρα από ποντίκια $LXR\beta^{-/-}$ ¹⁹⁰.

Σύμφωνα με μία μελέτη, υπάρχει διαφορετικό γονιδιακό προφίλ έκφρασης στο λιπώδη ιστό, από τους υποδοχείς $LXR\alpha$ και $LXR\beta$ ¹⁹¹. Ίδιος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων, χοληστερόλης, και αμινοξέων, βρέθηκε ότι ρυθμίζονται (θετικά ή αρνητικά) σε ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$ και $LXR\beta^{-/-}$. Η έκφραση των περισσότερων γονιδίων απόπτωσης και μεταβολισμού των υδατανθράκων βρέθηκε να αλλάζει σε ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$, ενώ τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στην αναστολή πρωτεασών και στις κυτοκίνες, έχουν αλλαγμένη έκφραση στα ποντίκια $LXR\beta^{-/-}$. Υπήρχαν αρκετά κοινά γονίδια, βέβαια, σε ποντίκια $LXR\alpha^{-/-}$ και $LXR\beta^{-/-}$ των οποίων η έκφραση όμως ήταν διαφορετική. Από τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι ο $LXR\alpha$ και $LXR\beta$ έχουν, από τη μία πλευρά, γονίδια στόχους των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται κοινά, και από την άλλη πλευρά, γονίδια στόχους που ρυθμίζονται μόνο από την μία ισομορφή.

Πρωτεΐνες FOXA

Η οικογένεια γονιδίων forkhead box (FOX) πήρε το όνομα της από το γονίδιο της δροσόφιλας forkhead, μεταλλάξεις στο οποίο προκαλούν ανωμαλίες στην πτύχωση του κεφαλιού, δίνοντας μια χαρακτηριστική εμφάνιση μυτερών δομών (spiked) στο κεφάλι^{192,193}. Η οικογένεια FOXA των σπονδυλωτών, είναι η πιο κοντινή στην πρωτεΐνη forkhead της δροσόφιλας, και αποτελείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXA1, FOXA2 και FOXA3 (ή διαφορετικά HNF3α, HNF3β, HNF3γ). Οι παράγοντες HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3) ανακαλύφθηκαν στο ήπαρ βάσει της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με τους υποκινητές σημαντικών γονιδίων που εκφράζονται σε αυτό το όργανο όπως της α1-αντιθρυψίνης (α1-antitrypsin, A1AT), της τρανσθυρετίνης (transthyretin, TTR) και της αλβουμίνης (albumin, Alb1)¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Για το λόγο αυτό τα γονίδια ονομάστηκαν αρχικά ηπατικοί παράγοντες-3α, -3β και -3γ. Οι πρωτεΐνες HNF3α, HNF3β, HNF3γ του ανθρώπου έχουν μοριακό βάρος 50kDa, 47kDa και 42kDa αντίστοιχα.

Οι πρωτεΐνες FOXA περιέχουν μια δομή που λέγεται *forkhead box* και αποτελείται από τρεις α-έλικες, τρεις β-αλυσίδες και δύο βρόγχους, οι οποίες κατανέμονται σε ένα μοτίβο “έλικα-στροφή-έλικα”. Η δομή αυτή αναφέρεται και σαν “winged helix”, διότι μοιάζει με πεταλούδα της οποίας ο θώρακας είναι οι α-έλικες και τα φτερά οι βρόγχοι (εικόνα 10B)¹⁹⁷. Το μοτίβο του forkhead box, που αποτελείται από ~110 αμινοξέα, είναι συντηρημένο από τον σακχαρομύκητα ως τον άνθρωπο και λειτουργεί σαν περιοχή πρόσδεσης στο DNA^{198,199}. Το forkhead box των πρωτεϊνών της υπο-οικογένειας FOXA 1,2,3 παρουσιάζει 95% ομολογία μεταξύ των μελών και οριοθετείται από αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localization Signal). Έξω από το forkhead box, οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μικρότερη ομολογία (οι FOXA1 και FOXA2 είναι κατά 51% όμοιες μεταξύ τους), με το μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης να εντοπίζεται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Λειτουργικές αναλύσεις στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του FOXA2, δείχνουν ότι περιέχουν 4 περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης^{200,201}. Ακόμη, η πρωτεΐνη FOXA2 είναι η μόνη που περιέχει μια θέση φωσφορυλίωσης από την κίνηση AKT2/PKB στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής forkhead (εικόνα 10A).



Εικόνα 10. Α) Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών των πρωτεϊνών FOXA1,2,3 του ποντικού. Ο FOXA2 περιέχει μια θέση φωσφορυλίωσης από την κινάση AKT2/PKB στο κατάλοιπο T156. (TA: transactivation domain, HI: histone interaction domain, NL: nuclear localization)²⁰². Β) Μέσα στο forkhead box υπάρχουν τρεις α-έλικες (helix H1-3), τρεις β-αλυσίδες (βS1-3) και δύο βρόγχοι (W1,2)²⁰³.

Ο FOXA2 είναι η πρώτη πρωτεΐνη της υπο-οικογένειας FOXA που εκφράζεται στο έμβryo του ποντικού. Κατά τη γαστριδίωση αρχίζει η έκφραση του FOXA1, ενώ ο FOXA3 εκφράζεται μετά τη γαστριδίωση μαζί με τις FOXA1 και FOXA2 στο ενδόδερμα, το οποίο θα δώσει τα όργανα του εντέρου. Και οι τρεις FOXA πρωτεΐνες παραμένουν ενεργές στο ενήλικο ήπαρ, όπως και σε όλα τα όργανα ενδοδερμικής προέλευσης (πνεύμονας, θυρεοειδής, ήπαρ, πάγκρεας προστάτης) και παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό, την ανάπτυξη και την λειτουργία αυτών των οργάνων. Οι ίδιοι παράγοντες FOXA διαδραματίζουν διάφορους ρόλους σε διαφορετικούς ιστούς ενδοδερμικής προέλευσης, ανάλογα με τα γονίδια που επάγονται σε κάθε όργανο από αυτούς^{196,204-210}.

Οι πρωτεΐνες FOXA μπορούν να ρυθμίζουν στην έκφραση γονιδίων μέσω 2 προτεινόμενων μηχανισμών. Σύμφωνα με τον *πρώτο μηχανισμό*, οι πρωτεΐνες FOXA μπορούν να ανοίξουν τη πολύ συμπυκνωμένη χρωματίνη, αλληλεπιδρώντας με τα νουκλεοσώματα, χωρίς να απαιτείται το σύμπλοκο ανασυγκρότησης της χρωματίνης SWI/SNF^{211,212}. Γι' αυτό οι πρωτεΐνες FOXA αναφέρονται και σαν πρωτοπόροι (pioneer) μεταγραφικοί παράγοντες αφού απομακρύνουν τις συνδετικές ιστόνες H1 από την συμπυκνωμένη χρωματίνη και διευκολύνουν τη πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Το καρβοξυτελικό άκρο των FOXA έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H3 και H4 και ότι προσδένεται στον ενισχυτή του γονιδίου της αλβουμίνης (Alb1) ακόμα και όταν αυτός είναι συμπυκνωμένος από συνδετικές ιστόνες^{211,213-217}. Απουσία των πρωτεϊνών FOXA, οι μεταγραφικοί παράγοντες του γονιδίου της αλβουμίνης δεν μπορούν να προσεγγίσουν τις θέσεις τους στο DNA ενώ η πρόσδεση των FOXA αποσυμπυκνώνει τη χρωματίνη και επιτρέπει τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στον ενισχυτή²¹¹.

Σύμφωνα με τον *δεύτερο μηχανισμό*, οι πρωτεΐνες FOXA μπορούν άμεσα να αλληλεπιδράσουν με το DNA και τη μεταγραφική μηχανή και να ρυθμίσουν τη

μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων, στη ρύθμιση και ομοιοστάση της γλυκόζης στο αίμα και στην απόκριση σε νηστεία²¹⁸. Σαν μεταγραφικοί παράγοντες, οι παράγοντες FOXA προσδένονται στις ειδικές αλληλουχίες (5'-T(G/A)TTT(A/G)(C/T)T-3') των υποκινητών γονιδίων στόχων (όπως τα γονίδια των HNF4α, HNF1α/β, Alb1, ApoA1, ApoB, Lpl, Irf1) και ρυθμίζουν τη μεταγραφή τους θετικά ή αρνητικά^{195,219-228}. Οι πρωτεΐνες FOXA μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ηπατικά ή παγκρεατικά ένζυμα, πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες του ορού και ορμόνες (γλυκαγόνη) που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης των FOXA. Επιπλέον οι παράγοντες FOXA λειτουργούν σαν βοηθητικοί παράγοντες ώστε να επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων ηπατικών γονιδίων σε απόκριση σε γλυκοκορτικοειδή. Ακόμη, πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει τις πρωτεΐνες FOXA σαν «πρωτοπόρους» παράγοντες να διευκολύνουν τη πρόσδεση των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στα γονίδια στόχους τους. Έτσι η πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR, Glucocorticoid receptor) στα γονίδια στόχους που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις νηστείας, εξαρτάται από τον FOXA2²²⁹. Ακόμα, έχουν βρεθεί θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα FOXA1 κοντά σε στοιχεία απόκρισης στα ανδρογόνα σε διάφορα γονίδια που εκφράζονται στον προστάτη και η πρόσδεση του FOXA1 προηγείται αυτής του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR)²³⁰. Παρομοίως, πολλά στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα βρίσκονται πολύ κοντά σε θέσεις πρόσδεσης του FOXA1, ώστε ο FOXA1 να ρυθμίζει θετικά γονίδια που αποκρίνονται σε οιστρογόνα^{231,232}.

Ο FOXA2 στον μεταβολισμό

Η διατήρηση της ομοιοστάσης της γλυκόζης είναι σημαντική για την επιβίωση των θηλαστικών. Το ήπαρ και το πάγκρεας ρυθμίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης προσλαμβάνοντας και αποθηκεύοντάς την (σαν γλυκογόνο ή μετατρέποντάς την σε τριγλυκερίδια) μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες ή ενεργοποιώντας τη γλυκονεογένεση (από γλυκογόνο, αμινοξέα και γλυκερόλη) σε συνθήκες υπογλυκαιμίας. Σ' αυτές τις διεργασίες φαίνεται να εμπλέκονται οι πρωτεΐνες FOXA και να προστατεύουν τον οργανισμό από την υπογλυκαιμία²³³⁻²³⁷.

Διαγονιδιακά ποντίκια *Foxa2*^{loxP/loxP}; *Foxa3* – Cre (απαλοιφή του γονιδίου *Foxa2* στην περιοχή που εκφράζεται ο *Foxa3* δηλαδή στο ενδόδερμα που θα δώσει το ήπαρ) είναι ελαφρά υπογλυκαιμικά και πεθαίνουν στην πρώτη εβδομάδα της ζωής τους²³⁴. Αυτός ο φαινότυπος δείχνει την αναγκαιότητα του FOXA2 στο ήπαρ και το πάγκρεας για τη σωστή ομοιοστάση της γλυκόζης. Πιο εστιασμένες απαλοιφές του γονιδίου *Foxa2* στα β-κύτταρα του παγκρέατος (*Foxa2*^{loxP/loxP}; *Ins.Cre*) είχαν ως αποτέλεσμα υπογλυκαιμικά και υπερινσουλιναϊμικά ποντίκια καθώς και διαταραχές στο σχηματισμό παγκρεατικών νησιδίων. Σε απόκριση σε αυξημένα επίπεδα

γλυκόζης, τα ποντίκια αυτά δεν εκκρίνουν ινσουλίνη και αντίθετα εκκρίνουν ινσουλίνη ως απόκριση σε αμινοξέα. Αυτό εξηγείται από τη μειωμένη έκφραση των γονιδίων στόχων του FOXA2, Kir6.2 και Sur1 που αποτελούν το κανάλι K_{ATP} (αισθητήρας γλυκόζης) και έχουν σημαντικό ρόλο στην έκκριση ινσουλίνης και γλυκογόνου στο πάγκρεας²³⁸⁻²⁴¹. Ακόμα ταυτοποιήθηκε ένα νέο γονίδιο στόχος του FOXA2, το *Hadhsc* που κωδικοποιεί μια αφυδρογονάση λιπαρών οξέων (SCHAD). Σε ποντίκια *Foxa2*^{loxP/loxP};Ins.Cre μειώνεται η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα τριακυλ- και διακυλ-γλυκερολών, λιπαρών οξέων και ακυλιωμένων πρωτεϊνών τα οποία ενισχύουν την έκκριση ινσουλίνης, ανεξάρτητα από το κανάλι K_{ATP} ^{242,243}. Ένα άλλο γονίδιο που ρυθμίζει ο FOXA2 στο πάγκρεας, για τη σωστή ρύθμιση έκκρισης της ινσουλίνης και ανάπτυξης του παγκρεατος, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1)^{222,244}.

Στο ήπαρ, κάποια γονίδια-στόχοι των FOXA εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης και συγκεκριμένα σε απόκριση σε νηστεία. Σ' αυτά ανήκουν τα ένζυμα της γλυκονογένεσης PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), G6PC (glucose – 6 – phosphatase) και TAT (Tyrosine aminotransferase). Διαγονιδιακά ποντίκια *Foxa2*^{loxP/loxP};Alfp-Cre, στα οποία ο FOXA2 έχει επαλειφθεί ειδικά στα ηπατοκύτταρα, φαίνεται να είναι ευγλυκαιμικά, αλλά δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν πλήρως τα παραπάνω γονίδια σε κατάσταση νηστείας²²⁹. Παρόμοιος φαινότυπος υπάρχει και στα *Foxa3*^{-/-} ποντίκια, γεγονός που υποδεικνύει ότι η οικογένεια FOXA αποτελείται από σημαντικούς ρυθμιστές των γλυκονογενικών γεγονότων στο ήπαρ.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, σε κυτταρικές σειρές και ποντίκια, μετά από επώαση με ινσουλίνη, ενεργοποιείται η κινάση AKT2/PKB, η οποία φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο T156 του FOXA2. Έτσι, η μεταγραφική ενεργότητα του FOXA2 παρεμποδίζεται εξαιτίας του πυρηνικού αποκλεισμού του FOXA2. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ο FOXA2 είναι στον πυρήνα μόνο σε συνθήκες νηστείας, όπου ενεργοποιεί πολλά γονίδια γλυκονογένεσης, οξείδωσης λιπαρών οξέων, ενώ μετά από γεύμα όπου εκκρίνεται ινσουλίνη, ο FOXA2 δεν ενεργοποιεί αυτά τα γονίδια εφόσον δεν είναι στον πυρήνα^{227,245}.

Ο FOXA2 παίζει επίσης ρόλο στη χρησιμοποίηση της ενέργειας στο λιπώδη ιστό. Ποντίκια *Foxa2*^{+/-} έχουν φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα υπό συνθήκες νηστείας και μη, αλλά σε συνθήκες δίαιτας με πολλά λιπαρά, έχουν αυξημένο πάχος και μειωμένη κατανάλωση ενέργειας. Αυτό οφείλεται στη μειωμένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη πρόσληψη γλυκόζης, τη γλυκόλυση, τη λιπόλυση και τη σπατάλη ενέργειας, με αποτέλεσμα τα λιποκύτταρα να έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, στην γλυκόλυση και στην λιπόλυση²²⁶. Επομένως ο FOXA2 υποκινεί τη χρησιμοποίηση ενέργειας στον λιπώδη ιστό (παρά την αποθήκευση τριγλυκεριδίων) σε συνθήκες περίσσειας θερμίδων.

Αλληλεπιδράσεις του παράγοντα FOXA2 με άλλες πρωτεΐνες

Παρόλο που οι πρωτεΐνες FOXA προσδένονται στο DNA σαν μονομερή, μπορούν να αλληλεπιδρούν και με άλλους παράγοντες και να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι ο FOXA2 μπορεί να αλληλεπιδρά με τους FOXA1 και FOXA3, ενώ οι FOXA1 και FOXA3 δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους²⁴⁶.

Οι περισσότερες forkhead πρωτεΐνες φαίνεται να δρουν σαν μεταγραφικοί ενεργοποιητές αλλά κάποια μέλη αυτής της οικογένειας έχουν αναφερθεί να καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων, όπως ο FOXD3 και ο FOXG1²⁴⁷ αλληλεπιδρώντας με συν-καταστολείς όπως ο Groucho/TLE²⁴⁸. Μια άλλη μελέτη δείχνει ότι ο FOXA2 αλληλεπιδρά με την Groucho/TLE πρωτεΐνη και υπερέκφραση της TLE καταστέλλει την FOXA2-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση ενώ η έκφραση του Grg5 (dominant negative μορφή του TLE) ενισχύει την ενεργοποίηση από FOXA2. Έτσι φαίνεται ότι ο TLE μπορεί να δρα σαν συν-καταστολέας του FOXA2, ώστε να καταστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων στόχων²⁴⁹.

Επιπλέον οι FOXA1 και FOXA2 αλληλεπιδρούν με την περιοχή πρόσδεσης του DNA του υποδοχέα των ανδρογόνων. Συγκεκριμένα, ο FOXA1 εκφράζεται στον προστάτη και αλληλεπιδρά με τον AR, ώστε να ρυθμίσει την έκφραση ειδικών γονιδίων του προστάτη, όπως το PSA (Prostate specific antigen) και το PB (Probasin)²³⁰. Ο FOXA2 εκφράζεται στην επιδιδυμίδα και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων της (όπως mE-RABP, epididymal retinoic acid binding protein), αλληλεπιδρώντας με τον AR²⁴⁷. Ακόμα ο FOXA2 μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα PXR (Pregnane X Receptor). Ο υποδοχέας αυτός καταστέλλει τη μεταγραφή που διαμεσολαβείται από τον FOXA2, των γονιδίων κετογένεσης και β-οξείδωσης, *Cpt1a* (carnitine palmitoy 1 transferase) και *Hmgcs2* (3 hydroxy-3 methyl glutarate-CoA Synthase 2), με αποτέλεσμα να καταστέλλεται ο μεταβολισμός ενέργειας στο ήπαρ, να αυξάνεται η σύνθεση τριγλυκεριδίων (λιπογένεση) και να μειώνεται η κετογένεση σε συνθήκες πείνας²⁵⁰. Από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι ο FOXA2 αλληλεπιδρά με την περιοχή homeodomain των μεταγραφικών παραγόντων της τάξης homeobox, όπως είναι οι HNF6, Engrailed, και OTX2. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες HNF6 και FOXA2 αλληλεπιδρούν μέσω του Cut-homeodomain του HNF6 και της περιοχής πρόσδεσης στο DNA-winged helix του FOXA2, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν συνεργατικά τη μεταγραφή, ανάλογα με την αλληλουχία στόχο. Σε εξαρτώμενο από FOXA υποκινητή, ο HNF6 δρα σαν συν-ενεργοποιητής (προσελκύοντας p300/CBP, ακετυλοτρασφερασες ιστονών), ενώ σε υποκινητές ειδικούς για HNF6 (όπως ο υποκινητής του *Glut2*- Glucose transporter 2) η αλληλεπίδραση των HNF6 και Foxa2 εμποδίζει τη πρόσδεση του HNF6 στις αλληλουχίες-στόχους του, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφή των γονιδίων εξαρτώμενων από HNF6²⁵¹. Ο FOXA2 αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA με την πρωτεΐνη Engrailed στο υποκινητή του *Map1b* (Microtubule associated protein 1) των νευρικών κυττάρων ρυθμίζοντας την ενεργοποίησή του. Εκτός από την Engrailed, ο FOXA2 αλληλεπιδρά

επίσης και με τις homeobox πρωτεΐνες LIM1, GSC (Goosecoid), HOXA2, στην περιοχή του homeodomain²⁵² αλλά και με την OTX2 homeobox πρωτεΐνη, καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων του *Otx2*²⁵³.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τα ένζυμα τροποποίησης νουκλεϊκών οξέων και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα προήλθαν από τις εταιρίες Minotech και New England Biolabs (NEB). Η πολυμεράση GoTaq, τα dNTPs, το υπόστρωμα της λουσιφεράσης (luciferase assay system), το διάλυμα λύσης των κυττάρων και το Wizard SV gel and PCR cleanup system ήταν από την Promega. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρίας Qiagen.

Η αгарόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS, ενώ τα συστατικά (bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract) του θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertany) ήταν της εταιρείας Difco.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman/Protran αγοράστηκε από την εταιρεία Schleicher & Schuell, το υπόστρωμα για το ECL (Super Signal West Pico chemiluminescent substrate) προήλθε από την Pierce-Thermo, ενώ τα φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση ήταν από την Kodak.

Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (glutathione–Sepharose 4B) και πρωτεΐνης G (protein G Sepharose) αγοράστηκαν από τη GE healthcare.

Για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών HEK 293T και HepG2 χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), το αντιβιοτικό penicillin/streptomycin και η θρυψίνη-EDTA, από τη εταιρία Invitrogen/Life Technologies, ενώ ο ορός (Fetal Bovine Serum) ήταν από τη BioChrom Labs.

Οι συνδέτες των πυρηνικών υποδοχέων, 22-(R)-υδροξυστερόλη (hydroxycholesterol) και 9-cis-ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid), , το ONPG (ορθο-νιτροφαινυλ-β-γαλακτοπυρανοζίδιο), η RnaseA, καθώς και οι αναστολείς πρωτεασών προήλθαν από τη Sigma-Aldrich, ενώ ο συνδέτης T0901317 από την Cayman Chemicals και τα δισκία-cocktail αναστολέων πρωτεασών από τη Roche.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εταιρείες Santa Cruz Biotechnology και Sigma-Aldrich, ενώ τα δευτερογενή αντισώματα από τις Sigma-Aldrich και Jackson Immunoresearch. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται όλα τα αντισώματα και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, η αραιώση που έγινε και η εταιρεία από την οποία προήλθαν (WB-Western Blot και IP-Immunoprecipitation).

1 ^ο Αντίσωμα	Αραιώση (WB or IP)	Εταιρεία
a-ABCA1 (rabbit) NB 400-705	1:500 in 5% milk/TBST 0.05%/ 0.02% NaN ₃ (WB)	Novus Biologicals
a-LXR (H-144) (rabbit) sc-13068	1:2000 in 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-RXRa (D-20) (rabbit) sc-553	1:500 in 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-HNF3b (M-20) (goat) sc-6554 (200µg/mL)	1:500 in 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB) 10µl/IP	Santa Cruz Biotechnology
a-GST (B-14) (mouse) sc-138	1:500 in 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-myc (9E-10) (mouse)	1:1000 in 5% milk/TBST 0.05%/ 0.02% NaN ₃ (WB)	Sigma-Aldrich
a-flag M2 (F-3165) (mouse) (2,9mg/mL)	1:1000 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB) 4 µl/IP	Sigma-Aldrich
a-actin (mouse) MAB1501R	1:5000 in TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB)	Chemicon (Millipore)
a-HNF4a (C-19) (goat) sc-6556	1:500 in 5% milk/TBST 0.05%/ 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-RARa (C-20) (rabbit) sc-551	1:500 in 5% milk/TBST 0.05% / 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-TRβ1 (J-51) (mouse) sc-737	1:500 in 5% milk/TBST 0.05%/ 0.02% NaN ₃ (WB)	Santa Cruz Biotechnology
a-Gal4 DBD (mouse) sc-510 (200µg/mL)	10µl/IP	Santa Cruz Biotechnology

2 ^ο Αντίσωμα	Αραιώση (WB)	Εταιρεία
a-rabbit HRP	1:10000 in 5% milk/TBST 0.05%	Jackson Immunoresearch
a-mouse HRP	1:10000 in 5% milk/TBST 0.05%	Sigma-Aldrich
a-goat HRP	1:10000 in 5% milk/TBST 0.05%	Sigma-Aldrich

Οι πλασμιδιακοί φορείς, οι οποίοι ήταν διαθέσιμοι στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία είναι : 6myc-HNF3β, 6myc-RXRα, 6myc-LXRα, 6myc-LXRα 164-447, 6myc-LXRα 1-163, 6myc-LXRα 1-97, 6myc-LXRα 98-163, 6myc-LXRα 30-163, 6myc-LXRα 30-127, 6myc-LXRα 1-127, Flag-Foxo1, Flag- FXRα, HNF4α, RARα, TRβ1, GST-HNF3β 1-94, GST-HNF3β 144-279, GST-HNF3β 361-458, pSuper-shcontrol, CMV-bgal, (-890/+24) ApoCIII-luc, (-1024/-24) ApoAI-luc, (-76/+205) ABCA1-luc. Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν, είναι : GST-HNF3β, GST-HNF3β 95-143, GST-HNF3β 280-360, 6myc-HNF3β 1-94, 6myc-HNF3β 95-143, 6myc-HNF3β 144-279, 6myc-HNF3β 280-360, 6myc-HNF3β 361-458, pSuper-shLXRα, pSuper-shLXRβ, pSuper-shLXRαβ. Ο τρόπος που κατασκευάστηκαν τα παραπάνω πλασμίδια αναλύεται στα αποτελέσματα. Ο φορέας έκφρασης για τον LXRβ μας παραχωρήθηκε από τον Δρ. Blobe G. (Departments of Medicine and Pharmacology and Cancer Biology, Durham, North Carolina), ενώ το πλασμίδιο για τον GST-Foxo1 παραχωρήθηκε από τον Δρ. Negishi M. (Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, NIH/NIEHS, North Carolina)

Μέθοδοι

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ DNA

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός επιθυμητών περιοχών του DNA με τη βοήθεια δυο μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές της αντίδρασης. Στην παρούσα εργασία απομονώνονται με PCR οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών του HNF3β που αντιστοιχούν στα αμινοξέα 95-143 και 280-360, με τους εκκινητές του πίνακα 3. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε συγκέντρωση 1,5mM MgCl₂ με 0,2mM dNTPs, 10μM από τον κάθε εκκινητή και 1U GoTaq πολυμεράσης. Σαν μητρικό DNA χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pGEX-4T1-HNF3β, σε ποσότητα 1ng. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες :

94 ⁰ C	4 min	}	30 κύκλοι
94 ⁰ C	30 sec		
59 ⁰ C	30 sec		
72 ⁰ C	30 sec		
72 ⁰ C	4 min		

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR, για την απομόνωση των δύο τμημάτων του HNF3β και τα μεγέθη των προϊόντων. Με υπογραμμισμένα και έντονα γράμματα, φαίνονται οι θέσεις περιορισμού *EcoRI*(gaattc) και *NotI* (gcggccgc).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	PCR προϊόν
rHNF3β-95 Forward	5'- <u>ggaattc</u> GGGGCGGCCGCGTGGCGGGCAT-3'	147 bp
rHNF3β-143 Reverse	5'- <u>ttgcggccgc</u> cttaGCTCAGGCCCGCCTGCCCGTA-3'	
rHNF3β-280 Forward	5'- cc <u>ggaattc</u> ACACAGGCTTCTCAGGTTTCAGCTCGG-3'	243 bp
rHNF3β-360 Reverse	5'- <u>ttgcggccgc</u> cttaTGGTGGCAGGCCAGGATGGT-3'	

Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Προκειμένου να γίνει δυνατή η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA είναι απαραίτητη η πέψη τόσο του τμήματος που θέλουμε να κλωνοποιηθεί όσο και του πλασμιδιακού φορέα με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Οι πέψεις DNA γίνονται παρουσία της πρωτεΐνης BSA 1x, σε κατάλληλες συνθήκες (ρυθμιστικά διαλύματα, συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασία) όπως περιγράφονται στον κατάλογο της Minotech και της NEB Biolabs, από τις οποίες προέρχονται τα ένζυμα.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η πυκνότητα του πηκτώματος αγαρόζης και η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού καθορίζονται ανάλογα με τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Έτσι, κατάλληλη ποσότητα σκόνης αγαρόζης διαλύεται με βρασμό σε 1x TAE (0.04 M Tris, 0.04 M Acetic Acid και 0.001 M EDTA) και έπειτα προστίθεται 5μl βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο προσδένεται στο DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. (Για πήκτωμα 1%, 1.5gr αγαρόζης διαλύεται σε 150ml 1x TAE). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μέσα σε διάλυμα 1x TAE, σε τάση 100 Volt. Ο μάρτυρας μεγέθους που χρησιμοποιείται σε όλα τα πειράματα είναι το DNA του λ φάγου τεμαχισμένο με το περιοριστικό ένζυμο BstEII και το διάλυμα που προστίθεται στα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση είναι η 6x loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanon, 30% glycerol).

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Οι πλασμιδιακοί φορείς και τα ενθέματα κόβονται με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι ζώνες των τμημάτων DNA απομονώνονται από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίζονται με τη βοήθεια του Wizard SV Gel and PCR Clean-up System.

Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων DNA (Ligation)

Η συγκόλληση του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα γίνεται με τη δράση της λιγάσης του DNA βακτηριοφάγου T₄ (T₄ DNA ligase) της Biolabs. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις σύνδεσης ποικίλουν, ανάλογα με τα άκρα των γραμμικών μορίων που επρόκειτο να ενωθούν (συμπληρωματικά ή τυφλά) και το μέγεθος τους. Το ένθεμα στην αντίδραση έχει 10πλάσια μοριακότητα σε σχέση με τον φορέα, ώστε να αποφθεχθούν φαινόμενα επανασυγκόλλησης του φορέα χωρίς το ένθεμα. Για μια αντίδραση όγκου 15 μl, εκτός από τα μόρια DNA, χρειάζονται 1.5 μl 10x ligation buffer που περιέχει ATP και 1 μl T₄ DNA ligase. Η αντίδραση επωάζεται ολονύκτια στους 4⁰C.

Μετασηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού «σοκ» (Transformation)

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων είναι απαραίτητος τόσο για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA όσο και για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών που προέρχονται από αντίδραση σύνδεσης (ligation).

Σε 100μl επιδεικτικών κυττάρων *E.coli* (DH10β) προστίθεται η αντίδραση της λιγάσης ή κάποιο πλασμίδιο και επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο. Έπειτα υπόκεινται σε θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42⁰C και μεταφέρονται στον πάγο για 2 λεπτά. Προστίθεται 0.9 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (1% NaCl, 1% Tryptone και 0.5% yeast extract) χωρίς αντιβιοτικά και επωάζονται στους 37⁰C για μια ώρα. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 2000 rpm, απομακρύνεται η μεγαλύτερη ποσότητα LB και μια μικρή ποσότητα που απομένει απλώνεται σε πιάτα LB-άγαρ με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για επιλογή. Επωάζονται στους 37⁰C ολονύχτια.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Για να διαπιστωθεί αν το ένθεμα συνδέθηκε στον πλασμιδιακό φορέα, μολύνονται 2 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (με το κατάλληλο αντιβιοτικό) με μια βακτηριακή αποικία και επωάζονται στους 37⁰ C ολονύχτια.

Την επόμενη μέρα οι πελλέτες επαναδιαλύονται σε 150 μl διαλύματος P1 (Qiagen) που περιέχει RNase A (100μg/ml). Στη συνέχεια προστίθενται 150 μl διαλύματος P2 για την λύση των κυττάρων και 150 μl διαλύματος P3 (διάλυμα εξουδετέρωσης) με ενδιάμεσες ανακινήσεις. Φυγοκεντρώνονται σε 13000 rpm για 15 λεπτά και στο υπερκείμενο προστίθενται 300 μl ισοπροπανόλη. Φυγοκεντρώνονται σε 13000 rpm για 15 λεπτά και οι πελλέτες του DNA πλένονται με 500 μl αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρώνονται σε 13000 rpm για 5 λεπτά, απομακρύνεται η αιθανόλη και αφού στεγνώσουν οι πελλέτες, επαναδιαλύονται σε 20-40 μl TE (10mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις για έλεγχο της ένθεσης στο φορέα.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Midi Preparation)

Καλλιέργεια 200 ml LB με αντιβιοτικό μολύνεται με μοναδιαία αποικία από το πιάτο (Transformation) και να επωάζεται στους 37⁰C ολονύχτια. Έπειτα, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA από τη καλλιέργεια χρησιμοποιώντας διαλύματα και κολώνες tip-100 της Qiagen. Το DNA επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος T.E. Για την ποσοτικοποίηση του DNA, 5 μl από το DNA προστίθεται σε 995 μl νερού και φωτομετρείται στα 260 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD) πολλαπλασιάζεται με το 10 και δίνει τη συγκέντρωση του DNA (μg/ml).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Καλλιέργεια ευκαρυωτικών ευκαρυωτικών κυττάρων

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK293T (human embryonic kidney cells) και HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cells). Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium με 4.5 g/L Glucose, L-Glutamine και Pyruvate) που περιέχει 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι 37°C και 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων ανανεώνεται κάθε 48 ώρες και όταν πυκνώσουν αραιώνονται (split), χρησιμοποιώντας θρυψίνη (trypsin-EDTA) και θρεπτικό υλικό. Επίσης, τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C σε θρεπτικό υλικό και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide).

Σε πειράματα με πυρηνικούς υποδοχείς και συνδέτες, όπου απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση ορμονών, δε χρησιμοποιείται FBS αλλά 5% CSS (Charcoal Stripped Serum), ορός από τον οποίο έχουν αφαιρεθεί λιπιδικές ενώσεις (ορμόνες, χοληστερόλη κ.α.). Σε 50 ml FBS προστίθενται 0.125 g charcoal και 0.0125 g dextran, αναδεύεται και επωάζεται στους 56°C για 30 λεπτά. Φυγοκεντρείται σε 3000 rpm για 15 λεπτά και στο υπερκείμενο προστίθενται οι ίδιες ποσότητες charcoal και dextran. Επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά, φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -20°C (αφού πρώτα φιλτραριστεί).

Παροδικές διαμολύνσεις ευκαρυωτικών κυττάρων (Διαμόλυνση με ίζημα φωσφορικού ασβεστίου)

Η πυκνότητα των κυττάρων στα πιάτα πριν τη διαμόλυνση εξαρτάται από το είδος της κυτταρικής σειράς και τα πιάτα της καλλιέργειας. Έτσι, σε 6-well πιάτα, που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ενεργότητας της λουσιφεράσης, απλώνονται 0.25x10⁶ κύτταρα HEK 293T ανά well και 0.5x10⁶ κύτταρα HepG2 ανά well. Στα p60 πιάτα, που χρησιμοποιούνται για την έκφραση πρωτεϊνών, απλώνονται 0.5x10⁶ κύτταρα HEK 293T και 10⁶ κύτταρα HepG2. Για τη παραγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στα πειράματα αλληλεπιδράσεων, χρησιμοποιούνται p100 πιάτα, στα οποία τοποθετούνται 1.2x10⁶ κύτταρα HEK 293T και 2x10⁶ κύτταρα HepG2. Ο απαραίτητος αριθμός κυττάρων τοποθετείται στα πιάτα και επωάζονται για 24 ώρες, ώστε να ναι 60% confluent, κατά τη διαμόλυνση.

Η μέγιστη ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στις διαμολύνσεις ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος του πιάτου. Συγκεκριμένα στα 6-well γίνεται διαμόλυνση με 6 μg DNA συνολικά, στα p60 η συνολική ποσότητα διαμόλυνσης είναι 15 μg DNA και στα p100 η συνολική ποσότητα διαμόλυνσης είναι 30 μg DNA. Η συμπλήρωση της συνολικής ποσότητας DNA γίνεται με Salmon Sperm DNA.

Το υδατικό μίγμα του DNA αναμιγνύεται με διάλυμα CaCl_2 σε τελική συγκέντρωση 0,25 M και στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 2x HBS (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrose, 42 mM Hepes, pH 7.1±0.1). Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί το ίζημα φωσφορικού ασβεστίου. Έπειτα προστίθεται στην καλλιέργεια των κυττάρων, τα οποία επωάζονται για 8-18 ώρες στους 37°C. Ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού μέσου και αν απαιτείται, προσθήκη των συνδετών σε τελική συγκέντρωση 10^{-6} M (9-*cis*-retinoic acid, 22-(R)-hydroxycholesterol, T0901317) και επωάζονται για 24 ώρες ακόμα.

Μετρήσεις ενζυματικής δραστηριότητας γονιδίων μαρτύρων

Συλλογή κύτταρων με Promega Lysis Buffer

Τα κύτταρα (HEK 293T/HepG2) πλένονται με 1ml 1x PBS και υπόκειντο σε λύση παρουσία 500/200 μl 1x διάλυμα λύσης (Promega Lysis Buffer) και επώασης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Τα κύτταρα συλλέγονται, αναδεύονται ισχυρά, παγώνουν (στους -80°C) για 15 λεπτά και ξεπαγώνουν (στους 37°C) για 2 λεπτά. Έπειτα, φυγοκεντρώνονται σε 13000 rpm, για 5 λεπτά ώστε να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο (κυτταρικό εκχύλισμα) που περιέχει τη λουσιφεράση και τη β-γαλακτοσιδάση, χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις δραστηριότητας των ενζύμων.

Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της λουσιφεράσης

Τα κύτταρα διαμολύνονται εκτός των άλλων και με φορέα έκφρασης της λουσιφεράσης. Μπροστά από την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου υπάρχει ο εκάστοτε υπό μελέτη υποκινητής.

Σε 60 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται ίσος όγκος από το μίγμα υποστρώματος της λουσιφεράσης και μετράται η ενεργότητα της λουσιφεράσης (μεταγραφική ενεργοποίηση) στο λουμινόμετρο (luminometer), δίνοντας σχετικές μονάδες φωτός (RLU-Relative Light Units).

Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης ήταν κλωνοποιημένο μετά από υποκινητή CMV ώστε να εκφράζεται στα κύτταρα συστατικά. Εφόσον ο υποκινητής είναι ο ίδιος σε κάθε πείραμα, αναμένεται η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης να είναι σταθερή. Έτσι οι τιμές για την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμεύουν για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης και της εξομίωσης του αριθμού των χρησιμοποιούμενων κυττάρων.

5 ή 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος (για HEK ή HepG2 αντίστοιχα) αναμιγνύονται με 594 μl διαλύματος που περιέχει 132μl ONPG (O-nitrophenol-galactoside, 8 mg/ml σε P buffer), 6μl Mg²⁺ buffer (KCl 1M, MgCl₂ 0.1 M, 352mM β-mercaptoethanol), 456μl P buffer 0.1 M, pH 7.3 (Sodium phosphate buffer - Na₂HPO₄), αναδεύονται ισχυρά και επωάζονται στους 37 °C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 200 μl διαλύματος Na₂CO₃ 1M και μετράται η οπτική απορρόφηση στα 410 nm, σε φωτόμετρο.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με Promega Lysis Buffer

Τα κύτταρα πλένονται με 1x PBS και συλλέγονται με ξύστρα σε 1x PBS. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται (σε 5000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να απομακρυνθεί το PBS και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1x διάλυμα λύσης (Promega Lysis Buffer). Ακολουθεί πάγωμα (στους -80°C, για 15 λεπτά) και ξεπάγωμα (στους 4°C) για να σπάσουν τα κύτταρα και έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται (σε 13000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) φυλάσσεται στους -80°C.

Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με Co-IP Lysis Buffer

Τα κύτταρα πλένονται με 1x PBS και συλλέγονται με ξύστρα σε 1x PBS. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται (σε 5000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να απομακρυνθεί το PBS και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 550 μl κρύου Co-IP Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10%Glycerol, 1% Triton X-100 και αναστολείς πρωτεασών PMSF 100 mM (10μl/ml), benzamidine 0.5 M (1μl/ml)). Ακολουθεί περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C και έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται (σε 13000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις συνανοσοκατακρήμνισης.

Απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με WCE Lysis Buffer

Τα κύτταρα πλένονται με 1x PBS και συλλέγονται με ξύστρα σε 1x PBS . Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται (σε 5000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να απομακρυνθεί το PBS και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 μl διάλυμα λύσης WCE (20 mM Tris-HCl pH 7.4,

400 mM KCl, 10% Glycerol, 2 mM DTT και αναστολείς πρωτεασών). Ακολουθούν 3 κύκλοι διαδοχικών παγωμάτων (στους -80°C , για 15 λεπτά) και ξεπαγωμάτων (στους 4°C) για να σπάσουν τα κύτταρα και έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται (σε 13000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) φυλάσσεται στους -80°C .

Απομόνωση και καθαρισμός GST-Χιμαιρικών πρωτεϊνών

Επιδεκτικά κύτταρα BL21 E.coli μετασχηματίζονται με την κατασκευή του γονιδίου σε pGEX πλασμίδιο, μολύνεται μικρή βακτηριακή καλλιέργεια (10 ml LB) με μια αποικία και αναπτύσσεται μεγάλη καλλιέργεια (200 ml LB) στους 37°C μέχρι η οπτική απορρόφηση σε 600 nm να είναι 0.6 έως 0.8 ($\text{OD}_{600} = 0.6-0.8$). Η επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης γίνεται παρουσία 1 mM IPTG, στους 37°C για 3-4 ώρες και τα βακτήρια φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm, για 20 λεπτά στους 4°C . Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 9 ml 1x PBS στον πάγο. Τα βακτήρια σπάνε με 10 παλμούς υπερήχων διάρκειας 30 δευτερολέπτων, προστίθεται Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και το εκχύλισμα περιστρέφεται για 30 λεπτά στους 4°C . Ακολουθεί φυγοκέντρηση (σε 9 eppendorfs) στις 10000 rpm, για 10 λεπτά στους 4°C , ώστε να κατακρημνιστούν τα βακτηριακά υπολείμματα και το υπερκείμενο (1°) φυλάσσεται στον πάγο (έπειτα στους -80°C).

Οι πελλέτες, που πιθανώς έχουν συσσωματώματα της χιμαιρικής πρωτεΐνης (inclusion bodies), επαναδιαλύονται σε 300 μl Solubilization Buffer (1 mM EDTA, 25 mM Triethanolamine, 1.5% Sarcosyl) και περιστρέφονται για 10 λεπτά στους 4°C . Προστίθεται Triton X-100 και CaCl_2 σε τελική συγκέντρωση 2% και 1 mM αντίστοιχα και φυγοκεντρώνται στις 10000 rpm, για 10 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο (2°) φυλάσσεται στον πάγο. Μια ποσότητα από τα δύο υπερκείμενα υπόκεινται σε SDS-PAGE και το πήκτωμα βάφεται με χρωστική Coomassie για να ελεγχθεί σε ποιο υπερκείμενο εντοπίζεται η πρωτεΐνη. Περίπου 3 ml από το κατάλληλο υπερκείμενο αναμιγνύονται με σφαιρίδια σεφαρόζης που έχουν επάνω τους γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose beads) (~250μl, 50% slurry) τα οποία έχουν πρώτα εξισορροπηθεί σε 1x PBS (10 φορές τον όγκο των σφαιριδίων) και αφήνονται να αλληλεπιδράσουν ολονύχτια στους 4°C υπό περιστροφή.

Ακολουθούν 4-5 πλυσίματα με 1x PBS-1% Triton (10 φορές τον όγκο των σφαιριδίων), με ενδιάμεση περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C και ένα πλύσιμο με 10 ml 1x PBS. Στα σφαιρίδια προστίθεται ίσος όγκος 1x PBS και φυλάσσεται στους 4°C . Μικρή ποσότητα σφαιριδίων υπόκειται σε SDS-PAGE και το πήκτωμα βάφεται με Coomassie για να γίνει ορατή η χιμαιρική GST πρωτεΐνη.

Μέτρηση ποσότητας πρωτεϊνών (Bradford-Lawry)

Για τη μέτρηση της ολικής ποσότητας των πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια A, B, και S της Bio-Rad. Αναμιγνύονται 195 μl

νερό, 5 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, 100 μl Α' διαλύματος (1ml αντιδραστηρίου A + 20 μl αντιδραστηρίου S) και 800 μl αντιδραστηρίου B. Επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 750 nm. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που περιέχεται στα 5 μl υπολογίζεται από τη σχέση :

$x = (OD - 0.02348) / 0.00745$ (x= η ποσότητα της πρωτεΐνης σε μg και OD = οπτική πυκνότητα).

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα, το πήκτωμα συσσώρευσης των πρωτεϊνών (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (running gel, 8.5%, 10.5%, 12.5%). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πηκτωμάτων είναι το διάλυμα 30% ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης, το διάλυμα separating gel buffer (1.5 M Tris base, 0.4% SDS, pH 8.8), το διάλυμα stacking gel buffer (0.5 M Tris base, 0.4% SDS, pH 6.8), 10% APS (Ammonium Persulfate), και TEMED (Tetramethylethylenediamine). Οι πρωτεΐνες πριν ηλεκτροφορηθούν αποδιατάσσονται στους 100°C, παρουσία του διαλύματος 4x sample buffer. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TGS (0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1% SDS).

Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)

Οι πρωτεΐνες αφού ηλεκτροφορηθούν, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran/Whatman), παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Transfer buffer (0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1% SDS, 20% methanol). Η μεμβράνη πλένεται με το διάλυμα πλύσης TBS-T 0.05% (1X TBS: 50 mM Tris.HCl, pH 7.3, 154 mM NaCl και 0.05% Tween-20) και επωάζεται με 5% γάλα (σε TBS-T 0.05%) για μια ώρα, ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύχτια, στους 4°C. Στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται τρεις φορές για 10 λεπτά με TBS-T 0.05%, και επωάζεται με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις για 10 λεπτά με TBS-T 0.05% και μια πλύση για 5 λεπτά με TBS. Τέλος, εμφανίζεται η μεμβράνη σε φιλμ, αφού πρώτα επωαστεί με το μίγμα του ECL (Super Signal West Pico chemiluminescent substrate).

Χρώση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης

Η χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης γίνεται με τη χρωστική Coomassie Blue. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με το διάλυμα της Coomassie Blue για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομάκρυνση της περίσσειας

της χρωστικής ακολουθεί επώαση του πηκτώματος σε διάλυμα fast destaining (50% methanol και 10% acetic acid) για 1 ώρα και σε διάλυμα slow destaining (7.5% methanol και 5% acetic acid) ολονύχτια.

Ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών in vitro (GST pull down assay)

Τα σφαιρίδια με τη GST-Χιμαιρική πρωτεΐνη εξισορροπούνται σε 1 ml 2x Interaction buffer (40 mM Hepes pH 7.9, 0.4% NP40, 0.4 % BSA, 15% Glycerol, 4 mM PMSF Aprotinin, benzamidine). Έπειτα προστίθενται 200μl 2x Interaction buffer, κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (WCE Lysis buffer) και ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 400μl. Η αντίδραση της αλληλεπίδρασης επωάζεται ολονύχτια, στους 4⁰C υπό περιστροφή. Επίσης 1/4 της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που προστίθεται για την αλληλεπίδραση φυλάσσεται για input. Ακολουθεί ένα πλύσιμο με 1 ml Washing buffer -100 mM KCl (100 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.2 % NP40, 4 mM PMSF, Aprotinin, benzamidine), και δύο πλύσιμα με 1 ml Washing buffer -250 mM KCl (250 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.2 % NP40, 4 mM PMSF, Aprotinin, benzamidine) με ενδιάμεσες περιστροφές για 10 λεπτά στους 4⁰C. Τα σφαιρίδια και τα input βράζονται με 4x sample buffer, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αναλύονται σε Western Blot.

Συν-ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation)

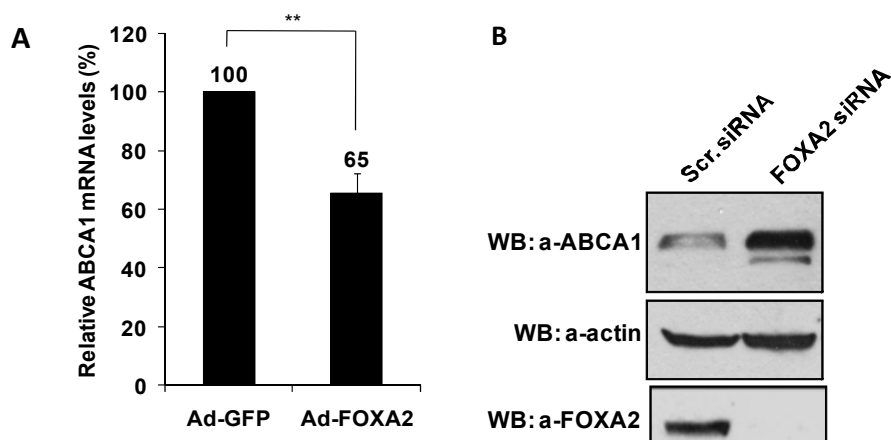
Για την συν-ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με Co-IP Lysis Buffer. Αφού ποσοτικοποιηθεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, υπόκειται σε καθαρισμό (Pre-cleaning) με τη προσθήκη 40μl 50% σφαιριδίων πρωτεΐνης G (που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS) και περιστροφή για 30 λεπτά, σε 4⁰C. Αφαιρούνται τα σφαιρίδια με σύντομη φυγοκέντρηση, και σε όγκο που αντιστοιχεί ίδια ποσότητα πρωτεϊνών, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος, ειδικού για την πρωτεΐνη που θέλουμε να κατακρημνιστεί. Ακόμη προστίθεται Co-IP Lysis Buffer, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 500μl. Τα δείγματα περιστρέφονται ολονύχτια στους 4⁰C, για να προσδεθεί το αντίσωμα στην πρωτεΐνη. Επίσης 1/16 της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για την αντίδραση, φυλάσσεται για input. Κατόπιν, στα δείγματα προστίθενται 40μl 50% εξισορροπημένων σφαιριδίων πρωτεΐνης G και αφήνονται σε περιστροφή για 1 ώρα στους 4⁰C, ώστε να προσδεθεί το αντίσωμα στην πρωτεΐνη G. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1 ml παγωμένου Co-IP Lysis Buffer (περιστροφή στους 4⁰C, για 10 λεπτά και σύντομη φυγοκέντρηση) και στα σφαιρίδια προστίθεται 4x Sample Buffer. Μετά από βρασμό 10 λεπτών, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αναλύονται σε Western Blot με αντίσωμα είτε για την ίδια πρωτεΐνη είτε για κάποια άλλη που ενδεχομένως να συν-ανοσοκατακρημνίστηκε εάν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α

Περίληψη πρόσφατων δεδομένων

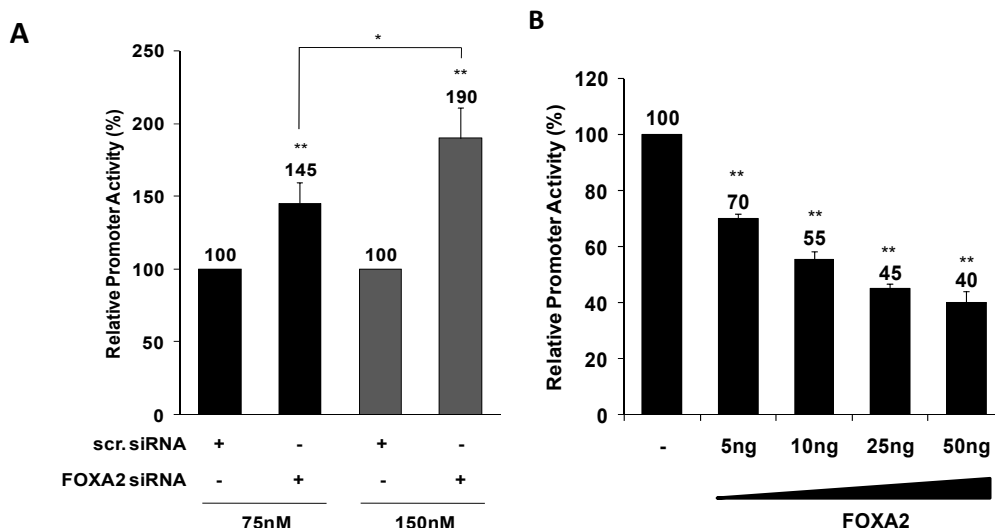
Πρόσφατα δεδομένα από το εργαστήριο μας, έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 παίζει αρνητικό ρόλο στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα²⁵⁴. Ηπατικά κύτταρα (HepG2) μολύνθηκαν με έναν αδenoϊό ο οποίος εκφράζει τον παράγοντα FOXA2 και ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA με αντίδραση PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Με τα επίπεδα mRNA του GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) έγινε κανονικοποίηση των δειγμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11A, η υπερέκφραση του FOXA2 στα κύτταρα HepG2 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ABCA1 κατά 35%. Ακόμη, η αποσιώπηση της έκφρασης του ενδογενούς FOXA2, χρησιμοποιώντας ειδικό si-RNA, οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης του ABCA1 (εικόνα 11B).



Εικόνα 11. Ο FOXA2 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης του γονιδίου ABCA1. A) Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τον αδenoϊό ελέγχου Ad-GFP ή τον αδenoϊό Ad-FOXA2 για 3 ώρες. Απομονώθηκε το RNA από τα κύτταρα 24 ώρες μετά και χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), χρησιμοποιώντας εκκινητές για το cDNA του ABCA1. B) Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με scrambled siRNA ή FOXA2 siRNA. Μετά από 24 ώρες, τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με Western blot, για την έκφραση του ABCA1, FOXA2 και ακτίνης²⁵⁴.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο si-RNA για τον FOXA2 σε κύτταρα HepG2, αποδείχτηκε ότι η αποσιώπηση του FOXA2 σχετίζεται με αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή (-668/+205) του γονιδίου ABCA1 κατά 2 φορές (εικόνα 12A). Αντίθετα, η υπερέκφραση του FOXA2 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα κύτταρα HEK293T,

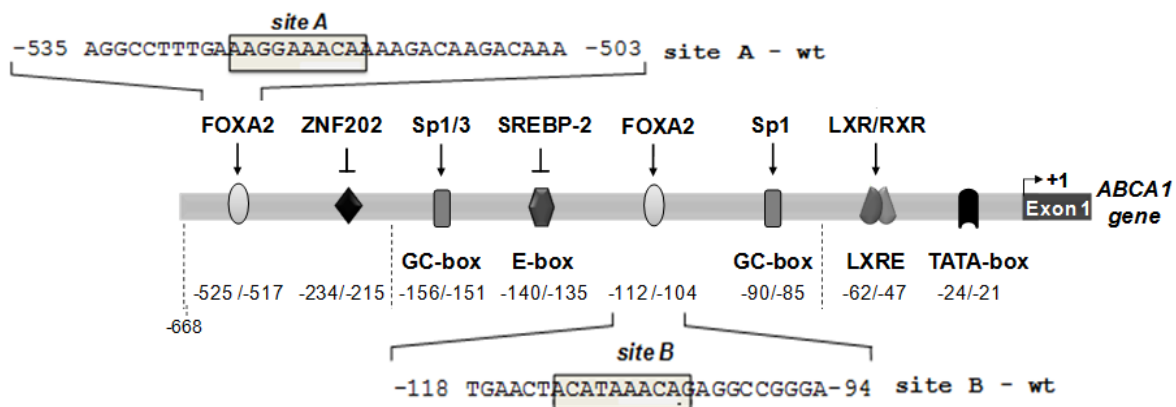
είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργότητας του υποκινητή (-668/+205) του γονιδίου ABCA1 κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (εικόνα 12B). Μόλις 5 ng από το φορέα έκφρασης του FOXA2 ήταν αρκετά για να μειώσουν την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 κατά 30%, ενώ 50ng από τον φορέα FOXA2 οδήγησαν σε μείωση κατά 60%.



Εικόνα 12. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Α) Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc μαζί με 75 και 150nM από scrambled siRNA ή FOXA2 siRNA. Β) Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενός φορέα έκφρασης FOXA2.

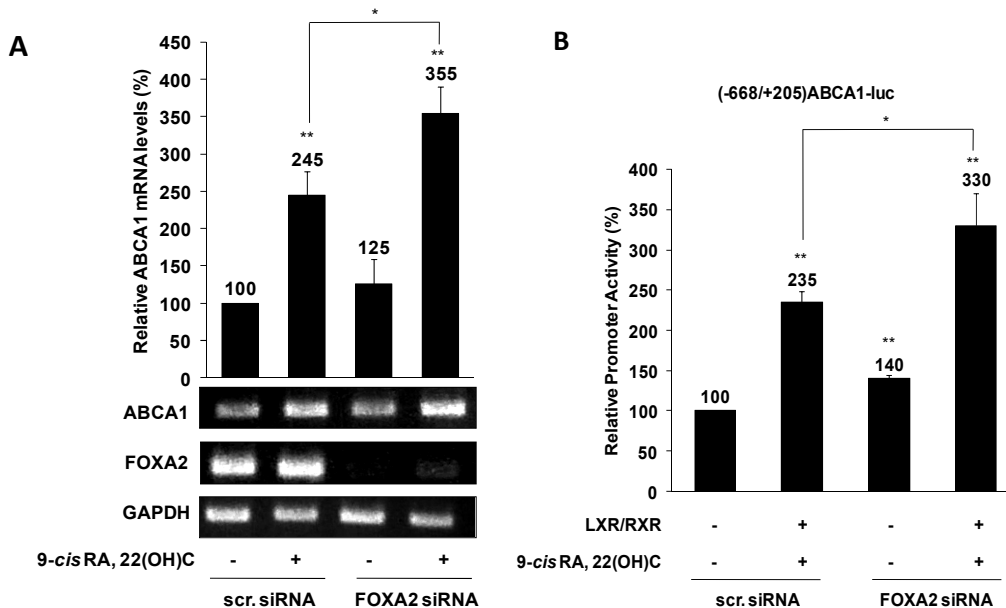
Στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 του ανθρώπου εντοπίστηκαν δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα FOXA2, που έχουν ομολογία με τη συντηρημένη αλληλουχία αναγνώρισης των FOXA2 (5'-T(G/A)TTT(A/G)(C/T)T-3'). Οι θέσεις αυτές, A (-525/-517) και B (-108/-100), βρίσκονται κοντά σε περιοχές πρόσδεσης άλλων καταστολέων της μεταγραφής του ABCA1 (ZNF202, USF1/2, SREBP-2), αλλά και σε περιοχές πρόσδεσης ενεργοποιητών (εικόνα 13). Αποδείχτηκε ότι ο FOXA2 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με παρόμοια συγγένεια στις θέσεις A και B. Μεταλλαγές στις θέσεις αυτές οδήγησαν σε απώλεια πρόσδεσης του FOXA2 και σε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 συμπεραίνοντας ότι οι νέες αυτές θέσεις πρόσδεσης του FOXA2 έχουν ανασταλτικό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου του ABCA1.

Επιπλέον, ανακαλύφθηκε μία ακόμη θέση πρόσδεσης του FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η τρίτη θέση πρόσδεσης είναι το στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, το οποίο λειτουργεί σαν περιοχή συναρμολόγησης της μεταγραφικής μηχανής. Ο FOXA2 προσδένεται σ' αυτή τη θέση με μικρή συγγένεια, αλλά όταν μεταλλαχθεί το στοιχείο TATA box χάνεται η κατασταλτική δράση του FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1²⁵⁴.



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου υποκινητή του γονιδίου ABCA1, όπου μέσα σε πλαίσιο φαίνεται η αλληλουχία των δύο πιθανών θέσεων πρόσδεσης του FOXA2 (site A και site B). Επίσης, παρουσιάζονται οι θέσεις πρόσδεσης άλλων ρυθμιστικών παραγόντων (θετικών ή αρνητικών ρυθμιστών).

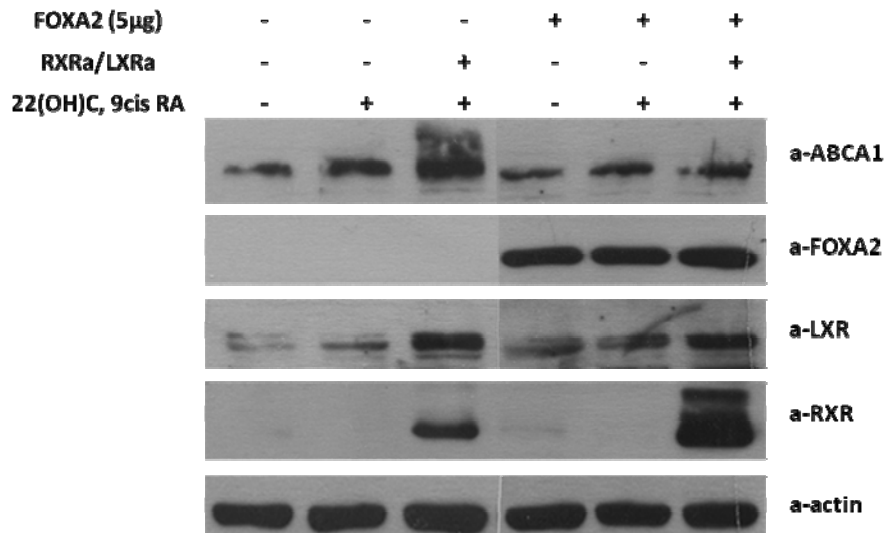
Αποδείχτηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14A, η αποσιώπηση του FOXA2 στα κύτταρα HepG2, μέσω του ειδικού siRNA, ενίσχυσε την επαγωγή του ABCA1 από τους συνδέτες των LXR/RXR, (22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ αντίστοιχα), σε επίπεδο mRNA. Παρουσία του FOXA2 siRNA, η επαγωγή του ABCA1 από τους συνδέτες είναι κατά 2,8 φορές αυξημένη. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και σε πείραμα στο οποίο μετρήθηκε η ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η προσθήκη των δύο συνδετών αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή κατά 2,3 φορές. Ομως, η αποσιώπηση του FOXA2 ενίσχυσε τόσο τα βασικά επίπεδα όσο και την επαγόμενη από τους συνδέτες ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 κατά 1,4 φορές (εικόνα 14B)²⁵⁴.



Εικόνα 14. Η αποσιώπηση του ενδογενούς FOXA2 , οδηγεί σε ενισχυμένη επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Α) Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με scrambled siRNA ή FOXA2 siRNA, παρουσία ή απουσία 22(OH)C και 9-cis RA (10-6M) για 24 ώρες. . Απομονώθηκε το RNA από τα κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), χρησιμοποιώντας εκκινητές για το cDNA του ABCA1 και FOXA2. Β) Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc μαζί με scrambled siRNA ή FOXA2 siRNA, φορείς έκφρασης για LXRα/RXRα, παρουσία ή απουσία 22(OH)C και 9-cis RA (10-6M) για 24 ώρες.

Ο FOXA2 αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 από τους LXR/RXR (και τους συνδέτες τους), χωρίς να εμποδίζει την πρόσδεσή τους στο LXRE.

Θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε την κατασταλτική δράση του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στην επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή (εικόνα 14) και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Έτσι, κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με έναν φορέα έκφρασης του FOXA2, μαζί με φορείς έκφρασης για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα. Οι υποδοχείς LXRα/RXRα ενεργοποιήθηκαν με τη χορήγηση των αγωνιστών τους, 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-cis-ρετινοϊκό οξύ αντίστοιχα, για 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα, παρουσία των αγωνιστών τους ενεργοποίησαν την έκφραση του γονιδίου ABCA1. Ωστόσο, η ταυτόχρονη έκφραση του FOXA2 εμπόδισε την επαγωγή του ABCA1 και μάλιστα η έκφραση του ABCA1 έφτασε τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης.



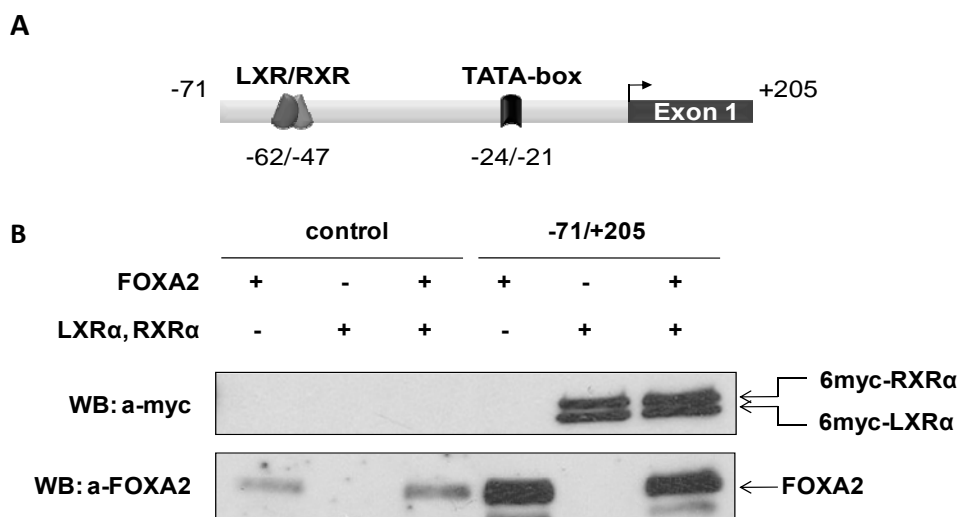
Εικόνα 15. Η υπερέκφραση του παράγοντα FOXA2 καταστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του μεταφορέα ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του FOXA2 (5μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα (2μg ο καθένας), παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος ($10^{-6}M$) για 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανιχνεύθηκε η έκφραση του ABCA1 με Western blot, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-ABCA1 (rabbit). Η έκφραση των υποδοχέων LXRα/RXRα και του παράγοντα FOXA2, ανιχνεύθηκε με τα ειδικά γι αυτούς αντισώματα. Τα επίπεδα της ακτίνης ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα anti-actin, για κανονικοποίηση της ποσότητας των δειγμάτων.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, μπορούν να προκύψουν τουλάχιστον δύο πιθανοί μηχανισμοί καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον μεταγραφικό παράγοντα FOXA2. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, ο FOXA2 αφού προσδεθεί στις θέσεις A και B του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες συνκαταστολείς (απακετυλάσες ιστονών ή πρωτεΐνες αναδόμησης νουκλεοσωμάτων) και να οδηγήσει στη συμπύκνωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να καταστείλει την μεταγραφή του γονιδίου του ABCA1. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, ο FOXA2 θα μπορούσε να προσδεθεί στις θέσεις A, B και στο στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, να αναστείλει την πρόσδεση των ετεροδιμερών LXRα/RXRα στο στοιχείο LXRE που βρίσκεται κοντά στις θέσεις αυτές και να εμποδίσει με αυτό τον τρόπο την επαγωγή του γονιδίου του ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες και ρετινοειδή.

Με πειράματα κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNA affinity precipitation, DNAP) *in vitro* αποδείχθηκε ότι το δεύτερο μοντέλο δεν ισχύει. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή -71/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και περιλαμβάνει τόσο το LXRE όσο και το στοιχείο TATA (εικόνα 16A). Όπως φαίνεται στην εικόνα 16B, το ετεροδιμερές LXRα/RXRα προσδένεται στο στοιχείο LXRE τόσο

απουσία όσο και παρουσία υπερεκφρασμένου FOXA2, αλλά επίσης και η πρόσδεση του FOXA2 στην ίδια περιοχή δεν επηρεάζεται από την παρουσία υπερεκφρασμένων LXRα/RXRα. Συνεπώς, τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα και ο FOXA2 μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα στην περιοχή -71/+205 του υποκινητή του ABCA1²⁵⁴.



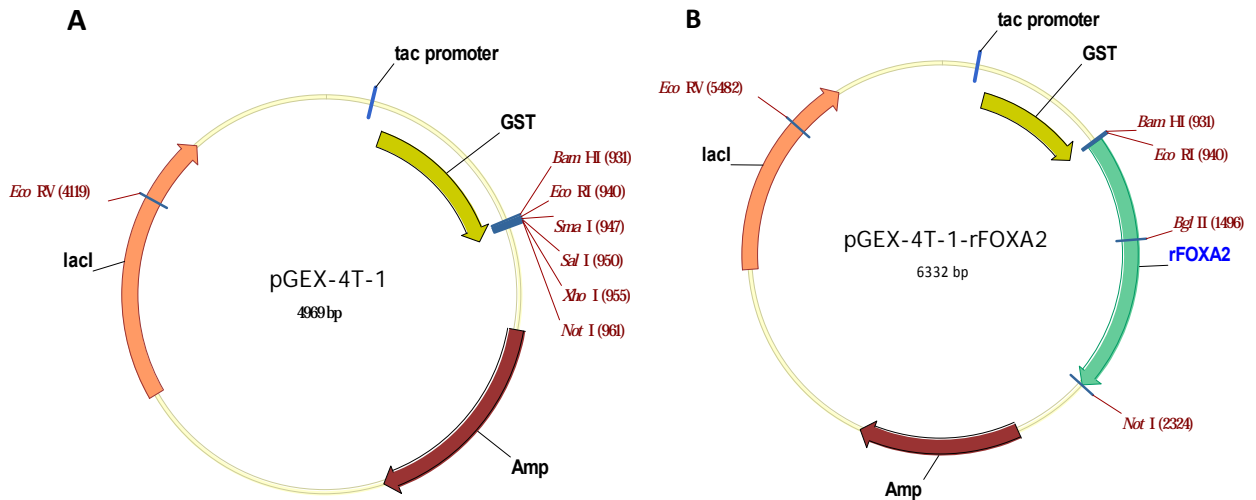
Εικόνα 16. Ο FOXA2 δεν παρεμποδίζει τη πρόσδεση του ετεροδιμερούς LXRα/RXRα στον υποκινητή του ABCA1.

A) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής -71/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα DNAP στο B. B) Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης για τους 6myc-LXRα, 6myc-RXRα ή FOXA2. Εκχύλισμα από κύτταρα χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP με το βιοτινυλιωμένο DNA τμήμα που φαίνεται στο A, και η πρόσδεση των LXRα/RXRα ή FOXA2 ανιχνεύθηκε με Western blotting.

Κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-FOXA2 και έκφρασή της σε βακτήρια *E. Coli*

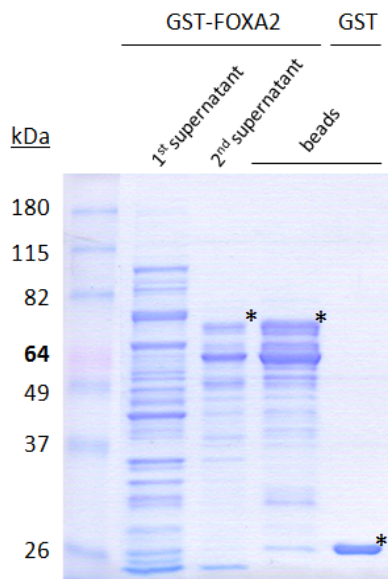
Προκειμένου να κατανοήσουμε το μηχανισμό καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον μεταγραφικό ηπατικό παράγοντα FOXA2, υποθέσαμε ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς LXRα/RXRα και ο FOXA2, οι οποίοι προσδένονται σε κοντινές περιοχές στο DNA, ίσως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και ο FOXA2 εμποδίζει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τους εν λόγω πυρηνικούς υποδοχείς. Για να διαπιστώσουμε αν ισχύει η υπόθεση αυτή, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro* μέσω της πρωτεΐνης GST, ή αλλιώς GST pull down. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήσαμε αρχικά την πλασμιδιακή κατασκευή GST-FOXA2, όπου ο παράγοντας FOXA2 εκφράζεται μαζί με τον επίτοπο GST, ως χιμαιρική πρωτεΐνη. Για την κατασκευή της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-FOXA2, απομονώθηκε η κωδική περιοχή του FOXA2 (του αρουραίου) από τον πλασμιδιακό φορέα pCDNA3-Bio-Foxa2 με τα περιοριστικά ενζύμα *EcoRI-NotI*. Έπειτα

κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX-4T-1 (εικόνα 17A) που φέρει την αλληλουχία του επιτόπου GST. Η ένθεση του FOXA2 στις θέσεις *EcoRI-NotI*, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI*, *BglIII-BamHI* και *EcoRV-BglIII* (εικόνα 17B).



Εικόνα 17. Α) Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του FOXA2 και φέρει την αλληλουχία του GST. Β) Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδιακής κατασκευής που οδηγεί στην παραγωγή της χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-FOXA2. Σημειώνονται οι θέσεις κλωνοποίησης (*EcoRI-NotI*) και οι θέσεις περιορισμού με τις οποίες έγινε η επιβεβαίωση της κλωνοποίησης (*BglIII*, *BamHI*, *EcoRV*).

Βακτήρια *E.coli* μετασχηματίστηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς για τις πρωτεΐνες GST και GST-FOXA2 και έπειτα αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο LB. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν στα κύτταρα *E. coli*, με τη χορήγηση του επαγωγικού μέσου IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), το οποίο είναι ένα ανάλογο λακτόζης. Η πρωτεΐνη GST απομονώθηκε από το πρώτο βακτηριακό εκχύλισμα, ενώ η GST-FOXA2 από το δεύτερο, και έπειτα προσδέθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Στην εικόνα 18 φαίνονται οι πρωτεΐνες, πριν και μετά την πρόσδεση τους στα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

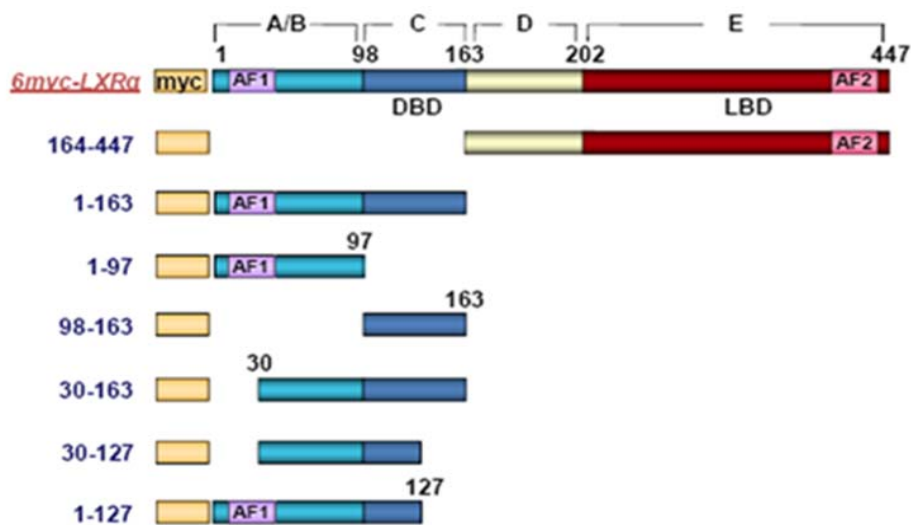


Εικόνα 18. Έκφραση των πρωτεϊνών GST-FOXA2 και GST σε βακτήρια E.coli.

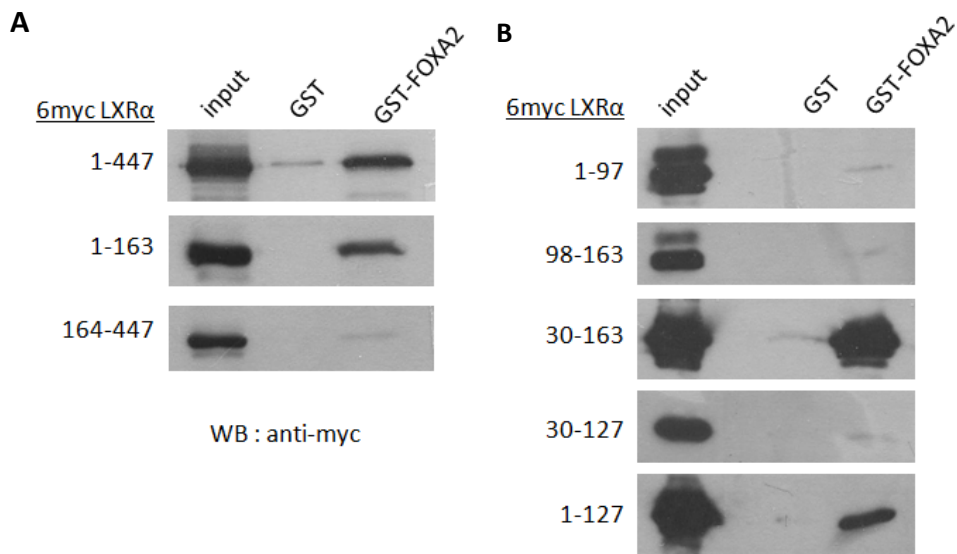
Η πρωτεΐνη GST-FOXA2 εκφράστηκε σε E.coli μετά την προσθήκη IPTG και απομονώθηκε από το 2^ο βακτηριακό εκχύλισμα. Το εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4° C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη στα σφαιρίδια. Η πρωτεΐνη GST απομονώθηκε από το 1^ο βακτηριακό εκχύλισμα. Χρώση του ηλεκτροφόρου με Coomassie blue (οι πρωτεΐνες GST και GST-FOXA2 φαίνονται με αστερίσκο).

Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXA2 και του πυρηνικού υποδοχέα LXRα.

Για να εντοπίσουμε πιθανές φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παράγοντα FOXA2 και του πυρηνικού υποδοχέα LXRα, πραγματοποιήσαμε πειράματα *in vitro* και *ex vivo*. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro*, GST pull down. Στο εργαστήριο ήταν διαθέσιμοι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης του υποδοχέα LXRα και κάποιων ελλειμματικών μορφών του, σε σύντηξη με τον επίτοπο *6myc* (εικόνα 19) οι οποίοι υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293T. Απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες GST και GST-FOXA2, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είχαν προσδεθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά με τον πλήρους μήκους υποδοχέα LXRα (αμινοξέα 1-447), όπως φαίνεται στην εικόνα 20A. Επιπλέον, ο FOXA2 αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του LXRα (αμινοξέα 1-163), που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης του DNA (περιοχή C) και την AF-1 (activation function 1) (περιοχή A/B). Αντιθέτως, ο FOXA2 δεν αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο του LXRα (αμινοξέα 164-447), που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (E) και την hinge περιοχή (D) (εικόνα 20A). Ακόμη, ο FOXA2 αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με την περιοχή 30-163 του LXRα, που περιλαμβάνει τα 67 τελευταία αμινοξέα της περιοχής A/B και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (εικόνα 20B). Όταν απαλείφθηκαν τμήματα των δύο άκρων της περιοχής 30-163 του LXRα (αμινοξέα 30-97 ή 127-163), χάθηκε η αλληλεπίδραση του FOXA2 με τις αντίστοιχες περιοχές του LXRα (98-163 και 30-127). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ελάχιστη περιοχή του πυρηνικού υποδοχέα LXRα που απαιτείται για την αλληλεπίδραση με τον FOXA2 είναι εκείνη που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 30-163.



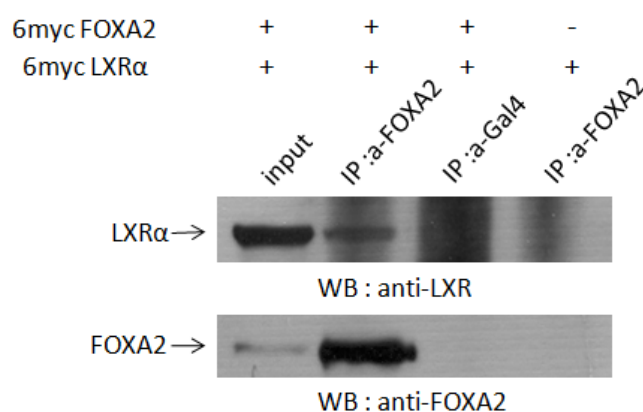
Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα LXRα και των απαλοιφών του σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*. AF1, AF2- Activation function 1,2, DBD- DNA Binding Domain, LBD-Ligand Binding Domain.



Εικόνα 20. Φυσική αλληλεπίδραση *in vitro* μεταξύ του FOXA2 και των απαλοιφών του LXRα.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του LXRα και των απαλοιφών του, σε ποσότητα 15μg. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επωάστηκαν ολονύχτια στους 4° C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή η GST-FOXA2 πρωτεΐνη και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western blot χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον επίτοπο myc (anti-myc mouse). Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αλληλεπίδρασης.

Για να επιβεβαιώσουμε τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα FOXA2 και του υποδοχέα LXRα, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο συν-ανοσοκατακρήμισης πρωτεϊνών *ex vivo* (Co-IP). Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης για τον FOXA2 ή/και τον LXRα υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293T, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες συν-ανοσοκατακρήμισης με το αντίσωμα anti-FOXA2 (ή anti-Gal4, ως control). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υποδοχέας LXRα συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τον παράγοντα FOXA2, επομένως οι δυο μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και *ex vivo* (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Φυσική αλληλεπίδραση *ex vivo* μεταξύ του FOXA2 και του LXRα.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του LXRα (6myc LXRα) και του FOXA2 (6myc FOXA2), σε ποσότητα 10μg, ο καθένας. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις ανοσοκατακρήμισης, με το αντίσωμα anti-FOXA2 ή το anti-Gal4 (μη ειδικό-control). Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τυχόν αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον υποδοχέα LXR (anti-LXR rabbit). Η πρωτεΐνη FOXA2 που ανοσοκατακρημνίστηκε ανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-FOXA2 (goat). Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/16 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ανοσοκατακρήμισης.

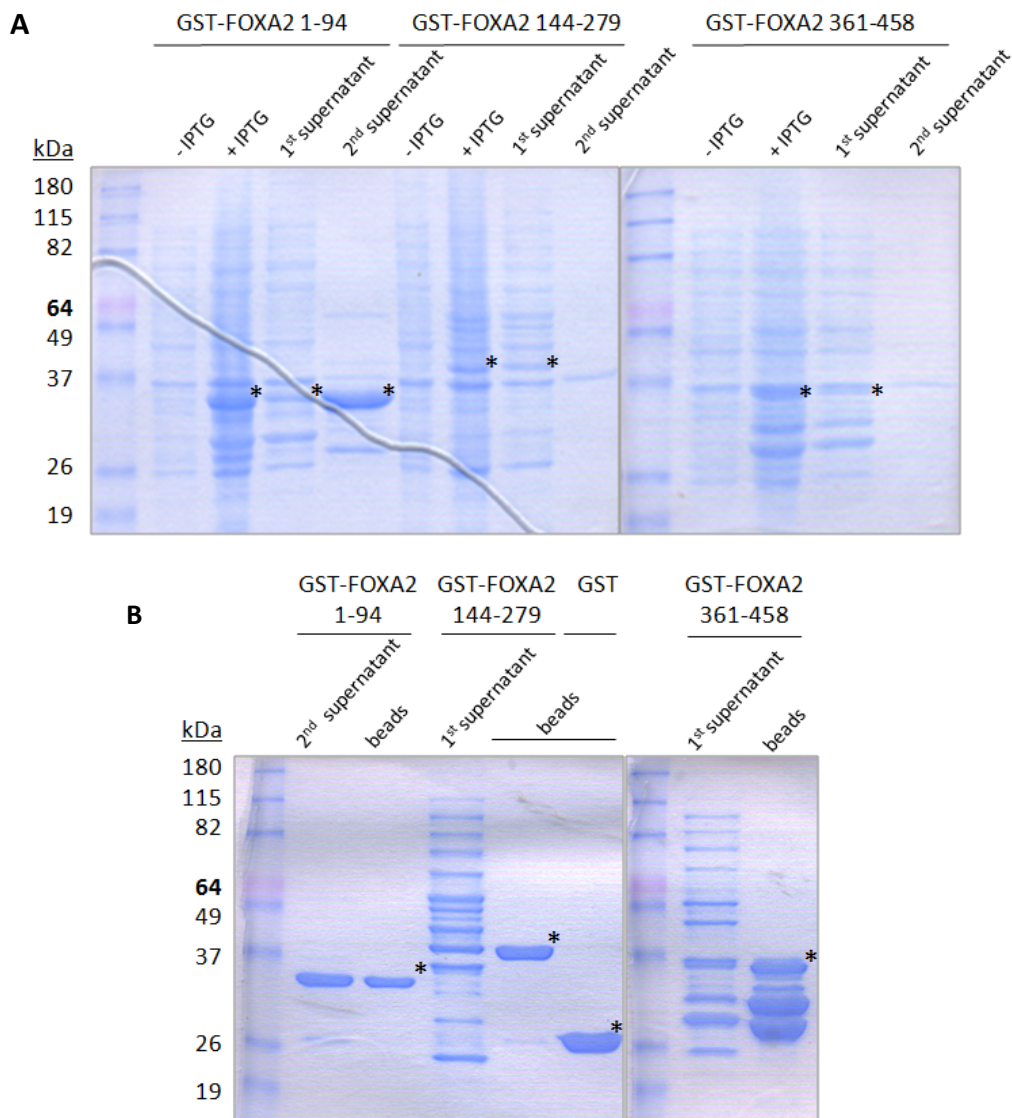
Προσδιορισμός της περιοχής του FOXA2 που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα LXRα.

Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε την περιοχή του FOXA2 που ευθύνεται για την φυσική αλληλεπίδραση με τον LXRα, πραγματοποιήσαμε πειράματα *in vitro* με τη μέθοδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών GST pull down. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε απαλοιφές του παράγοντα FOXA2, σε σύντηξη με τον επίτοπο GST, οι οποίοι ήταν διαθέσιμοι στο εργαστήριο (εικόνα 22). Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του FOXA2 (αμινοξέα 1-94 και 361-458 αντίστοιχα), περιλαμβάνει τις περιοχές Transactivation IV/V και II/III αντίστοιχα, ενώ η ενδιάμεσο τμήμα (αμινοξέα 144-279) αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (I). Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν σε κύτταρα *E.coli* με τη χορήγηση του επαγωγικού μέσου IPTG

(εικόνα 23A), και απομονώθηκαν από το πρώτο βακτηριακό εκχύλισμα (οι GST-FOXA2 144-279 και GST-FOXA2 361-458) ή το δεύτερο βακτηριακό εκχύλισμα (GST-FOXA2 1-94). Στην εικόνα 23B φαίνονται οι πρωτεΐνες που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης.



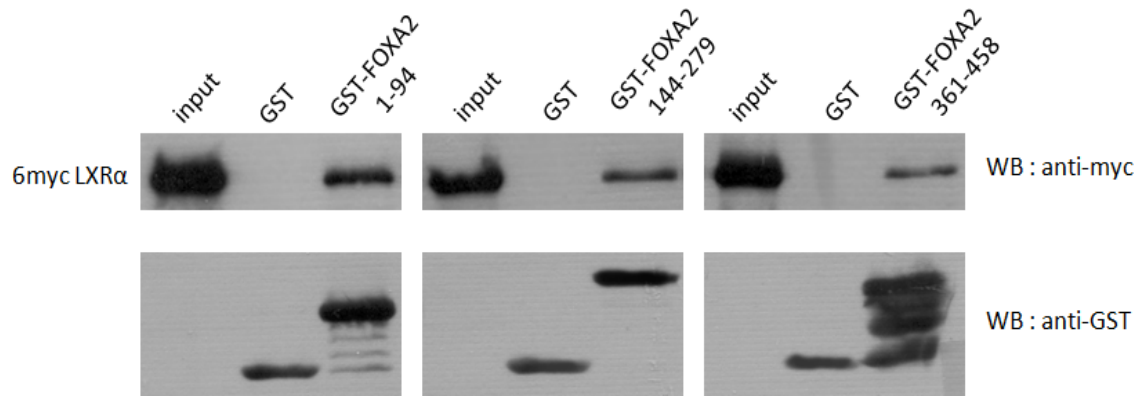
Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του παράγοντα FOXA2 και των απαλοιφών του σε σύντηξη με τον επίτοπο GST, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*.



Εικόνα 23. Έκφραση σε κύτταρα E.coli των απαλοιφών του FOXA2 σε σύντηξη με τον επίτοπο GST.

A) Οι απαλοιφές του FOXA2 (GST-FOXA2 1-94, 144-279, 361-458) εκφράστηκαν σε E.coli μετά την προσθήκη IPTG και απομονώθηκαν από το 1^ο ή 2^ο βακτηριακό εκχύλισμα. B) Το 1^ο ή 2^ο βακτηριακό εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4^ο C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, ώστε να προσδεθούν οι πρωτεΐνες στα σφαιρίδια. Έγινε χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue. Οι απαλοιφές του FOXA2 και η πρωτεΐνη GST φαίνονται με αστερίσκο.

Για να εξετάσουμε ποιές περιοχές του παράγοντα FOXA2 αλληλεπιδρούν με τον LXRα, υπερεκφράστηκε ο φορέας έκφρασης του υποδοχέα LXRα σε κύτταρα HEK293T και απομονώθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των διαμολυσμένων κύτταρων. Έπειτα, το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες GST-FOXA2 1-94, 144-279 και 361-458, οι οποίες, είχαν προσδεθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης με την μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά και με τις τρεις περιοχές του FOXA2 (εικόνα 24).

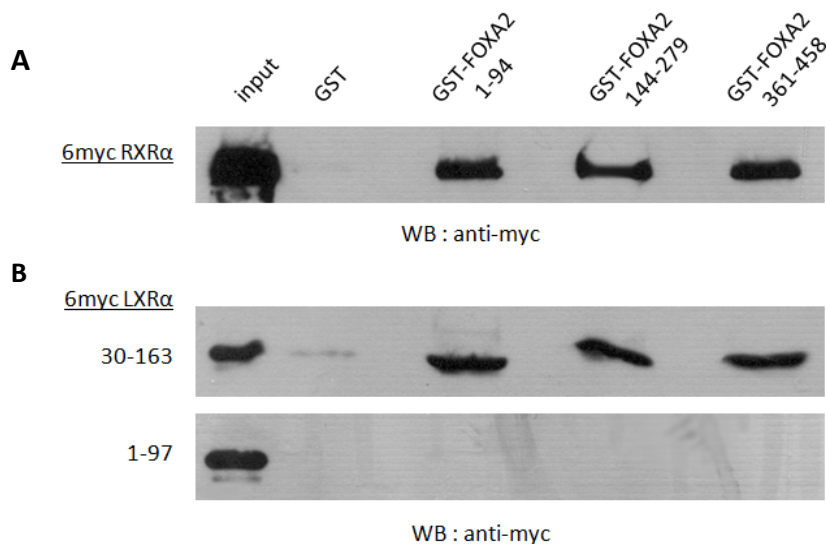


Εικόνα 24. Φυσική αλληλεπίδραση in vitro μεταξύ του LXRα και των απαλοιφών του FOXA2.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του LXRα, σε ποσότητα 15μg. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επωάστηκε ολονύχτια στους 4° C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή οι απαλοιφές της GST-FOXA2 πρωτεΐνης και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον επίτοπο myc (anti-myc mouse). Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αλληλεπίδρασης. Οι ποσότητες των GST πρωτεϊνών ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον επίτοπο GST (anti-GST) και φαίνονται στο κάτω μέρος της εικόνας .

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε αν ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τον RXRα ο οποίος σχηματίζει ετεροδιμερή με τον LXRα και εάν ναι, ποιες είναι οι περιοχές του FOXA2 που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση αυτή. Με τον ίδιο τρόπο όπως και παραπάνω, υπερ-εκφράστηκε ο υποδοχέας RXRα σε κύτταρα HEK293T, απομονώθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των διαμολυσμένων κυττάρων και αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες GST-FOXA2 1-94, 144-279, και 361-458. Όπως φαίνεται στην εικόνα 25A, ο υποδοχέας RXRα (παρόμοια με τον υποδοχέα LXRα-εικόνα 24) αλληλεπιδρά με όλες τις περιοχές του FOXA2.

Για να διαπιστώσουμε την ειδικότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων (των υποδοχέων LXRα και RXRα) και με τις τρεις περιοχές του FOXA2, χρησιμοποιήσαμε δύο απαλοιφές του LXRα, από τις οποίες η μία αλληλεπιδρά με τον FOXA2 (LXRα 30-163) και η άλλη δεν αλληλεπιδρά (LXRα 1-97), σύμφωνα με το αποτέλεσμα της εικόνας 20B. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι η περιοχή του LXRα 30-163 αλληλεπιδρά με τις τρεις περιοχές του FOXA2, ενώ η περιοχή του LXRα 1-97 δεν αλληλεπιδρά με καμία περιοχή του FOXA2 (εικόνα 25B). Επομένως, η αλληλεπιδράσεις των LXRα και RXRα με τις περιοχές του FOXA2, δεν είναι μη ειδικό-τυχαίο αποτέλεσμα.

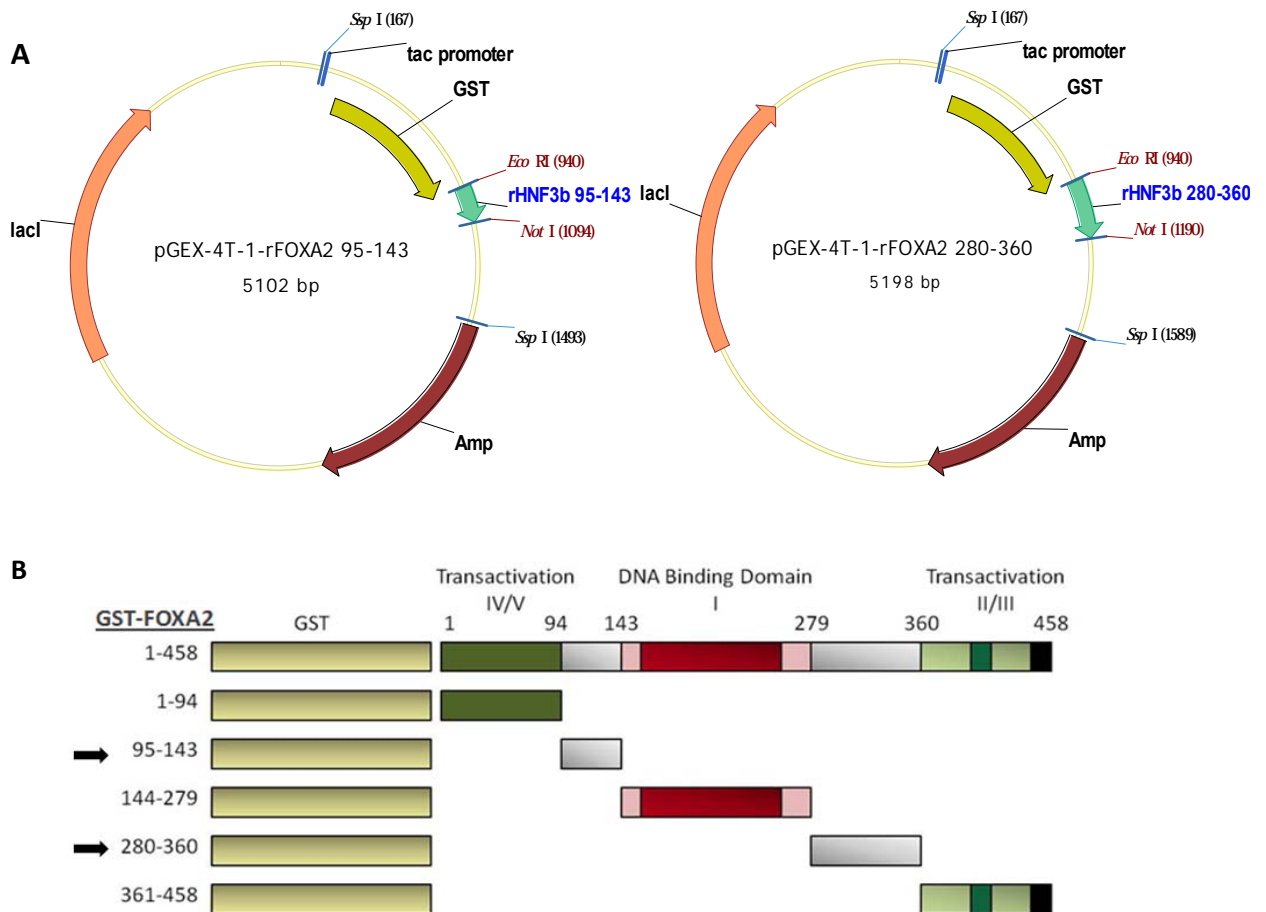


Εικόνα 25. Φυσική αλληλεπίδραση *in vitro* μεταξύ του RXRα και των απαλοιφών του FOXA2.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του RXRα ή των απαλοιφών του LXRα 30-163 (θετικό control) και 1-97 (αρνητικό control), σε ποσότητα 15μg. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επωάστηκαν ολονύχτια στους 4° C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή οι απαλοιφές της GST-FOXA2 πρωτεΐνης και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον επίτοπο myc (anti-myc mouse). Το input αντιστοιχεί περίπου στο ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αλληλεπίδρασης.

Από τη στιγμή που ο πυρηνικός υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα FOXA2 σε τρεις μη επικαλυπτόμενες περιοχές του, θελήσαμε να εξετάσουμε πιθανή αλληλεπίδραση των ενδιάμεσων τμημάτων του FOXA2 με τον LXRα. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε δύο επιπλέον πλασμιδιακούς φορείς που περιέχουν τα ενδιάμεσα τμήματα του FOXA2, τα οποία δεν εξετάστηκαν προηγουμένως. Αυτά τα τμήματα αντιστοιχούν στα αμινοξέα 95-143 και 280-360 του FOXA2.

Για την κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-FOXA2 95-143 και 280-360, απομονώθηκαν τα αντίστοιχα τμήματα της κωδικής περιοχής του FOXA2 (του αρουραίου) μετά από αντίδραση PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-rFOXA2 και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3 (ενότητα υλικά-μέθοδοι). Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της αντίδρασης PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και ένθεση τους στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX-4T-1. Η ένθεση των τμημάτων του FOXA2 στις θέσεις *EcoRI-NotI*, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI*, *EcoRI-SspI*, και *XhoI* (καταργείται μετά την ένθεση των τμημάτων) (εικόνα 26).

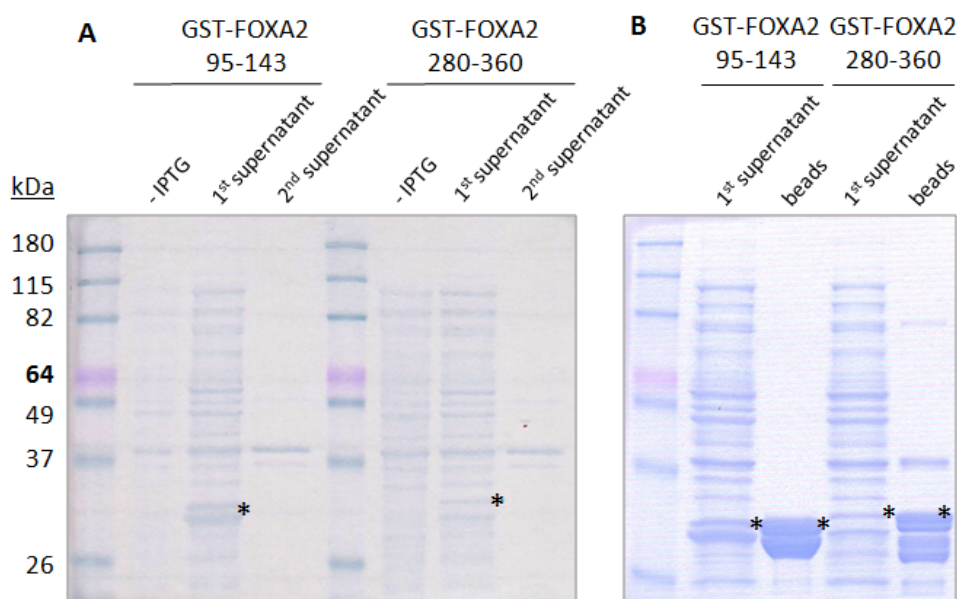


Εικόνα 26. Α) Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών κατασκευών που οδηγούν στην παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-FOXA2 95-143 και GST-FOXA2 280-360. Στους χάρτες, παρουσιάζονται οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης. Β) Σχηματική απεικόνιση του παράγοντα FOXA2 και των απαλοιφών του σε σύντηξη με τον επίτοπο GST, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*. Με βέλος απεικονίζονται οι νέες απαλοιφές του FOXA2.

Οι πρωτεΐνες GST-FOXA2 95-143 και GST-FOXA2 280-360 εκφράστηκαν σε βακτήρια *E. coli* μετά τη προσθήκη του επαγωγικού μέσου IPTG και απομονώθηκαν από το πρώτο βακτηριακό εκχύλισμα (εικόνα 27A). Στην εικόνα 27B φαίνονται οι πρωτεΐνες που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T στα οποία είχε υπερεκφραστεί ο φορέας έκφρασης του LXRα με διαμόλυνση, χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες αλληλεπίδρασης (GST pull down) με τις πρωτεΐνες GST-FOXA2 95-143 και GST-FOXA2 280-360. Όπως φαίνεται στην εικόνα 28, ο υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά ασθενώς με την περιοχή 280-360 του FOXA2 ενώ δεν αλληλεπιδρά με την περιοχή 95-143.

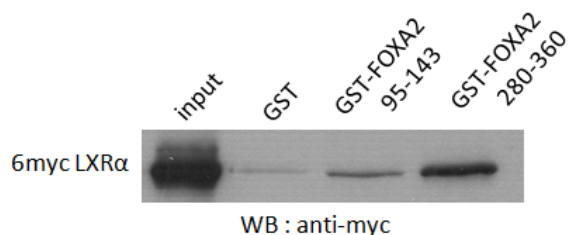
Από τις εικόνες 24 και 28 φαίνεται λοιπόν ότι ο LXRα δεν αλληλεπιδρά με τον FOXA2 στην περιοχή 95-143 αλλά αλληλεπιδρά ισχυρά ή ασθενικά με 4 διαφορετικές περιοχές του. Βασιζόμενοι στα παραπάνω ευρήματα, θα μπορούσαμε

να υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση του FOXA2 και του LXRα δεν είναι άμεση αλλά ίσως διαμεσολαβείται από κάποια άλλη πρωτεΐνη που εκφράζεται στα κύτταρα HEK293T η οποία πιθανώς να παίζει τον ρόλο του «γεφυρωτή» μεταξύ των 2 πρωτεϊνών. Προκειμένου να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, θα μπορούσαμε να εκφράσουμε τον υποδοχέα LXRα *in vitro*, να απομονώσουμε την καθαρή πρωτεΐνη, χωρίς άλλες προσμίξεις πρωτεϊνών και έπειτα να γίνουν δοκιμασίες αλληλεπίδρασης με τα διαφορετικά τμήματα του FOXA2.



Εικόνα 27. Έκφραση σε E.coli των νέων απαλοιφών του FOXA2, σε σύντηξη με τον GST.

A) Οι απαλοιφές του FOXA2 (GST-FOXA2 95-143, 280-360) εκφράστηκαν σε E.coli μετά την προσθήκη IPTG και απομονώθηκαν από το 1^ο βακτηριακό εκχύλισμα. B) Το 1^ο βακτηριακό εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4^ο C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, ώστε να προσδεθούν οι πρωτεΐνες στα σφαιρίδια. Έγινε χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue.(Οι απαλοιφές του FOXA2 φαίνονται με αστερίσκο)



Εικόνα 28. Φυσική αλληλεπίδραση *in vitro*, μεταξύ του LXRα και των νέων απαλοιφών του FOXA2.

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του LXRα, σε ποσότητα 15μg. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4^ο C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή οι απαλοιφές της GST-FOXA2 πρωτεΐνης (95-143, 280-360) και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον επίτοπο myc (anti-myc mouse). Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αλληλεπίδρασης.

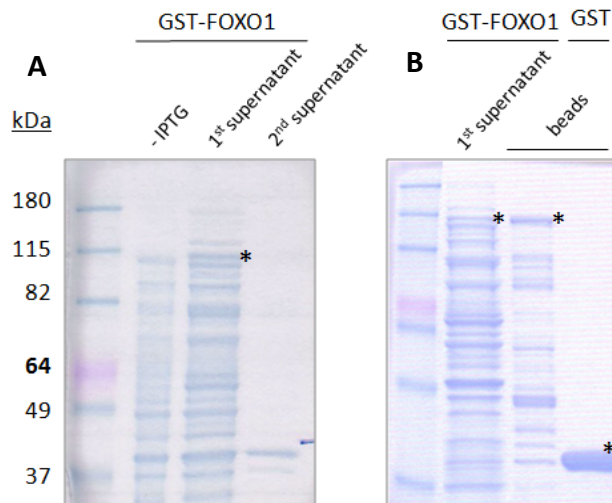
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παράγοντα FOXO1 και του πυρηνικού υποδοχέα LXRα.

Η πρωτεΐνη FOXO1 (Forkhead box O) ή FKHR ανήκει στην υπο-οικογένεια FOXO των μεταγραφικών παραγόντων forkhead box και εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόκριση στο οξειδωτικό στρες και ο μεταβολισμός (γλυκονογένεση, καταβολισμός αμινοξέων, γλυκόλυση, σύνθεση λιπαρών οξέων κ.α.)^{255,256}. Ο FOXO1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης, αφού προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων ενζύμων της γλυκονογένεσης, όπως είναι η PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) και η G6PC (glucose-6-phosphatase), και ενεργοποιεί τη διαδικασία παραγωγής γλυκόζης²⁵⁷⁻²⁵⁹. Περιέχει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού και πυρηνικού αποκλεισμού (NLS-Nuclear Localization Signal, NES-Nuclear Export Signal), οι οποίες του επιτρέπουν να εντοπίζεται σε διαφορετικές υποκυτταρικές περιοχές κατά έναν ρυθμιζόμενο τρόπο. Ο FOXO1 ρυθμίζεται από αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης και της ουβικιτινυλίωσης²⁶⁰. Ένας σημαντικός ρυθμιστής του FOXO1 είναι η κινάση AKT/PKB (serine/threonine kinase Akt/ protein kinase B), η οποία τον φωσφορυλιώνει σε τρία κατάλοιπα (T24, S256, S319) και τον οδηγεί έξω από τον πυρήνα, αναστέλλοντας την ενεργότητα του, σε συνθήκες υψηλών επιπέδων γλυκόζης^{141,261}. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο FOXO1 αλληλεπιδρά με πυρηνικούς υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας των ανδρογόνων (AR)^{262,263}, ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER)²⁶⁴, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) και ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (RAR)²⁶⁵ και μπορεί είτε να ενεργοποιήσει είτε ή να καταστείλει τη δράση τους.

Θελήσαμε, λοιπόν να εξετάσουμε αν ο υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά με την FOXO1 πρωτεΐνη, FOXO1. Για τον εντοπισμό πιθανών φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* (GST pull down) και *ex vivo* (Co-IP).

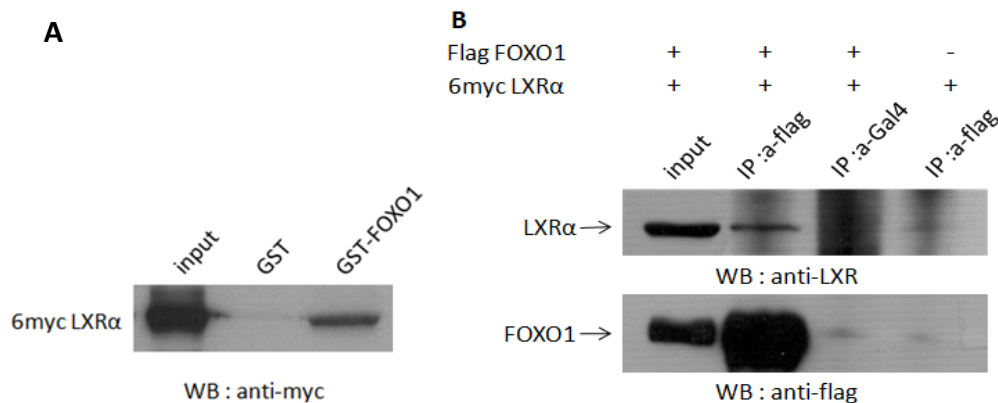
Αρχικά, ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης GST-FOXO1 σε βακτήρια E.coli μετά από επώαση με IPTG και ακολούθησε η απομόνωσή της από το πρώτο βακτηριακό εκχύλισμα (εικόνα 29A). Αφού προσδέθηκε η πρωτεΐνη GST-FOXO1 σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (εικόνα 29B), χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες αλληλεπιδράσεων GST pull down με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HEK293T στα οποία είχε υπερεκφραστεί ο LXRα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 30A, ο υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά ισχυρά με τον παράγοντα FOXO1.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών *ex vivo* (Co-IP), όπου χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HEK293T στα οποία είχαν υπερεκφραστεί οι FOXO1 ή/και LXRα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 30B, ο υποδοχέας LXRα συν-κατακρημνίζεται μαζί με τον παράγοντα FOXO1 (χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-flag), ενδεικτικό της μεταξύ τους φυσικής αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 29. Έκφραση σε E.coli της πρωτεΐνης FOXO1, σε σύντηξη με τον GST.

A) Η πρωτεΐνη GST-FOXO1 εκφράστηκε σε βακτήρια E.coli μετά την προσθήκη IPTG και απομονώθηκε από το 1^ο βακτηριακό εκχύλισμα. Β) Το 1^ο βακτηριακό εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4^ο C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη στα σφαιρίδια. Έγινε χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue (οι πρωτεΐνες GST-FOXO1 και GST φαίνονται με αστερίσκο).



Εικόνα 30. Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του FOXO1 και του LXRα.

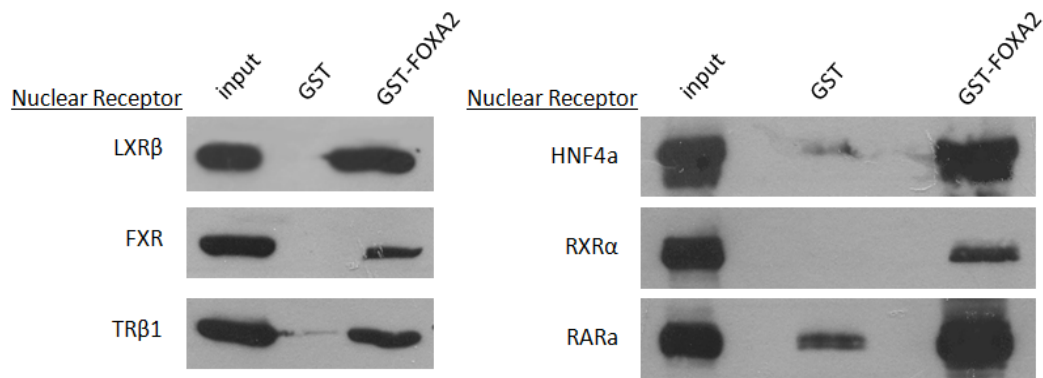
A) Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του LXRα (6myc LXRα) σε ποσότητα 15μg. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε ολονύχτια στους 4^ο C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή η GST-FOXO1 πρωτεΐνη και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc. Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Β) Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του LXRα (6myc LXRα) ή/και του FOXO1 (flag FOXO1), σε ποσότητα 10μg, ο καθένας. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης, με το αντίσωμα anti-flag ή το anti-Gal4 (μη ειδικό-control). Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τυχόν αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-LXR. Η πρωτεΐνη FOXO1 που ανοσοκατακρημνίστηκε ανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-flag. Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/16 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXA2 και άλλων μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών.

Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή, ο FOXA2 και άλλα μέλη της οικογένειας forkhead αλληλεπιδρούν φυσικά με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών. Για παράδειγμα, οι FOXA2 και FOXA1 αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen receptor-AR)²³⁰. Ακόμη, ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς HNF6²⁵¹ και PXR (Pregnane X Receptor)²⁵⁰ και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων –στόχων αυτών των υποδοχέων.

Προκειμένου να ελέγξουμε αν FOXA2 αλληλεπιδρά και με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς επιπρόσθετα των LXRα και RXRα, πραγματοποιήσαμε μια σειρά από δοκιμασίες αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών *in vitro* (GST pull down). Οι HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α), RARα (Retinoic Acid Receptor α), RXRα, LXRβ, FXR (Farnesoid X receptor) και TRβ1 (Thyroid hormone Receptor β1) είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι εκφράζονται στο ήπαρ και ρυθμίζουν πολλά γονίδια-στόχους που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των απολιποπρωτεϊνών, των μεταφορέων χοληστερόλης και των ενζύμων αναδιαμόρφωσης των λιποπρωτεϊνών^{266,267}.

Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης για τους παραπάνω πυρηνικούς υποδοχείς (HNF4α, RARα, TRβ1, FXR, LXRβ, RXRα) υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293T και απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κύτταρων. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη GST-FOXA2, η οποία, είχε προσδεθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 31, ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με τους υποδοχείς RARα, HNF4α και LXRβ, ενώ με τους υποδοχείς FXR, TRβ1 και RXRα αλληλεπιδρά πιο ασθενώς.



Εικόνα 31. Φυσική αλληλεπίδραση in vitro μεταξύ του FOXA2 και διαφόρων πυρηνικών υποδοχέων.

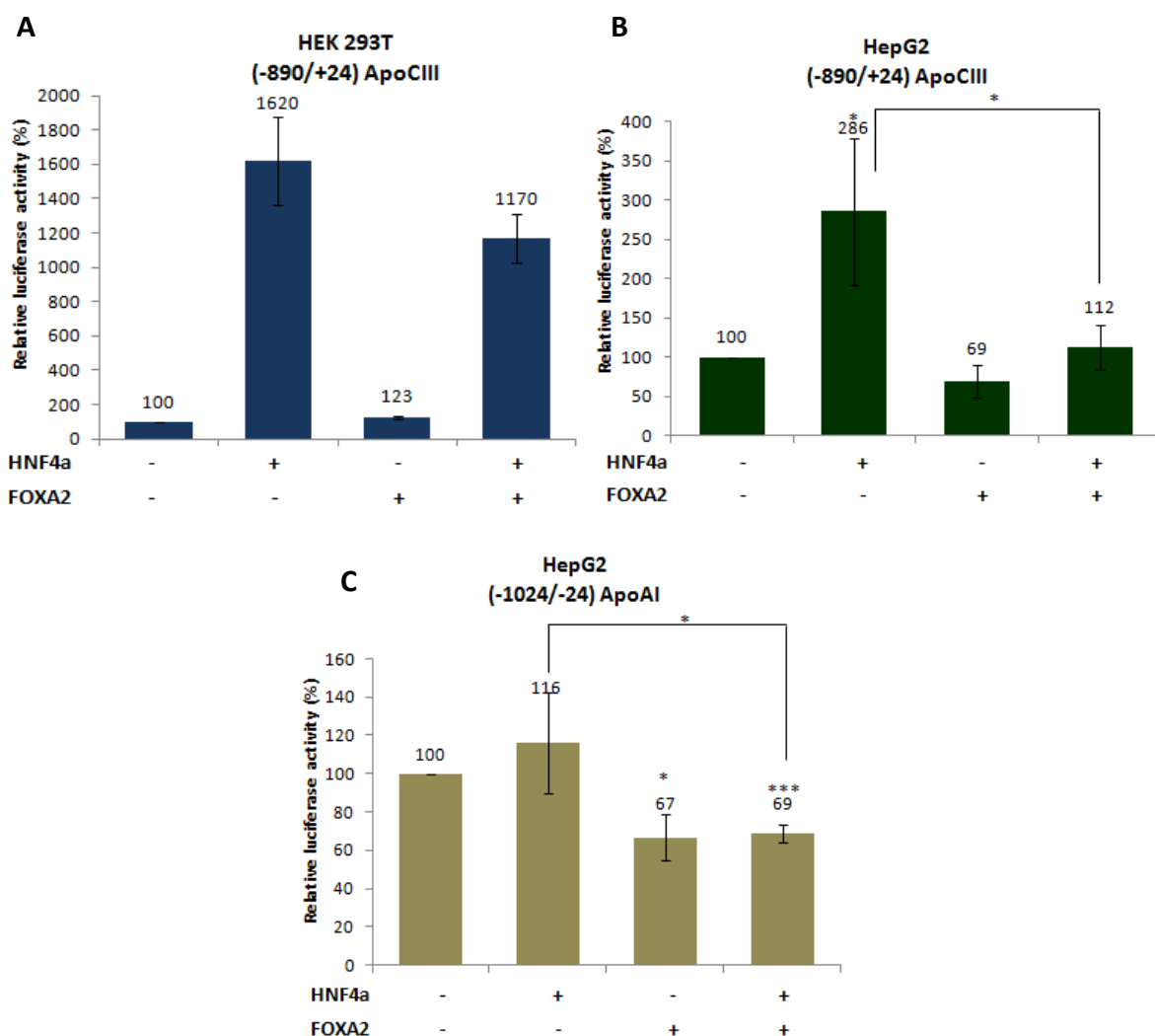
Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης διαφορών πυρηνικών υποδοχέων (LXRβ, FXR, TRβ1, HNF4α, RXRα, RARα) σε ποσότητα 15μg. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επωάστηκαν ολονύχτια στους 4° C με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, στα οποία είχε προσδεθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή η GST-FOXA2 πρωτεΐνη και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Η αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για κάθε υποδοχέα. Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αλληλεπίδρασης.

Ο παράγοντας FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή των υποκινητών των γονιδίων AroCIII και AroAI

Από τη στιγμή που ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά με διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς, θελήσαμε να εξετάσουμε αν αυτή η αλληλεπίδραση έχει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων-στόχων των υποδοχέων. Ο HNF4α προσδένεται σε HREs που υπάρχουν σε υποκινητές διαφόρων γονιδίων απολιποπρωτεϊνών και ρυθμίζουν την έκφρασή τους σε ηπατικά κύτταρα. Δύο τέτοια γονίδια είναι των απολιποπρωτεϊνών AroCIII και AroAI.

Για να διερευνήσουμε την επίδραση της υπερέκφρασης του FOXA2 στην επαγωγή των υποκινητών των παραπάνω γονιδίων, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 και HEK293T. Για τις διαμολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια (-890/+24) AroCIII και (-1024/-24) AroAI, στα οποία είχαν κλωνοποιηθεί οι περιοχές -890/+24 και -1024/-24 των υποκινητών των γονιδίων AroCIII και AroAI, αντίστοιχα, μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 32A, ο παράγοντας HNF4α ενεργοποίησε τον υποκινητή του γονιδίου της AroCIII κατά 16 φορές. Ωστόσο, η ταυτόχρονη έκφραση του FOXA2 εμπόδισε την επαγωγή από τον HNF4α κατά 1,4 φορές. Στα HepG2 το αποτέλεσμα αυτό ήταν πιο έντονο, αφού ο HNF4α ενεργοποίησε τον υποκινητή του AroCIII κατά 3 φορές, αλλά παρουσία του FOXA2, η επαγωγή του υποκινητή μειώθηκε κατά 2,6 φορές (εικόνα 32B). Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στον υποκινητή του γονιδίου της AroAI, όπου ο FOXA2 παρουσία του HNF4α μείωσε την ενεργοποίηση

του υποκινητή κατά 1,7 φορές (εικόνα 32C). Φαίνεται λοιπόν, ότι ο FOXA2 δρα αρνητικά στην επαγωγή των υποκινητών των γονιδίων ΑροCIII και ΑροAI από τον παράγοντα HNF4α.



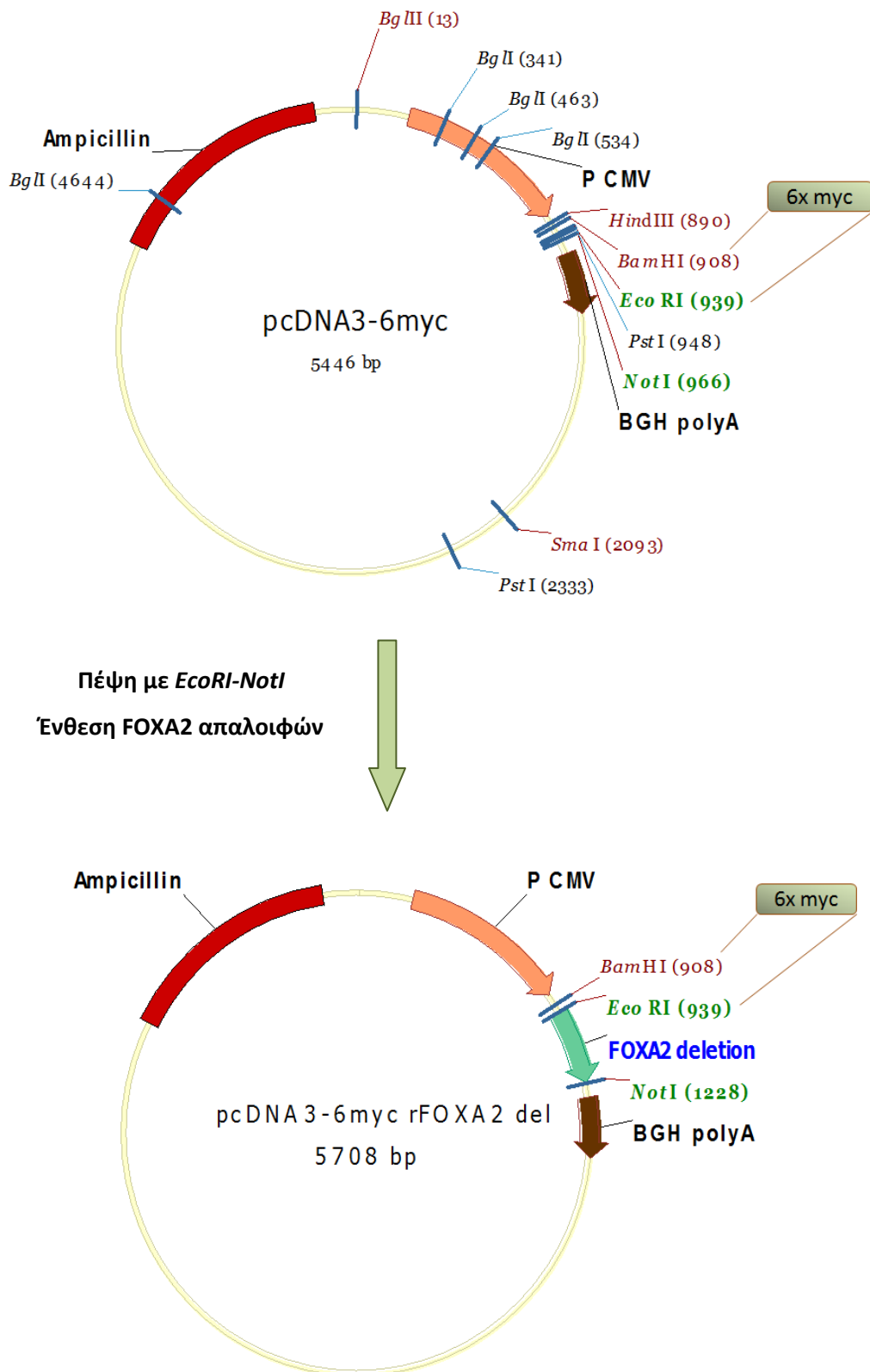
Εικόνα 32. Ο FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή του υποκινητή των γονιδίων των ΑροCIII και ΑροAI από τον παράγοντα HNF4α.

Κύτταρα HEK293T (A) ή HepG2 (B) διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-890/+24)-ΑροCIII-luc (1μg) καθώς και με τους φορείς έκφρασης (1μg) για τους παράγοντες FOXA2 (6mg- FOXA2), HNF4α. (C) Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-1024/-24)-ΑροAI-luc (1μg) καθώς και με τους φορείς έκφρασης (2μg) για τους παράγοντες FOXA2 (6mg- FOXA2), HNF4α. Επίσης, πλασμιδιακός φορέας έκφρασης για τη β-γαλακτοσιδάση (1μg) προστέθηκε κατά τη διαμόλυνση σε όλα τα δείγματα, για την κανονικοποίηση των μετρήσεων λουσιφεράσης. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών από ένα πείραμα (A), δυο πειράματα (B)(C), εις διπλούν. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0,001$

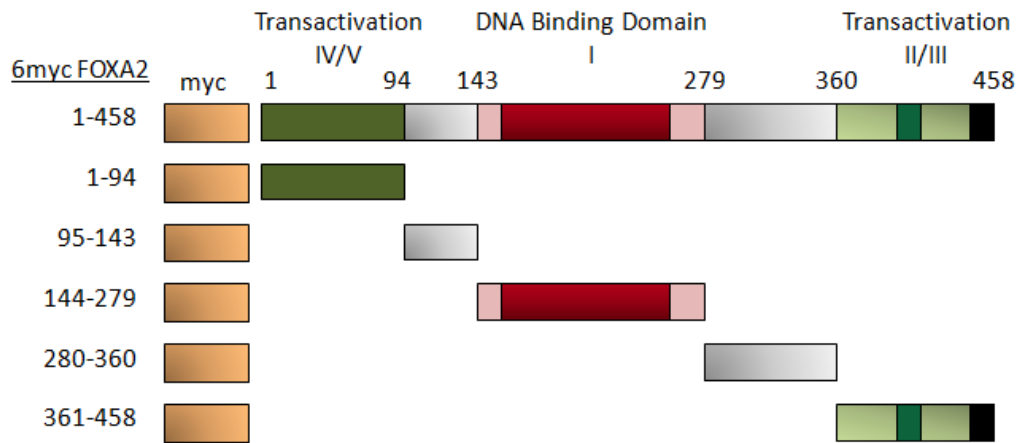
Μεταφορά των απαλοιφών του FOXA2 από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 στον φορέα pcDNA3-6myc

Οι απαλοιφές του FOXA2 που είχαν κλωνοποιηθεί στο φορέα pGEX-4T-1 για τις δοκιμασίες GST pull down, μεταφέρθηκαν στον φορέα pcDNA3 που φέρει τον επίτοπο 6myc. Αυτές οι νέες κατασκευές θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια σε πειράματα αλληλεπιδράσεων *ex vivo* (Co-IP) με τον υποδοχέα LXRα και σε δοκιμασίες μέτρησης της ενεργότητας υποκινητών, ώστε να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα και να προσδιοριστούν καλύτερα οι περιοχές του FOXA2 που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τους πυρηνικούς υποδοχείς.

Έτσι, οι απαλοιφές 1-94, 95-143, 144-279, 280-360, και 361-458 του FOXA2 (εικόνα 26B), απομονώθηκαν από τον φορέα pGEX-4T-1 με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pcDNA3-6myc. Η ένθεση του τμήματος 1-94 στις θέσεις *EcoRI-NotI*, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και *SmaI* (κόβει μέσα στο ένθεμα). Η ένθεση του τμήματος 95-143, επιβεβαιώθηκε με πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και *SmaI-BglI* (η *BglI* κόβει μέσα στο ένθεμα). Η ένθεση του τμήματος 144-279, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και *BglII* (κόβει μέσα στο ένθεμα). Η ένθεση του τμήματος 280-360, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και *BglII-PstI* (η *PstI* κόβει μέσα στο ένθεμα). Η ένθεση του τμήματος 361-458, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-NotI* και *HindIII-PstI* (η *PstI* κόβει μέσα στο ένθεμα) (εικόνα 33,34).



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων pcDNA3-6myc, που φέρουν τις απαλοιφές του FOXA2 (1-94, 95-143, 144-279, 280-360, και 361-458). Στον χάρτη του pcDNA3-6myc, σημειώνονται οι θέσεις κλωνοποίησης (*EcoRI-NotI*) και οι θέσεις περιορισμού με τις οποίες έγινε η επιβεβαίωση της κλωνοποίησης (βλ. αναλυτικά στο κείμενο).



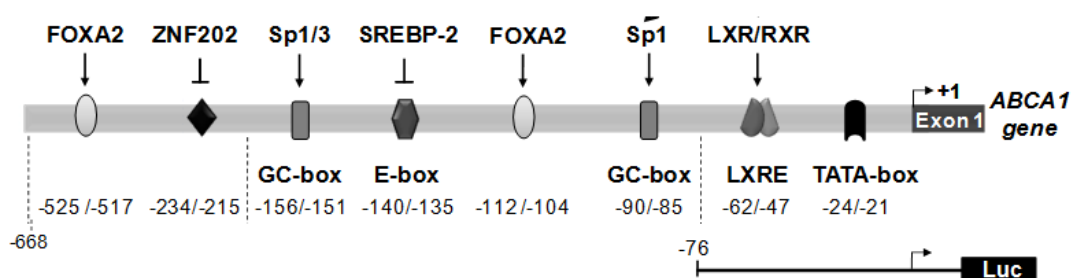
Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση του παράγοντα FOXA2 και των απαλοιφών του σε σύντηξη με τον επίτοπο *δmyc*.

ΜΕΡΟΣ Β

Επαγωγή του γονιδίου του ABCA1 από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα και LXRβ/RXRα

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, οι δύο LXR ισομορφές, LXRα και LXRβ είναι ~78% ομόλογες στην αμινοξική αλληλουχία των περιοχών DBD και LBD και αποκρίνονται στους ίδιους συνδέτες. Παρόλα αυτά, η κατανομή τους στους ιστούς και τα γονίδια που ρυθμίζουν, διαφέρουν σημαντικά.

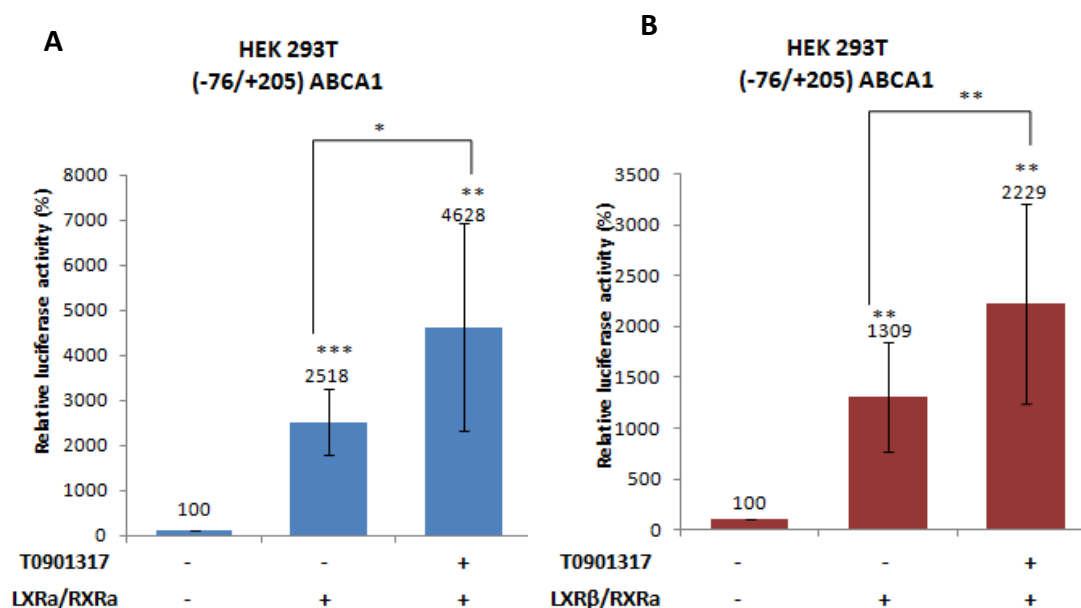
Αρχικά, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν ο υποκινητής του γονιδίου ABCA1 ενεργοποιείται και από τις δύο ισομορφές του LXR (LXRα και LXRβ). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HEK293T, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο (-76/+205) ABCA1, στα οποίο είχε κλωνοποιηθεί η περιοχή -76/+205 του υποκινητή του ABCA1 που φέρει το στοιχείο LXRE μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης (εικόνα 35). Οι υποδοχείς LXRα/RXRα και LXRβ/RXRα ενεργοποιήθηκαν με τη χορήγηση του συνθετικού συνδέτη των LXR, T0901317, για 24 ώρες.



Εικόνα 35. Σχηματική απεικόνιση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή του γονιδίου του ABCA1 και της 5' απαλοιφής του (-76/+205), που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης

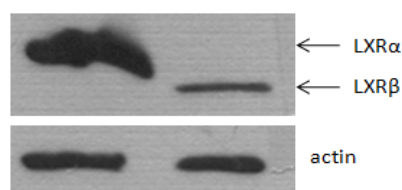
Όπως φαίνεται στην εικόνα 36A, το ετεροδιμερές LXRα/RXRα ενεργοποίησε τον υποκινητή του ABCA1 κατά 25 φορές απουσία του συνδέτη T0901317, ενώ παρουσία του συνδέτη κατά 46 φορές. Αντίστοιχο αποτέλεσμα παρατηρείται και με το ετεροδιμερές LXRβ/RXRα, το οποίο ενεργοποίησε τον υποκινητή του ABCA1 κατά 13 φορές απουσία του συνδέτη T0901317, και 22 φορές παρουσία του συνδέτη (εικόνα 36B). Παρόλα αυτά φαίνεται ότι ο υποκινητής του ABCA1 επάγεται σε μικρότερο βαθμό από τον LXRβ (13 φορές) σε σχέση με τον LXRα (25 φορές). Αυτό μάλλον οφείλεται στα βασικά επίπεδα έκφρασης των δύο πυρηνικών υποδοχέων στα κύτταρα HEK293T. Παρατηρώντας την εικόνα 37, φαίνεται ότι ο LXRα εκφράζεται 2 φορές παραπάνω από τον LXRβ. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι, τόσο

ο LXRα όσο και ο LXRβ, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τον RXRα, μπορούν να επάγουν τον υποκινητή του ABCA1 παρουσία του LXR συνδέτη T0901317.



Εικόνα 36. Ενεργοποίηση του γονιδίου ABCA1 από τους υποδοχείς LXRα/RXRα ή LXRβ/RXRα και τον συνδέτη T0901317

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-76/+205)-ABCA1-luc (1μg) καθώς και με τους φορείς έκφρασης (0.5μg) για τους υποδοχείς LXRα (6myc-LXRα), LXRβ (Flag-LXRβ), RXRα (6myc-RXRα), παρουσία ή απουσία του συνδέτη του LXR, T0901317 (10^{-6}) για 24 ώρες. Επίσης, ένας πλασμιδιακός φορέας έκφρασης για τη β-γαλακτοσιδάση (1μg) προστέθηκε κατά τη διαμόλυνση σε όλα τα δείγματα, για την κανονικοποίηση των μετρήσεων λουσιφεράσης. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών από τρία πειράματα, εις διπλούν. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0,001$



WB: HEK 293T cells

Εικόνα 37. Βασικά επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων LXRα και LXRβ.


Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του LXRα (6myc-LXRα) ή LXRβ (Flag-LXRβ) (0,5μg ο καθένας). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του LXRα και LXRβ έγινε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον LXR (anti- LXR rabbit). Τα επίπεδα της ακτίνης ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα anti-actin, για κανονικοποίηση της ποσότητας των δειγμάτων.

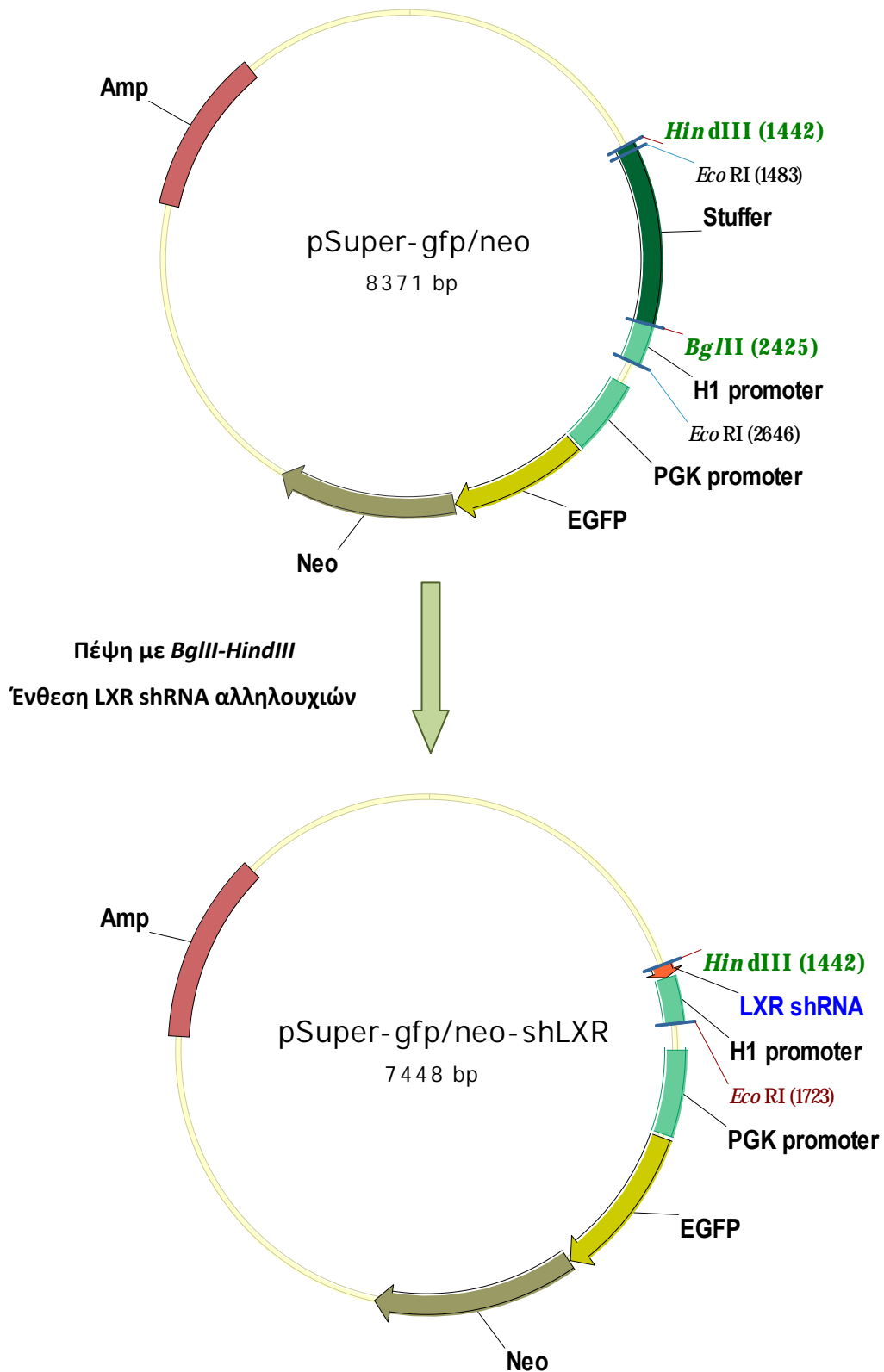
Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων που παράγουν shRNA για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα , LXRβ και έλεγχος έκφρασης τους στα κύτταρα

Απώτερος σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιορίσουμε –χαρακτηρίσουμε ειδικά γονίδια-στόχους που επάγονται από τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα και LXRβ, εφόσον και οι δύο προσδέουν τον συνδέτη T0901317. Για το σκοπό αυτό, θελήσαμε να κατασκευάσουμε πλασμιδιακούς φορείς που να εκφράζουν shRNA ειδικά για τους δύο LXR υποδοχείς του ανθρώπου. Αυτοί οι φορείς, αφού χρησιμοποιηθούν σε κύτταρα HepG2, θα παράγουν τα shRNA για τον LXRα ή/και LXRβ και έτσι θα κατασταλεί η έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε ποια γονίδια ενεργοποιούνται και ποια καταστέλλονται από τον κάθε ένα πυρηνικό υποδοχέα ξεχωριστά.

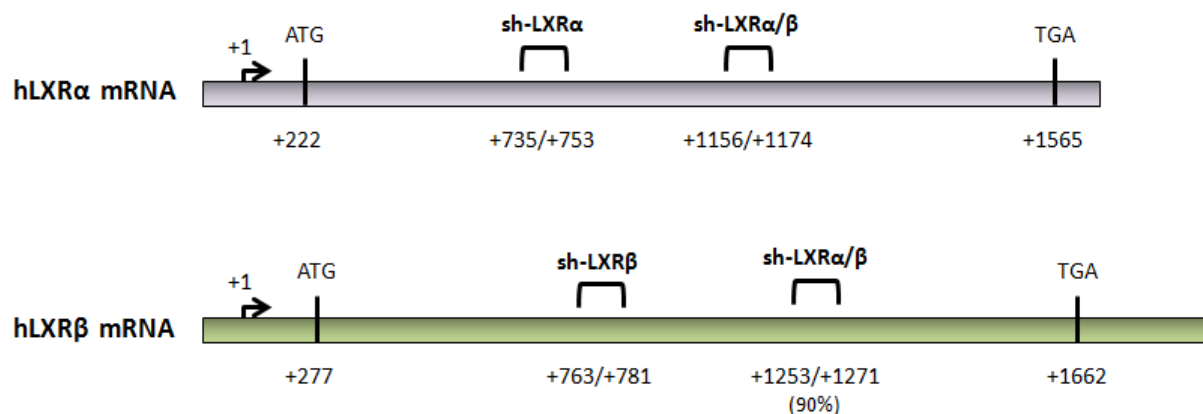
Για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων που θα παράγουν shRNA για τους υποδοχείς LXRα και LXRβ, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pSuper-gfp/neo, ο οποίος κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *BglIII-HindIII*. Με το εργαλείο *MWG Operon siRNA design*, σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν την αλληλουχία έκφρασης siRNA για τους υποδοχείς LXRα και LXRβ του ανθρώπου, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Έπειτα, τα δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν τα προεξέχοντα άκρα των ενζύμων *BglIII-HindIII*, κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pSuper-gfp/neo. Η ένθεση των αλληλουχιών shRNA στις θέσεις *BglIII-HindIII*, επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *BglIII* (η θέση καταστρέφεται μετά την ένθεση) και με *EcoRI-HindIII* (εικόνα 38). Στην εικόνα 39 φαίνονται τα mRNA των πυρηνικών υποδοχέων LXRα , LXRβ, και οι περιοχές που αναγνωρίζουν τα shRNA που σχεδιάστηκαν.

Πίνακας 4. Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν την αλληλουχία για τα shRNAs. Οι αλληλουχίες si-RNA που στοχεύουν τους υποδοχείς LXRα, LXRb φαίνονται με έντονα γράμματα και υπογραμμίζονται με βέλος, ενώ οι θέσεις κλωνοποίησης (*BglIII-HindIII*) παρουσιάζονται με μικρά γράμματα.

Όνομα	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων
shRNA LXRa sense	5'- gatccCCGAACAGATCCGCCTGAAGATTCAAGAGATCTTCAGGCGGATCTGTTCTTTTA-3' 
shRNA LXRa antisense	5'- agcttAAAAAGAACAGATCCGCCTGAAGATCTCTTGAATCTTCAGGCGGATCTGTTCCGGG-3'
shRNA LXRb sense	5'- gatccCCGAACAGATCCGGAAGAAGATTCAAGAGATCTTCTTCCGGATCTGTTCTTTTA-3' 
shRNA LXRb antisense	5'- agcttAAAAAGAACAGATCCGGAAGAAGATCTCTTGAATCTTCTTCCGGATCTGTTCCGGG-3'
shRNA LXRa/b sense	5'- gatccCCGTATCACCTTCTCAAGGATTCAAGAGATCCTTGAGGAAGGTGATACTTTTA-3' 
shRNA LXRa/b antisense	5'- agcttAAAAAGTATCACCTTCTCAAGGATCTCTTGAATCCTTGAGGAAGGTGATACGGG-3'



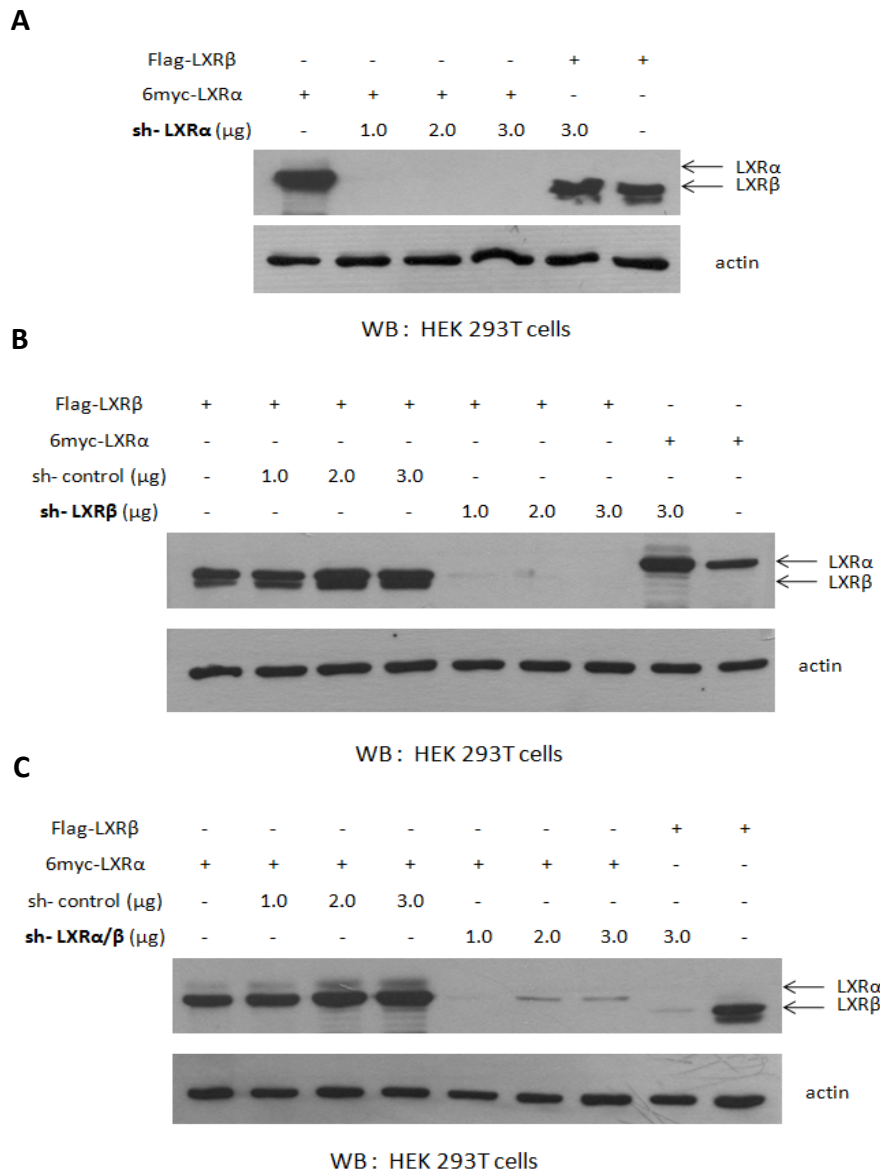
Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων pSuper-gfp/neo, που φέρουν τις αλληλουχίες shRNAs για τα LXRα, LXRβ και LXRα/β. Στους χάρτες, σημειώνονται οι θέσεις κλωνοποίησης (*BglIII-HindIII*) και οι θέσεις περιορισμού με τις οποίες έγινε η επιβεβαίωση της κλωνοποίησης (*EcoRI-HindIII*). (η θέση *BglIII* καταστρέφεται μετά την κλωνοποίηση των ενθεμάτων).



Εικόνα 39. Σχηματική απεικόνιση των mRNAs των LXRα και LXRβ και των περιοχών που αναγνωρίζουν τα shRNAs. Με βέλος παρουσιάζεται η θέση έναρξης της μεταγραφής. (ATG- κωδικόνιο έναρξης, TGA- κωδικόνιο λήξης)

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα των shRNAs στο να καταστέλλουν την έκφραση των υποδοχέων LXRα και LXRβ κατά ειδικό τρόπο. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις κυττάρων HEK293T με αυξανόμενες ποσότητες από τους πλασμιδιακούς φορείς που παράγουν τα sh-LXRs (sh-LXRα, sh-LXRβ, sh-LXRα/β) ή το sh-control, καθώς και φορείς για τους LXRα και LXRβ. Όπως φαίνεται στην εικόνα 40A, το sh-LXRα αποσιώπησε ειδικά τον υποδοχέα LXRα, ακόμα και με ποσότητα 1μg, καθώς δεν επηρεάστηκε καθόλου η έκφραση του LXRβ. Το ίδιο συνέβη και με το sh-LXRβ, το οποίο κατέστειλε την έκφραση του LXRβ, ενώ δεν επηρέασε την έκφραση του LXRα (εικόνα 40B).

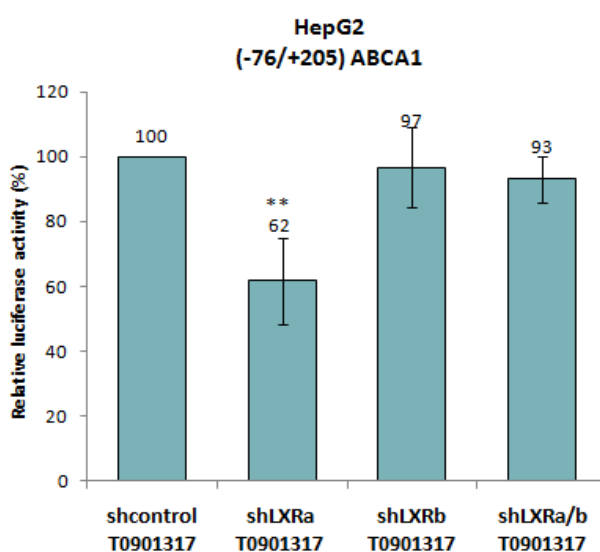
Στην αρχική μας προσπάθεια σχεδιασμού και κατασκευής ενός πλασμιδιακού φορέα που θα φέρει την αλληλουχία έκφρασης siRNA για τον υποδοχέα LXRα, ανακαλύψαμε ότι αυτό το shRNA, αποσιωπούσε τόσο τον υποδοχέα LXRα (για τον οποίο είχε σχεδιαστεί) όσο και τον LXRβ (εικόνα 40C). Οπότε δημιουργήθηκε και ένας φορέας – shRNA, που καταστέλλει την έκφραση και των δύο LXRs και αναφέρεται σαν sh-LXRα/β.



Εικόνα 40. Αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα LXRα ή/και του LXRβ με τη χρήση shRNA

Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με αυξανόμενες ποσότητες (1,2,3 μg) πλασμιδιακού φορέα που παράγει sh-LXRα (A), sh-LXRβ (B), sh-LXRα/β (C) ή sh-control, παρουσία 1μg φορέα έκφρασης LXRα (6myc-LXRα) ή LXRβ (Flag-LXRβ). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του LXRα και LXRβ έγινε με Western Blot χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον LXR (anti- LXR rabbit). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ακτίνης ανιχνευτήκαν για την κανονικοποίηση των δειγμάτων.

Από τη στιγμή που τα shRNAs, ειδικά για τους LXRα ή/και LXRβ αποσιωπούν την έκφραση των υποδοχέων στα κύτταρα, θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδρασή τους στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από τον συνδέτη του LXR, T0901317. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο (-76/+205) ABCA1, καθώς και τους φορείς έκφρασης των shRNAs, παρουσία του συνδέτη T0901317 για 24 ώρες. Όπως δείχνει η εικόνα 41, το sh-LXRα, κατέστειλε την έκφραση του υποδοχέα LXRα, με αποτέλεσμα να μειωθεί η ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1 κατά 38%. Δεν φαίνεται, όμως, να ισχύει το ίδιο και για τα άλλα δύο shRNAs (sh-LXRα και sh-LXRα/β), τα οποία δεν επηρέασαν την επαγωγή του ABCA1 από τον συνδέτη T0901317.



Εικόνα 41. Η αποσιώπηση του γονιδίου LXRα με shRNA οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου ABCA1.

Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-76/+205)-ABCA1-luc (1μg) καθώς και με τους πλασμιδιακούς φορείς που παράγουν τα shLXRα, shLXRβ, shLXRα/β ή το shRNA control (4μg), παρουσία του συνδέτη του LXR, T0901317 (10^{-6}) για 24 ώρες. Επίσης, ένας πλασμιδιακός φορέας έκφρασης για τη β-γαλακτοσιδάση (1μg) προστέθηκε κατά τη διαμόλυνση σε όλα τα δείγματα, για την κανονικοποίηση των μετρήσεων λουσιφεράσης. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών από δύο πειράματα, εις διπλούν. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR/RXR *in vitro* και *ex vivo* και αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από τους συνδέτες τους

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή αυτής της διατριβής, ο μεταφορέας της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων ABCA1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη βιογένεση της HDL καθώς προάγει την εκροή των λιπιδίων από τα κύτταρα προς τη φτωχή σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνη ApoA-I. Ο ABCA1 αποτελεί τη κύρια πηγή της HDL στο πλάσμα, ενώ μέσω της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (Reverse Cholesterol Transport), εμποδίζει το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα⁶¹.

Η ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή, είναι ο κύριος μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου ABCA1⁸⁶⁻⁸⁸. Η φυσιολογική σημασία αυτού του μηχανισμού είναι ότι ο ABCA1 συμβάλει στην απομάκρυνση της περίσσειας ενδοκυττάριας χοληστερόλης η οποία όταν συσσωρεύεται μετατρέπεται στις υδροξυλιωμένες μορφές της μέσω της δράσης συγκεκριμένων ενζύμων. Αυτές οι υδροξυλιωμένες μορφές της χοληστερόλης (οξυστερόλες) είναι ισχυροί αγωνιστές των LXRs. Οι οξυστερόλες έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην βιογένεση και τον μεταβολισμό της HDL όπως των ABCA1, SR-BI, ABCG1, LCAT, CETP κ.α. Θεωρητικά, οι οξυστερόλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα που αυξάνουν την HDL. Ένα από τα γονίδια-στόχοι των LXR όμως είναι και αυτό του SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) ο οποίος είναι ισχυρός ενεργοποιητής της λιπογένεσης καθώς αυξάνει την έκφραση των γονιδίων της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Ως αποτέλεσμα, η χορήγηση των αγωνιστών των LXR σε πειραματόζωα προκάλεσε τη δημιουργία λιπώδους ήπατος (fatty liver), εύρημα που απέκλεισε την μελλοντική φαρμακευτική χρήση των αγωνιστών αυτών για την θεραπεία της καρδιαγγειακής νόσου.

Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας εργασίας είναι ότι ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών. Ο παράγοντας FOXA2 ανήκει στην οικογένεια FOX πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν τη συντηρημένη δομή *forkhead box*^{194,218}. Οι πρωτεΐνες FOX μπορούν να προσδεθούν στο DNA σε ειδικές αλληλουχίες, μέσω του *forkhead box* και να ρυθμίσουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων, στη ρύθμιση και ομοιοστάση της γλυκόζης στο αίμα και στην απόκριση σε νηστεία²¹⁸.

Πρόσφατα δεδομένα από το εργαστήριο μας, έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 παίζει αρνητικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα. Ο FOXA2 μπορεί να προσδένεται στον υποκινητή του ABCA1 στις θέσεις A, B και στο στοιχείο TATA (εικ.3) και να αναστέλλει τη βασική μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 καθώς και την ενεργοποίηση του ABCA1 από τις

οξυστερόλες μέσω των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα²⁵⁴. Ο αρνητικός ρόλος του FOXA2 στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων επιβεβαιώνεται και από περιορισμένο αριθμό προηγούμενων μελετών. Για παράδειγμα, ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα HNF6 και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν συνεργατικά τη μεταγραφή, ανάλογα με την αλληλουχία στόχο ²⁵¹. Ακόμα, ο FOXA2 αλληλεπιδρά με την Otx2 homeobox πρωτεΐνη, καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων του *Otx2* ²⁵³. Φαίνεται επιπλέον, ο FOXA2 να αλληλεπιδρά με τους συν-καταστολείς Groucho/TLE και να καταστέλλεται η FOXA2-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση γονιδίων στόχων ²⁴⁹.

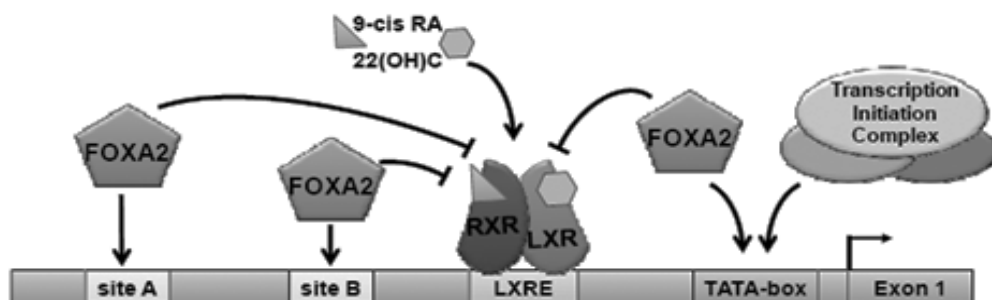
Στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο η κατασταλτική δράση του FOXA2 στην επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή (εικ. 5). Η ταυτόχρονη έκφραση του FOXA2 και των ετεροδιμερών LXRα/RXRα, παρουσία των συνδετών τους, εμπόδισε την έκφραση του ABCA1, σε κύτταρα HEK293T. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω, το μηχανισμό καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου του ABCA1 από τον FOXA2, πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro* (GST pull down) και *ex vivo* (Co-Immunoprecipitations). Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι εάν ο παράγοντας FOXA2 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR/RXR, τότε θα μπορούσε να παρεμποδίζει την μεταγραφική τους δράση με διάφορους μηχανισμούς. Για την επίτευξη των στόχων μας, κλωνοποιήσαμε τον FOXA2 και απαλοιφές του, στον φορέα pGEX-4T-1, ώστε να εκφράζονται σε σύντηξη με τον επίτοπο GST (εικ. 16B). Αυτές οι κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν μαζί με τον υποδοχέα LXRα ή τις απαλοιφές του (εικ. 9) σε δοκιμασίες GST pull down. Από τις αναλύσεις αυτές διαπιστώσαμε, ότι ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα LXRα (αμινοξέα 1-447) τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo* (εικ. 10A και 11). Για αυτή την αλληλεπίδραση, η ελάχιστη περιοχή του LXRα που απαιτείται είναι εκείνη που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 30-163 (η οποία αποτελείται από τα 67 τελευταία αμινοξέα της περιοχής A/B και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA). Όσον αφορά την περιοχή του FOXA2 που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον LXRα, δεν μπορέσαμε να χαρακτηρίσουμε μια συγκεκριμένη περιοχή. Από τα πειράματα GST pull down, φαίνεται ότι ο υποδοχέας LXRα αλληλεπιδρά με όλες σχεδόν τις απαλοιφές του FOXA2 (εκτός από την περιοχή 95-143) (εικ. 14, 18). Αυτό το αξιοπερίεργο εύρημα θα μπορούσε να εξηγηθεί με διάφορους εναλλακτικούς τρόπους: α) οι διάφορες περιοχές του παράγοντα FOXA2 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα GST pull down παρουσιάζουν ομοιότητα μεταξύ τους ως προς κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο το οποίο αναγνωρίζεται από τον FOXA2, β) Η κάθε περιοχή του FOXA2 αλληλεπιδρά με διαφορετική περιοχή του LXRα και γ) η αλληλεπίδραση μεταξύ των FOXA2 και LXRα δεν είναι άμεση αλλά διαμεσολαβείται από άλλες πρωτεΐνες που παίζουν τον ρόλο των «γεφυρών». Μελλοντικά, προκειμένου να αποκλείσουμε την τρίτη εκδοχή και για να προσδιορίσουμε την ακριβή περιοχή αλληλεπίδρασης του FOXA2 με τον

LXRα, θα μπορούσαμε να εκφράσουμε τον υποδοχέα LXRα κάτω από εντελών *in vitro* συνθήκες, να απομονώσουμε την καθαρή πρωτεΐνη, και έπειτα να γίνουν δοκιμασίες αλληλεπίδρασης GST pull down με τα διαφορετικά τμήματα του FOXA2. Ακόμα, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, οι απαλοιφές του FOXA2 μεταφέρθηκαν από τον φορέα pGEX-4T-1, στον φορέα pcDNA3 που φέρει τον επίτοπο 6myc. Αυτές οι νέες κατασκευές θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια σε πειράματα αλληλεπιδράσεων *ex vivo* (Co-immunoprecipitations) με τον υποδοχέα LXRα, ώστε να προσδιοριστούν οι περιοχές του FOXA2 που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τους πυρηνικούς υποδοχείς.

Ο ακριβής μηχανισμός καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον παράγοντα FOXA2, δεν είναι ξεκάθαρος. Μπορούν να προκύψουν, όμως, διαφορές υποθέσεις. Ο FOXA2 προσδέεται στον υποκινητή του ABCA1, στις θέσεις A, B και στο στοιχείο TATA. Θα μπορούσε έτσι να εμποδίζει την πρόσδεση των ετεροδιμερών LXRα/RXRα στο LXRE στοιχείο και να αναστέλλεται η επαγωγή του γονιδίου του ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες και ρετινοειδή. Έχει αποδειχτεί βέβαια, ότι η πρόσδεση του ετεροδιμερούς LXRα/RXRα στο LXRE στοιχείο δεν επηρεάζεται από τον FOXA2 και αντίστροφα (εικ. 6B), με αποτέλεσμα να προσδέονται ταυτόχρονα στην περιοχή -71/+205 του υποκινητή του ABCA1, οι LXRα/RXRα και ο FOXA2 άρα αυτή η εκδοχή αποκλείεται.

Όπως, αναφέρθηκε και παραπάνω, οι συν-καταστολείς της μεταγραφής Groucho/TLE αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα FOXA2 και αναστέλλουν την ικανότητα του να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων²⁴⁹. Επομένως, αυτή θα μπορούσε να είναι μια άλλη υπόθεση για τον κατασταλτικό μηχανισμό του FOXA2. Δηλαδή, ο παράγοντας FOXA2 θα μπορούσε να προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1, να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες-συνκαταστολείς όπως απακετυλάσες ιστονών ή πρωτεΐνες αναδόμησης νουκλεοσωμάτων και να οδηγεί στη συμπύκνωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η μεταγραφή του γονιδίου του ABCA1. Όμως, για να αποδειχθεί ότι ισχύει αυτή η υπόθεση, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, όμως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο παράγοντας FOXA2, αφού προσδεθεί στο στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, παρεμποδίζει την συναρμολόγηση της μεταγραφικής μηχανής και την αλληλεπίδρασή της με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/ RXRα. Το αποτέλεσμα είναι να μην μπορεί να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου του ABCA1. Αντίθετα, απουσία του FOXA2, και παρουσία των συνδετών των LXRα/ RXRα, οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες προσδέονται στο TATA –box του υποκινητή του ABCA1, αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς υποδοχείς και επάγεται η μεταγραφή του γονιδίου (εικόνα 42).



Εικόνα 42. Πιθανός μηχανισμός για την κατασταλτική δράση του FOXA2 στη μεταγραφή του γονιδίου του ABCA1 από τους υποδοχείς LXRα/ RXRα.

Επιπλέον, διαπιστώσαμε με πειράματα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro* (GST pull down) και *ex vivo* (Co-IP), ότι ο LXRα αλληλεπιδρά με έναν άλλο forkhead μεταγραφικό παράγοντα, τον FOXO1 (εικ. 20), ο οποίος εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόκριση στο οξειδωτικό στρες και ο μεταβολισμός. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με μια μελέτη που υποστηρίζει ότι ο FOXO1 καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου SREBP-1c από τους LXR/RXR, χωρίς όμως να αλληλεπιδρά ο FOXO1 με τους υποδοχείς²⁶⁸. Αντιθέτως, άλλες μελέτες, αναφέρουν ότι ο FOXO1 αλληλεπιδρά με πυρηνικούς υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας των ανδρογόνων (AR)^{262,263}, ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER)²⁶⁴, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR), ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (RAR)²⁶⁵, ο υποδοχέας PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor γ)²⁶⁹ και μπορούν είτε να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν τη δράση τους. Ίσως, υπάρχει παρόμοιος μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων, από τους δύο αυτούς forkhead παράγοντες, FOXO1 και FOXA2. Για να διαπιστώσουμε αν ισχύει αυτό, θα μπορούσαμε να εξετάσουμε τυχόν εμπλοκή του FOXO1, στο μονοπάτι ενεργοποίησης του γονιδίου του ABCA1 από τους υποδοχείς LXR/ RXR.

Ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά *in vitro* με πυρηνικούς υποδοχείς και αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-στόχων τους

Για να ελέγξουμε αν ο FOXA2 αλληλεπιδρά και με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, εκτός από τον LXRα, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών *in vitro* (GST pull down), χρησιμοποιώντας διάφορους υποδοχείς που σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον RXRα, καθώς και τον HNF4α. Διαπιστώσαμε, ότι ο παράγοντας FOXA2 αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με τους υποδοχείς RARα, HNF4α και LXRβ, και πιο ασθενώς με τους υποδοχείς FXR, TRβ1 και RXRα (εικ. 21). Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι ο FOXA2 και άλλα μέλη της οικογένειας forkhead αλληλεπιδρούν φυσικά με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών. Οι

FOXA2 και FOXA1 προσδέονται στον και ρυθμίζουν του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen receptor-AR). Ο FOXA1 αλληλεπιδρά με τον AR, και ρυθμίζει την έκφραση ειδικών γονιδίων του προστάτη²³⁰, ενώ ο FOXA2 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων της επιδιδυμίδας, αλληλεπιδρώντας με τον AR²⁴⁷. Ακόμα ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα PXR (Pregnane X Receptor), ο οποίος καταστέλλει τη μεσολαβούμενη από τον FOXA2 μεταγραφή των γονιδίων κετογένεσης και β-οξειδωσης, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται ο μεταβολισμός ενέργειας στο ήπαρ και να αυξάνεται η σύνθεση τριγλυκεριδίων (λιπογένεση) σε συνθήκες πείνας²⁵⁰.

Με πειράματα μέτρησης ενεργότητας υποκινητών, εξετάσαμε αν η αλληλεπίδραση του FOXA2 με τους πυρηνικούς υποδοχείς, έχει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων-στόχων των υποδοχέων. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι ο FOXA2 δρα αρνητικά στην επαγωγή των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών ApoCIII και ApoA1 από τον παράγοντα HNF4α (εικ. 22). Ο παράγοντας HNF4α ενεργοποιεί τον υποκινητή του ApoCIII αλλά η ταυτόχρονη έκφραση του FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή του ApoCIII. Θα μπορούσαμε, λοιπόν, να υποθέσουμε ότι ο FOXA2 αλληλεπιδρά με τον HNF4α, και καταστέλλει την επαγωγή των γονιδίων των ApoCIII και ApoA1. Κάτι αντίστοιχο θα μπορούσε να συμβαίνει και με τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς που ελέχθησαν παραπάνω. Για να δούμε αν ισχύει αυτό, θα μπορούσαμε να εξετάσουμε την επαγωγή των υποκινητών άλλων γονιδίων του μεταβολισμού της HDL που ρυθμίζονται θετικά από τους πυρηνικούς υποδοχείς, παρουσία του παράγοντα FOXA2.

Τα ετεροδιμερή πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα και LXRβ/RXRα επάγουν το γονίδιο του ABCA1

Οι πυρηνικοί υποδοχείς LXRs ενεργοποιούνται από τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης των κυττάρων και πιο ειδικά από οξυστερόλες (υδροξυλιωμένα παράγωγα χοληστερόλης). Οι δύο LXR ισομορφές, LXRα και LXRβ είναι ~78% ομόλογες στην αμινοξική αλληλουχία των περιοχών DBD και LBD και αποκρίνονται στους ίδιους συνδέτες. Παρόλα αυτά, η κατανομή τους στους ιστούς και τα γονίδια που ρυθμίζουν διαφέρουν σημαντικά, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Οι υποδοχείς αυτοί προσδέονται σε υποκινητές γονιδίων του μεταβολισμού της HDL και ενεργοποιούν την έκφρασή τους, σε απόκριση σε χοληστερόλη¹²⁶. Ένα από αυτά είναι και ο μεταφορέας χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, ABCA1.

Με πειράματα μέτρησης ενεργότητας υποκινητών, εξετάσαμε την ικανότητα των δύο ισομορφών να ενεργοποιούν τον υποκινητή του ABCA1, παρουσία του συνδέτη τους T0901317. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι τόσο ο LXRα όσο και ο LXRβ, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τον RXRα, μπορούν να επάγουν τον υποκινητή του ABCA1 παρουσία του LXR συνδέτη T0901317 (εικ. 26). Αυτό συμφωνεί με μια μελέτη που δείχνει ότι και οι δύο ισομορφές του LXR, μπορούν να ενεργοποιούν το

γονίδιο του ABC1, παρουσία των συνδετών 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ⁸⁶.

Ανεύρεση νέων γονιδίων στόχων των πυρηνικών υποδοχέων LXRα και LXRβ σε ηπατικά κύτταρα

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανεύρεση νέων γονιδίων-στόχων των πυρηνικών υποδοχέων LXRα και LXRβ. Γνωρίζοντας ότι η ενεργοποίηση του LXRα από τους αγωνιστές του επάγει έντονη βιογένεση λιπαρών οξέων (λόγω της ενεργοποίηση του SREBP-1c) γεγονός που καθιστά ανέφικτη την χρησιμοποίησή τους για φαρμακευτικούς σκοπούς και δεδομένου ότι οι δυο υποδοχείς LXRα και LXRβ είναι πολύ όμοιοι στην αμινοξική τους ακολουθία, υποθέσαμε ότι διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις στους δυο υποδοχείς οφείλονται σε διαφορετικά γονίδια στόχους. Συνεπώς, η επιλεκτική ενεργοποίηση ενός γονιδίου ειδικά από τον LXRβ θα μπορούσε ένα έχει σημαντικές εφαρμογές στην θεραπεία της καρδιαγγειακής νόσου. Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί τέτοια γονίδια.

Για την επίτευξη των στόχων μας, κατασκευάσαμε πλασμιδιακούς φορείς που εκφράζουν shRNA ειδικά για τους δύο LXR υποδοχείς (LXRα και LXRβ) του ανθρώπου, με σκοπό την ειδική αποσιώπηση της έκφρασής τους. Αρχικά, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα των shRNAs σε κύτταρα HEK293T και φάνηκε να πραγματοποιείται αποσιώπηση του LXRα από το sh-LXRα, του LXRβ από το sh-LXRβ και των δύο ισομορφών μαζί από το sh-LXRα/β (εικ. 30). Ακόμα, με πειράματα μέτρησης ενεργότητας υποκινητών, ελέγξαμε την επίδρασή τους στην ενεργοποίηση του υποκινητή του ABCA1 από τον LXR συνδέτη, T0901317. Φαίνεται λοιπόν, ότι το sh-LXRα καταστέλλει την έκφραση του υποδοχέα LXRα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1. Τα sh-LXRα και sh-LXRα/β δεν μειώνουν την ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1.

Για να διαπιστώσουμε την αποτελεσματικότητα αποσιώπησης των LXRs, από τα shRNAs στα ηπατικά κύτταρα HepG2, θα πρέπει να ελέγξουμε τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης των LXRα και LXRβ, παρουσία και απουσία των shRNAs. Έπειτα, θα χορηγήσουμε σε κύτταρα HepG2 τους συνδέτες των υποδοχέων LXRs, παρουσία ή απουσία των shRNAs ειδικών για κάθε υποδοχέα. Θα απομονωθεί το mRNA από τα ηπατικά κύτταρα και θα χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις μικροσυστοιχιών (microarrays), ώστε να προσδιορίσουμε τα νέα γονίδια-στόχους που ενεργοποιούνται από τον κάθε υποδοχέα ξεχωριστά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stary, H.C. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions : An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1177-1178 (2000).
2. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **360**, 7-22 (2002).
3. Sever, P.S. et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* **361**, 1149-1158 (2003).
4. Rader, D.J. & Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* **451**, 904-913 (2008).
5. High Density Lipoproteins and Protection from Coronary Heart Disease. at <http://www.hdlomics.org/hdl_text.pdf>
6. Breslow JL. *Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995:2031–2052.
7. Schlenck, A., Herbeth, B., Siest, G. & Visvikis, S. Characterization and quantification of serum lipoprotein subfractions by capillary isotachopheresis: relationships with lipid, apolipoprotein, and lipoprotein levels. *Journal of Lipid Research* **40**, 2125 -2133 (1999).
8. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138 (2008).
9. Timmins, J.M. et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* **115**, 1333-1342 (2005).
10. Singaraja, R.R. et al. Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation* **114**, 1301-1309 (2006).
11. Eisenberg, S. High density lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research* **25**, 1017 -1058 (1984).
12. Vaisar, T. et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* **117**, 746-756 (2007).
13. Rye, K., Clay, M.A. & Barter, P.J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* **145**, 227-238 (1999).
14. Lipoproteins - Good cholesterol (HDL), Bad cholesterol (LDL). at <<http://www.scientificpsychic.com/health/lipoproteins-LDL-HDL.html>>
15. Castelli, W.P. et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* **55**, 767-772 (1977).
16. Anderson, K.M., Wilson, P.W., Odell, P.M. & Kannel, W.B. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* **83**, 356-362 (1991).
17. Rubins, H.B. et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N*.

- Engl. J. Med* **341**, 410-418 (1999).
18. Frick, M.H. et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med* **317**, 1237-1245 (1987).
 19. Glueck, C.J., Fallat, R.W., Millett, F. & Steiner, P.M. Familial hyperalphalipoproteinemia. *Arch. Intern. Med* **135**, 1025-1028 (1975).
 20. Glueck, C.J., Gartside, P., Fallat, R.W., Sielski, J. & Steiner, P.M. Longevity syndromes: familial hypobeta and familial hyperalpha lipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med* **88**, 941-957 (1976).
 21. Chapman, M.J., Assmann, G., Fruchart, J., Shepherd, J. & Sirtori, C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin* **20**, 1253-1268 (2004).
 22. Gordon, D.J. & Rifkind, B.M. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med* **321**, 1311-1316 (1989).
 23. Assmann, G. & Gotto, A.M. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III8-14 (2004).
 24. Lewis, G.F. & Rader, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res* **96**, 1221-1232 (2005).
 25. Curtiss, L.K., Valenta, D.T., Hime, N.J. & Rye, K. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **26**, 12-19 (2006).
 26. Meyers, C.D. & Kashyap, M.L. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. *Curr. Opin. Cardiol* **19**, 366-373 (2004).
 27. Pi-Sunyer, F.X., Aronne, L.J., Heshmati, H.M., Devin, J. & Rosenstock, J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* **295**, 761-775 (2006).
 28. Shah, P.K., Kaul, S., Nilsson, J. & Cercek, B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation* **104**, 2498-2502 (2001).
 29. Navab, M. et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J. Lipid Res* **41**, 1481-1494 (2000).
 30. Navab, M. et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **21**, 481-488 (2001).
 31. Navab, M. et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J. Lipid Res* **42**, 1308-1317 (2001).
 32. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J.H. & Shaul, P.W. Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circ Res* **98**, 1352-1364 (2006).
 33. Assanasen, C. et al. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J. Clin. Invest* **115**, 969-977 (2005).
 34. Cohen, R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* **38**, 105-128 (1995).
 35. Kontush, A. & Chapman, M.J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and

- atherosclerosis. *Pharmacol. Rev* **58**, 342-374 (2006).
36. Barter, P.J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res* **95**, 764-772 (2004).
 37. Nofer, J. et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **115**, 501-508 (2007).
 38. Gomaschi, M. et al. High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim. Biophys. Acta* **1736**, 136-143 (2005).
 39. Vane, J.R. & Botting, R.M. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am. J. Cardiol* **75**, 3A-10A (1995).
 40. Asztalos, B.F. et al. Comparing the effects of five different statins on the HDL subpopulation profiles of coronary heart disease patients. *Atherosclerosis* **164**, 361-369 (2002).
 41. Jones, P.H. et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am. J. Cardiol* **92**, 152-160 (2003).
 42. Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. & James, R.W. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 2083-2089 (2003).
 43. Klerkx, A.H.E.M. et al. Cholesteryl ester transfer protein concentration is associated with progression of atherosclerosis and response to pravastatin in men with coronary artery disease (REGRESS). *Eur. J. Clin. Invest* **34**, 21-28 (2004).
 44. Martin, G. et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J. Clin. Invest* **107**, 1423-1432 (2001).
 45. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *JAMA* **231**, 360-381 (1975).
 46. Blankenhorn, D.H. et al. Effects of colestipol-niacin therapy on human femoral atherosclerosis. *Circulation* **83**, 438-447 (1991).
 47. Blankenhorn, D.H. et al. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound. *Circulation* **88**, 20-28 (1993).
 48. Brown, G. et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N. Engl. J. Med* **323**, 1289-1298 (1990).
 49. Brown, B.G. et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N. Engl. J. Med* **345**, 1583-1592 (2001).
 50. Canner, P.L. et al. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J. Am. Coll. Cardiol* **8**, 1245-1255 (1986).
 51. Kockx, M., Princen, H.M. & Kooistra, T. Fibrate-modulated expression of fibrinogen, plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein A-I in cultured cynomolgus monkey hepatocytes -- role of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Thromb. Haemost* **80**, 942-948 (1998).
 52. Neele, D.M., Kaptein, A., Huisman, H., de Wit, E.C. & Princen, H.M. No effect of fibrates on synthesis of apolipoprotein(a) in primary cultures of cynomolgus monkey and human hepatocytes: apolipoprotein A-I synthesis increased. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **244**, 374-378 (1998).
 53. Mardones, P. et al. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J. Biol. Chem* **278**, 7884-7890 (2003).

54. Linsel-Nitschke, P. & Tall, A.R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 193-205 (2005).
55. Singh, I.M., Shishehbor, M.H. & Ansell, B.J. High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **298**, 786 -798 (2007).
56. Santamarina-Fojo, S. et al. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 7987-7992 (2000).
57. De Geest, B., Zhao, Z., Collen, D. & Holvoet, P. Effects of Adenovirus-Mediated Human Apo A-I Gene Transfer on Neointima Formation After Endothelial Denudation in Apo E^{-/-} Deficient Mice. *Circulation* **96**, 4349-4356 (1997).
58. Krieger, M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem* **68**, 523-558 (1999).
59. Fitzgerald, M.L. et al. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J. Biol. Chem* **276**, 15137-15145 (2001).
60. Bungert, S., Molday, L.L. & Molday, R.S. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J. Biol. Chem* **276**, 23539-23546 (2001).
61. Oram, J.F. HDL Apolipoproteins and ABCA1: Partners in the Removal of Excess Cellular Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 720-727 (2003).
62. Wang, N., Silver, D.L., Costet, P. & Tall, A.R. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem* **275**, 33053-33058 (2000).
63. Oram, J.F. & Lawn, R.M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* **42**, 1173-1179 (2001).
64. Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B. & Brewer, H.B. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res* **42**, 1339-1345 (2001).
65. Takahashi, Y. & Smith, J.D. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 11358-11363 (1999).
66. Chang, G. & Roth, C.B. Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**, 1793-1800 (2001).
67. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M.L., Freeman, M.W. & Zannis, V.I. Cross-Linking and Lipid Efflux Properties of ApoA-I Mutants Suggest Direct Association between ApoA-I Helices and ABCA1†. *Biochemistry* **43**, 2126-2139 (2004).
68. Vedhachalam, C. et al. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J. Biol. Chem* **279**, 49931-49939 (2004).
69. Brooks-Wilson, A. et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet* **22**, 336-345 (1999).
70. Bodzioch, M. et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet* **22**, 347-351 (1999).
71. Lawn, R.M. et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest* **104**, R25-31

- (1999).
72. Rust, S. et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet* **22**, 352-355 (1999).
 73. Remaley, A.T. et al. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 12685-12690 (1999).
 74. Oram, J.F. & Vaughan, A.M. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol* **11**, 253-260 (2000).
 75. Brousseau, M.E. et al. Novel mutations in the gene encoding ATP-binding cassette 1 in four Tangier disease kindreds. *Journal of Lipid Research* **41**, 433 - 441 (2000).
 76. Francis, G.A., Knopp, R.H. & Oram, J.F. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J. Clin. Invest* **96**, 78-87 (1995).
 77. Remaley, A.T. et al. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **17**, 1813-1821 (1997).
 78. McNeish, J. et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 4245-4250 (2000).
 79. Orsó, E. et al. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat. Genet* **24**, 192-196 (2000).
 80. Christiansen-Weber, T.A. et al. Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. *Am. J. Pathol* **157**, 1017-1029 (2000).
 81. Singaraja, R.R. et al. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J. Clin. Invest* **110**, 35-42 (2002).
 82. Vaisman, B.L. et al. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J. Clin. Invest* **108**, 303-309 (2001).
 83. Haghpassand, M., Bourassa, P.A., Francone, O.L. & Aiello, R.J. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J. Clin. Invest* **108**, 1315-1320 (2001).
 84. Aiello, R.J., Brees, D. & Francone, O.L. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 972-980 (2003).
 85. Lawn, R.M., Wade, D.P., Couse, T.L. & Wilcox, J.N. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **21**, 378-385 (2001).
 86. Langmann, T. et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **257**, 29-33 (1999).
 87. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A.R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem* **275**, 28240-28245 (2000).
 88. Schwartz, K., Lawn, R.M. & Wade, D.P. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **274**, 794-802 (2000).

89. Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol* **10**, 557-563 (1999).
90. Laffitte, B.A. et al. Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol* **21**, 7558-7568 (2001).
91. Whitney, K.D. et al. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages. *J. Biol. Chem* **276**, 43509-43515 (2001).
92. Janowski, B.A. et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 266-271 (1999).
93. Fu, X. et al. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem* **276**, 38378-38387 (2001).
94. Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M. & Genest, J. cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J. Lipid Res* **43**, 2087-2094 (2002).
95. Haidar, B., Denis, M., Marcil, M., Krimbou, L. & Genest, J. Apolipoprotein A-I activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem* **279**, 9963-9969 (2004).
96. Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R. & Wade, D.P. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem* **275**, 34508-34511 (2000).
97. Tang, C., Vaughan, A.M. & Oram, J.F. Janus kinase 2 modulates the apolipoprotein interactions with ABCA1 required for removing cellular cholesterol. *J. Biol. Chem* **279**, 7622-7628 (2004).
98. Roosbeek, S. et al. Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter. *J. Biol. Chem* **279**, 37779-37788 (2004).
99. Chinetti, G. et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med* **7**, 53-58 (2001).
100. Chawla, A. et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* **7**, 161-171 (2001).
101. Rubic, T. & Lorenz, R.L. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc. Res* **69**, 527-535 (2006).
102. Han, X., Kitamoto, S., Lian, Q. & Boisvert, W.A. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J. Biol. Chem* **284**, 32950-32958 (2009).
103. Argmann, C.A. et al. Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **21**, 2011-2018 (2001).
104. Panousis, C.G., Evans, G. & Zuckerman, S.H. TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma. *J. Lipid Res* **42**, 856-863 (2001).
105. Alfaro Leon, M.L., Evans, G.F., Farnen, M.W. & Zuckerman, S.H. Post-transcriptional regulation of macrophage ABCA1, an early response gene to IFN-gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **333**, 596-602 (2005).
106. Hao, X. et al. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRalpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis* **203**, 417-428 (2009).
107. Chen, M., Li, W., Wang, N., Zhu, Y. & Wang, X. ROS and NF-kappaB but not

- LXR mediate IL-1 β signaling for the downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **292**, C1493-1501 (2007).
108. Panousis, C.G. & Zuckerman, S.H. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **20**, 1565-1571 (2000).
 109. Schmitz, G. & Langmann, T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1735**, 1-19 (2005).
 110. Porsch-Özcürümez, M. et al. The Zinc Finger Protein 202 (ZNF202) Is a Transcriptional Repressor of ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 Gene Expression and a Modulator of Cellular Lipid Efflux. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12427 -12433 (2001).
 111. Yang, X. et al. The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene. *J. Lipid Res* **43**, 297-306 (2002).
 112. Langmann, T. et al. Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. *J. Biol. Chem* **277**, 14443-14450 (2002).
 113. Wang, Y. & Oram, J.F. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem* **277**, 5692-5697 (2002).
 114. Feng, B. & Tabas, I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J. Biol. Chem* **277**, 43271-43280 (2002).
 115. Arakawa, R. & Yokoyama, S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J. Biol. Chem* **277**, 22426-22429 (2002).
 116. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895 (1988).
 117. Mangelsdorf, D.J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995).
 118. Peet, D.J., Janowski, B.A. & Mangelsdorf, D.J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev* **8**, 571-575 (1998).
 119. Beato, M., Herrlich, P. & Schütz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857 (1995).
 120. Kastner, P., Mark, M. & Chambon, P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859-869 (1995).
 121. Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850 (1995).
 122. Giguère, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev* **20**, 689-725 (1999).
 123. Willson, T.M., Jones, S.A., Moore, J.T. & Kliewer, S.A. Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism. *Med Res Rev* **21**, 513-522 (2001).
 124. General Information (Brief Review) | NRResource.org. at <http://nrresource.org/general_information/general_information.html>
 125. Beato, M. Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J* **5**, 2044-2051 (1991).
 126. Kardassis, D., Drosatos, C. & Zannis, V. Regulation of Genes Involved in the

- Biogenesis and the Remodeling of HDL†. *High-Density Lipoproteins: From Basic Biology to Clinical Aspects* 237-265 (2007).at
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527625178.ch10/summary>>
127. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**, 121-141 (2000).
 128. Rosenfeld, M.G. & Glass, C.K. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem* **276**, 36865-36868 (2001).
 129. Wade, P.A. & Wolffe, A.P. Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr. Biol* **9**, R221-224 (1999).
 130. Ulven, S.M., Dalen, K.T., Gustafsson, J. & Nebb, H.I. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 59-63 (2005).
 131. Apfel, R. et al. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol* **14**, 7025-7035 (1994).
 132. Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A. & Liao, S. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 10809-10813 (1994).
 133. Willy, P.J. et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* **9**, 1033-1045 (1995).
 134. Willy, P.J. & Mangelsdorf, D.J. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* **11**, 289-298 (1997).
 135. Rastinejad, F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol* **11**, 33-38 (2001).
 136. Hörlein, A.J. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404 (1995).
 137. Chen, J.D. & Evans, R.M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457 (1995).
 138. Wagner, B.L. et al. Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol* **23**, 5780-5789 (2003).
 139. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C. & Lala, D.S. Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol* **17**, 1019-1026 (2003).
 140. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Beltowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **61**, 736-759 (2007).
 141. Huuskonen, J., Fielding, P.E. & Fielding, C.J. Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **24**, 703-708 (2004).
 142. Song, C. & Liao, S. Cholestenoic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology* **141**, 4180-4184 (2000).
 143. Unno, A. et al. TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **327**, 933-938 (2005).
 144. Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F. & Patsch, W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem. J* **371**, 89-96 (2003).
 145. Repa, J.J. et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**, 1524-1529 (2000).
 146. Geyeregger, R., Zeyda, M. & Stulnig, T.M. Liver X receptors in cardiovascular

- and metabolic disease. *Cell. Mol. Life Sci* **63**, 524-539 (2006).
147. Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R. & Mangelsdorf, D.J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728-731 (1996).
 148. Lehmann, J.M. et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem* **272**, 3137-3140 (1997).
 149. Chang, Y.H., Abdalla, D.S. & Sevanian, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med* **23**, 202-214 (1997).
 150. Song, C., Hiipakka, R.A. & Liao, S. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* **65**, 423-427 (2000).
 151. Mitro, N. et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* **445**, 219-223 (2007).
 152. Collins, J.L. et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J. Med. Chem* **45**, 1963-1966 (2002).
 153. Houck, K.A. et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab* **83**, 184-187 (2004).
 154. Forman, B.M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G.J. & Evans, R.M. The orphan nuclear receptor LXRA is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 10588-10593 (1997).
 155. Gan, X. et al. Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem* **276**, 48702-48708 (2001).
 156. Ou, J. et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 6027-6032 (2001).
 157. Yoshikawa, T. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem* **277**, 1705-1711 (2002).
 158. Song, C., Hiipakka, R.A. & Liao, S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* **66**, 473-479 (2001).
 159. Tamasawa, N., Tamasawa, A. & Takebe, K. Higher levels of plasma cholesterol sulfate in patients with liver cirrhosis and hypercholesterolemia. *Lipids* **28**, 833-836 (1993).
 160. Baranowski, M. Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol* **59 Suppl 7**, 31-55 (2008).
 161. Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L. & von Eckardstein, A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 655-666 (2006).
 162. Sabol, S.L., Brewer, H.B. & Santamarina-Fojo, S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res* **46**, 2151-2167 (2005).
 163. Laffitte, B.A. et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 507-512 (2001).
 164. Venkateswaran, A. et al. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem* **275**, 14700-14707 (2000).

165. Schmitz, G., Langmann, T. & Heimerl, S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J. Lipid Res* **42**, 1513-1520 (2001).
166. Rigamonti, E. et al. Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ. Res* **97**, 682-689 (2005).
167. Curtiss, L.K. & Boisvert, W.A. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol* **11**, 243-251 (2000).
168. Wouters, K., Shiri-Sverdlov, R., van Gorp, P.J., van Bilsen, M. & Hofker, M.H. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin. Chem. Lab. Med* **43**, 470-479 (2005).
169. Cao, G. et al. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem* **277**, 39561-39565 (2002).
170. Laffitte, B.A. et al. The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol* **23**, 2182-2191 (2003).
171. Luo, Y. & Tall, A.R. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest* **105**, 513-520 (2000).
172. Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K. & Mangelsdorf, D.J. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J. Biol. Chem* **276**, 43018-43024 (2001).
173. Menke, J.G. et al. A novel liver X receptor agonist establishes species differences in the regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7a). *Endocrinology* **143**, 2548-2558 (2002).
174. Peet, D.J. et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704 (1998).
175. Chiang, J.Y., Kimmel, R. & Stroup, D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* **262**, 257-265 (2001).
176. Goodwin, B. et al. Differential Regulation of Rat and Human CYP7A1 by the Nuclear Oxysterol Receptor Liver X Receptor- α . *Mol Endocrinol* **17**, 386-394 (2003).
177. Repa, J.J. et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem* **277**, 18793-18800 (2002).
178. Yu, L. et al. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem* **278**, 15565-15570 (2003).
179. Yu, L. et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 16237-16242 (2002).
180. Duval, C. et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **340**, 1259-1263 (2006).
181. Chang, T., Chang, C.C.Y., Ohgami, N. & Yamauchi, Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **22**, 129-157 (2006).
182. Alberti, S. et al. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J. Clin. Invest* **107**, 565-573 (2001).
183. Schultz, J.R. et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* **14**, 2831-2838 (2000).
184. Ishimoto, K. et al. Identification of human low-density lipoprotein receptor as a

- novel target gene regulated by liver X receptor alpha. *FEBS Lett* **580**, 4929-4933 (2006).
185. Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **16**, 459-481 (2000).
 186. Lund, E.G. et al. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem. Pharmacol* **71**, 453-463 (2006).
 187. Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J. & Nebb, H.I. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J. Biol. Chem* **278**, 48283-48291 (2003).
 188. Laffitte, B.A. et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 5419-5424 (2003).
 189. Efanov, A.M., Sewing, S., Bokvist, K. & Gromada, J. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S75-78 (2004).
 190. Gerin, I. et al. LXRBeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J. Biol. Chem* **280**, 23024-23031 (2005).
 191. Steffensen, K.R. et al. Gene expression profiling in adipose tissue indicates different transcriptional mechanisms of liver X receptors [alpha] and [beta], respectively. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**, 589-593 (2003).
 192. Jürgens, G. & Weigel, D. Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo: the role of the homeotic gene fork head. *Roux's Arch Dev Biol* **197**, 345-354 (1988).
 193. Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E. & Jäckle, H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 645-658 (1989).
 194. Costa, R.H., Grayson, D.R. & Darnell, J.E. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* **9**, 1415-1425 (1989).
 195. Herbst, R.S. et al. Differential regulation of hepatocyte-enriched transcription factors explains changes in albumin and transthyretin gene expression among hepatoma cells. *New Biol* **3**, 289-296 (1991).
 196. Lai, E. et al. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* **4**, 1427-1436 (1990).
 197. Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. & Burley, S.K. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**, 412-420 (1993).
 198. Carlsson, P. & Mahlapuu, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol* **250**, 1-23 (2002).
 199. Weigel, D. & Jäckle, H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* **63**, 455-456 (1990).
 200. Qian, X. & Costa, R.H. Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* **23**, 1184-1191 (1995).
 201. Pani, L. et al. Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the *Drosophila* fork head protein. *Mol. Cell. Biol* **12**, 3723-3732 (1992).

202. Friedman, J.R. & Kaestner, K.H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell. Mol. Life Sci* **63**, 2317-2328 (2006).
203. Wederell, E.D. et al. Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res* **36**, 4549-4564 (2008).
204. Kaestner, K.H. et al. Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 7628-7631 (1993).
205. Kaestner, K.H., Hiemisch, H., Luckow, B. & Schütz, G. The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics* **20**, 377-385 (1994).
206. Sasaki, H. & Hogan, B.L. Enhancer analysis of the mouse HNF-3 beta gene: regulatory elements for node/notochord and floor plate are independent and consist of multiple sub-elements. *Genes Cells* **1**, 59-72 (1996).
207. Yasui, K., Sasaki, H., Arakaki, R. & Uemura, M. Distribution pattern of HNF-3beta proteins in developing embryos of two mammalian species, the house shrew and the mouse. *Dev. Growth Differ* **39**, 667-676 (1997).
208. Clevidence, D.E. et al. Identification of nine tissue-specific transcription factors of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead DNA-binding-domain family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 3948-3952 (1993).
209. Monaghan, A.P., Kaestner, K.H., Grau, E. & Schütz, G. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* **119**, 567-578 (1993).
210. Sasaki, H. & Hogan, B.L. Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* **118**, 47-59 (1993).
211. Cirillo, L.A. et al. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279-289 (2002).
212. Holmqvist, P., Belikov, S., Zaret, K.S. & Wrangé, O. FoxA1 binding to the MMTV LTR modulates chromatin structure and transcription. *Exp. Cell Res* **304**, 593-603 (2005).
213. Cirillo, L.A. & Zaret, K.S. An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol. Cell* **4**, 961-969 (1999).
214. Cirillo, L.A. et al. Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J* **17**, 244-254 (1998).
215. Chaya, D., Hayamizu, T., Bustin, M. & Zaret, K.S. Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin. *J. Biol. Chem* **276**, 44385-44389 (2001).
216. Shim, E.Y., Woodcock, C. & Zaret, K.S. Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev* **12**, 5-10 (1998).
217. Zaret, K. Developmental competence of the gut endoderm: genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins. *Dev. Biol* **209**, 1-10 (1999).
218. Lantz, K.A. & Kaestner, K.H. Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clin. Sci* **108**, 195-204 (2005).
219. Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J. & Stoffel, M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* **281**, 692-695 (1998).
220. Harnish, D.C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R. & Karathanasis, S.K. Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between

- hepatocyte nuclear factors 3 and 4. *J. Biol. Chem* **271**, 13621-13628 (1996).
221. Ben-Shushan, E., Marshak, S., Shoshkes, M., Cerasi, E. & Melloul, D. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J. Biol. Chem* **276**, 17533-17540 (2001).
 222. Lee, C.S. et al. Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* **51**, 2546-2551 (2002).
 223. Kaestner, K.H., Knochel, W. & Martinez, D.E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**, 142-146 (2000).
 224. Paulweber, B., Sandhofer, F. & Levy-Wilson, B. The mechanism by which the human apolipoprotein B gene reducer operates involves blocking of transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor 3. *Mol. Cell. Biol* **13**, 1534-1546 (1993).
 225. Sharma, S. et al. Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol. Cell. Biol* **17**, 2598-2604 (1997).
 226. Wolfrum, C. et al. Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation. *J. Clin. Invest* **112**, 345-356 (2003).
 227. Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J.M. & Stoffel, M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* **432**, 1027-1032 (2004).
 228. Wu, K.L. et al. Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol. Cell. Biol* **17**, 6002-6013 (1997).
 229. Zhang, L., Rubins, N.E., Ahima, R.S., Greenbaum, L.E. & Kaestner, K.H. Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *Cell Metab* **2**, 141-148 (2005).
 230. Gao, N. et al. The role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol. Endocrinol* **17**, 1484-1507 (2003).
 231. Carroll, J.S. et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33-43 (2005).
 232. Laganière, J. et al. From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 11651-11656 (2005).
 233. Shen, W., Scearce, L.M., Brestelli, J.E., Sund, N.J. & Kaestner, K.H. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J. Biol. Chem* **276**, 42812-42817 (2001).
 234. Lee, C.S., Sund, N.J., Behr, R., Herrera, P.L. & Kaestner, K.H. Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells. *Dev. Biol* **278**, 484-495 (2005).
 235. Lantz, K.A. et al. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J. Clin. Invest* **114**, 512-520 (2004).
 236. Kaestner, K.H., Hiemisch, H. & Schütz, G. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol. Cell. Biol* **18**, 4245-4251 (1998).
 237. Kaestner, K.H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D.J. & Schütz, G. Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* **13**, 495-504 (1999).
 238. Babenko, A.P., Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. A view of sur/KIR6.X, KATP

- channels. *Annu. Rev. Physiol* **60**, 667-687 (1998).
239. Cook, D.L., Satin, L.S., Ashford, M.L. & Hales, C.N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**, 495-498 (1988).
 240. Miki, T., Nagashima, K. & Seino, S. The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J. Mol. Endocrinol* **22**, 113-123 (1999).
 241. Sund, N.J. et al. Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic beta cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev* **15**, 1706-1715 (2001).
 242. Clayton, P.T. et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J. Clin. Invest* **108**, 457-465 (2001).
 243. Prentki, M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur. J. Endocrinol* **134**, 272-286 (1996).
 244. Samaras, S.E. et al. Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in Pancreatic beta cells: role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6. *Mol. Cell. Biol* **22**, 4702-4713 (2002).
 245. Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E. & Stoffel, M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 11624-11629 (2003).
 246. Motallebipour, M. et al. Differential binding and co-binding pattern of FOXA1 and FOXA3 and their relation to H3K4me3 in HepG2 cells revealed by ChIP-seq. *Genome Biol* **10**, R129 (2009).
 247. Yu, X. et al. Foxa1 and Foxa2 interact with the androgen receptor to regulate prostate and epididymal genes differentially. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1061**, 77-93 (2005).
 248. Yao, J., Lai, E. & Stifani, S. The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription. *Mol. Cell. Biol* **21**, 1962-1972 (2001).
 249. Wang, J.C. et al. Transducin-like enhancer of split proteins, the human homologs of Drosophila groucho, interact with hepatic nuclear factor 3beta. *J. Biol. Chem* **275**, 18418-18423 (2000).
 250. Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M. & Sueyoshi, T. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver. *J. Biol. Chem* **282**, 9768-9776 (2007).
 251. Rausa, F.M., Tan, Y. & Costa, R.H. Association between hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) and FoxA2 DNA binding domains stimulates FoxA2 transcriptional activity but inhibits HNF-6 DNA binding. *Mol. Cell. Biol* **23**, 437-449 (2003).
 252. Foucher, I., Montesinos, M.L., Volovitch, M., Prochiantz, A. & Trembleau, A. Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* **130**, 1867-1876 (2003).
 253. Nakano, T., Murata, T., Matsuo, I. & Aizawa, S. OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **267**, 64-70 (2000).
 254. Θυμιάκου, Ε. Μοριακοί μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου του μεμβρανικού μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 στο ήπαρ, Διδακτορική διατριβή (2009).

255. Greer, E.L. & Brunet, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410-7425 (2005).
256. Zhang, W. et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem* **281**, 10105-10117 (2006).
257. Hall, R.K. et al. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J. Biol. Chem* **275**, 30169-30175 (2000).
258. Nakae, J. et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat. Genet* **32**, 245-253 (2002).
259. Schmoll, D. et al. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem* **275**, 36324-36333 (2000).
260. Vogt, P.K., Jiang, H. & Aoki, M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* **4**, 908-913 (2005).
261. Brunet, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868 (1999).
262. Li, P. et al. AKT-independent protection of prostate cancer cells from apoptosis mediated through complex formation between the androgen receptor and FKHR. *Mol. Cell. Biol* **23**, 104-118 (2003).
263. Tsai, K. et al. Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res* **35**, 6984-6994 (2007).
264. Bakker, W.J. et al. Differential regulation of Foxo3a target genes in erythropoiesis. *Mol. Cell. Biol* **27**, 3839-3854 (2007).
265. Zhao, H.H. et al. Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions. *J. Biol. Chem* **276**, 27907-27912 (2001).
266. Zannis, V.I., Kan, H.Y., Kritis, A., Zanni, E. & Kardassis, D. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front. Biosci* **6**, D456-504 (2001).
267. Zannis, V.I., Kan, H.Y., Kritis, A., Zanni, E.E. & Kardassis, D. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Lipidol* **12**, 181-207 (2001).
268. Kamei, Y. et al. Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor. *Endocrinology* **149**, 2293-2305 (2008).
269. Dowell, P., Otto, T.C., Adi, S. & Lane, M.D. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J. Biol. Chem* **278**, 45485-45491 (2003).