

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ
ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ
ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ABCA1 ΣΤΟ ΗΠΑΡ**

Ευσταθία Θυμιάκου

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Καρδάσης

Μάρτιος 2009

Με την παρούσα διατριβή ολοκληρώνεται μια διαδρομή που ξεκίνησε πριν από περίπου έξι χρόνια, από τότε που ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια ήρθα για πρώτη φορά στο εργαστήριο του Δημήτρη Καρδάση. Χαίρομαι που μέσα από αυτή τη διαδρομή βρήκα ανθρώπους τους οποίους εκτιμώ πραγματικά και των οποίων η στήριξη ήταν πολύτιμη.

Με τον υπεύθυνο αυτής της διατριβής, το Δημήτρη Καρδάση, η συνεργασία ήταν πάντα άψογη. Ο Δημήτρης κατάφερε από την πρώτη στιγμή να μου μεταδώσει τον ενθουσιασμό του για αυτή τη δουλειά και ήταν πολύ σημαντικό για μένα να ξέρω ότι η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα ανοιχτή για οτιδήποτε χρειαζόμουν. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη και την πίστη του σε μένα.

Τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, ο κ. Ζαννής και ο κ. Γραβάνης, παρακολούθησαν την πορεία και την εξέλιξη της δουλειάς μου και τους ευχαριστώ γιατί με τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους βοήθησαν ουσιαστικά στο να αναδειχθούν τα αποτελέσματα και η σημασία τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής, τον κ. Στουρνάρα, τον κ. Μπούμπα, τον κ. Ηλιόπουλο και την κα. Παπακωνσταντή, για την πολύ ωφέλιμη και εποικοδομητική συζήτηση πάνω στα ευρήματα της δουλειάς αλλά και στις επεκτάσεις και τις εφαρμογές της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βέτα, τα παιδιά που είναι τώρα στο εργαστήριο, τη Γιάννα, τη Σόφη, την Ιωάννα και τον Παναγιώτη, αλλά και το Θωμά, τη Βίκυ, το Γιώργο, την Κάλλια, και τη Βαρβάρα που έχουν φύγει, καθώς μοιραστήκαμε χαρές, λύπες, αγωνία, και προβληματισμούς για τα εντός και εκτός του εργαστηρίου θέματα. Δε θα μπορούσα φυσικά να μην ευχαριστήσω την Ελευθερία, με την οποία δημιουργήσαμε μια ξεχωριστή σχέση, μοιραστήκαμε ατέλειωτες ώρες στο εργαστήριο, απίστευτες στιγμές παραλογισμού και κοινές ανησυχίες για τη ζωή μας.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τα παιδιά στο εργαστήριο του κ. Ζαννή στη Βοστώνη, το Γιώργο, τον Κώστα και την Κωστιάννα, για τη βοήθειά τους με την τεχνική γονιδιακής μεταφοράς με αδενοϊούς, αλλά και τα παιδιά των γειτονικών εργαστηρίων, του κ. Στουρνάρα και του κ. Ηλιόπουλου, για τη συνεργασία τους και τη βοήθειά τους σε πειραματικά ζητήματα.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, Κωστούλα, Ρένα, Μαριάνθη, Ανδρέα, Ντίνα, Μανώλη, οι οποίοι είναι δίπλα μου εδώ και πάνω από δέκα χρόνια και χάρη σε αυτούς το Ηράκλειο δεν ήταν μια πόλη ξένη. Τώρα ξεκινά πάλι μια διαφορετική περίοδος στις ζωές μας και είμαι σίγουρη ότι η φιλία τους θα με συντροφεύει πάντα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το σύντροφό μου Νίκο, ο οποίος σε αυτή την πορεία με στήριξε με την πίστη του στις δυνατότητές μου και έδειξε απίστευτη υπομονή για τις ατελείωτες ώρες δουλειάς μου στο εργαστήριο και τις ατελείωτες ώρες μπροστά στο υπολογιστή.

Στο τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, αν και δεν αρκούν λίγες γραμμές. Είναι αυτοί που μου έδωσαν τη δυνατότητα να κυνηγήσω και να κάνω πραγματικότητα τα όνειρα μου. Η πίστη τους σε μένα, μου έδωσε κουράγιο ακόμα και τις πιο δύσκολες στιγμές.

Η παρούσα διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το ΠΕΝΕΔ 2003.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
Το σύστημα των λιποπρωτεϊνών	13
Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών	13
Αθηροσκλήρωση	15
Η HDL ως παράγοντας κινδύνου	15
Το σωματίδιο της HDL	16
Η αντι-αθηρογενετική δράση της HDL και η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης	16
Οι πλειοτροπικές ιδιότητες της HDL	19
Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι στην αύξηση της HDL	20
Ο μεταφορέας ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)	22
Δομή της πρωτεΐνης ABCA1	22
Φυσικές μεταλλαγές και μοντέλα ζώων	23
Μεταγραφική ρύθμιση	24
Οι οξυστερόλες και ο υποδοχέας LXR	24
Ρετινοειδή	25
PPAR	26
SREBP-2	27
Sp1, USF, ZNF202	27
Σύμπλοκα συνενεργοποιητών/συγκатаστολέων	28
Εναλλακτικά μετάγραφα και εναλλακτικοί υποκινητές	29
Ο μεταφορέας ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1)	30
Μεταγραφική ρύθμιση	31
Οι πυρηνικοί υποδοχείς LXR	32
Συνδέτες των LXR	33
Οι LXRs ως αισθητήρες του μεταβολισμού των λιπιδίων	34
Ομοίωση της χοληστερόλης	34
Απορρόφηση της χοληστερόλης από την τροφή	35
Βιοσύνθεση και πρόσληψη της χοληστερόλης από το ήπαρ	36
Αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης	36
Μεταβολισμός των λιπαρών οξέων	37
Η δράση των LXRs στη φλεγμονή	39

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1	40
Η οικογένεια Sp	41
Δομικά χαρακτηριστικά των παραγόντων Sp	41
Sp1 και Sp3	42
Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	43
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	44
Οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBP	44
Δύο γονίδια – τρεις πρωτεΐνες	44
Δομή των SREBP πρωτεϊνών	45
Η αμινοτελική περιοχή των SREBP είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής	45
Πρωτεολυτικός καταρράκτης ενεργοποίησης των SREBP	46
Στοιχεία απόκρισης στις στερόλες (SREs)	48
Λειτουργία της κάθε ισομορφής SREBP <i>in vivo</i>	49
Ρύθμιση των SREBPs	51
Μεταγραφική ρύθμιση	51
Μετα-μεταφραστική ρύθμιση	53
Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2	54
Δομή και λειτουργία	54
Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στο μεταβολισμό	56
Οι FOXA ως πρωτοπόροι (pioneer) μεταγραφικοί παράγοντες	58
Οι παράγοντες FOXA και οι ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς	59
Το μεταγραφικό σύμπλοκο AP-1	59
Ρύθμιση των πρωτεϊνών AP-1 από φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά ερεθίσματα	60
ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	62
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
<u>Μέρος I:</u> Ο ρόλος του παράγοντα Sp1 στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοϊκό οξύ	
Αποτελέσματα	
Η μιθραμυκίνη Α εμποδίζει την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή	108
Η μιθραμυκίνη Α εμποδίζει τη στρατολόγηση του Sp1 και του RXRα στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1	109
Η βέλτιστη επαγωγή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή απαιτεί το μεταγραφικό παράγοντα Sp1	114

Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR	115
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR	116

Συζήτηση

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και πυρηνικών υποδοχέων για την ενεργοποίηση γονιδίων	121
Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και πυρηνικών υποδοχέων	122
Φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1	123
Θέσεις πρόσδεσης για LXR/RXR και Sp1 στα γονίδια που μετέχουν στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης	124

Μέρος II: Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2/HNF-3β αναστέλλει την τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 στο ήπαρ εμποδίζοντας τη σηματοδότηση μέσω των RXRα / LXRα

Αποτελέσματα

Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 παίζει αρνητικό ρόλο στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα	127
Εύρεση πιθανών θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα FOXA2 στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1	131
Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	133
Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή.....	137
Ο FOXA2 προσδένεται στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1.....	142
Η πρόσδεση του FOXA2 στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 δεν επηρεάζει την πρόσδεση των LXRα/RXRα στο LXRE	148
Ο FOXA2 αλληλεπιδρά φυσικά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα	149
Ο FOXA2 μπορεί να δράσει ως συνενεργοποιητής της σηματοδότησης από τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα	150
Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt/PKB δεν επιδρά στην κατασταλτική του δράση FOXA2 πάνω στους LXRα/RXRα	151

Συζήτηση

Η ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 από παράγοντες της οικογένειας των forkhead winged-helix πρωτεϊνών	154
Στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 βρίσκονται πολλαπλά αρνητικά στοιχεία ρύθμισης της μεταγραφής	155
Ο μηχανισμός καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον FOXA2	155
Ο ανασταλτικός ρόλος του FOXA2 στη σηματοδότηση των LXRα/RXRα δεν επηρεάζεται από τη σηματοδότηση της Akt/PKB	158

Μέρος III: Ταυτοποίηση και Χαρακτηρισμός ρυθμιστικών στοιχείων που εδράζονται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1

A. Ο διπτός ρόλος των πρωτεϊνών SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) στη ρύθμιση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1

Αποτελέσματα

Ταυτοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων στο πρώτο ιντρόνιο του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 τα οποία απαιτούνται για την ενεργότητά του στα ηπατικά κύτταρα	162
Ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 από το μεταγραφικό παράγοντα Sp1	164
Τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα ρυθμίζουν έμμεσα την ενεργότητα του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες	166
Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP-1c στρατολογείται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή	168
Ο SREBP-1 προσδένεται σε πολλαπλά σημεία και ενεργοποιεί τον υποκινητή του ιντρονίου 1 στο γονίδιο ABCA1	170
Διπτός τρόπος ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον SREBP-1	174

Συζήτηση

Η περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1	176
Η δράση των οξυστερολών στη ρύθμιση της περιοχής του ιντρονίου	178
Ο διπτός ρόλος του SREBP-1c στη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1	178

B. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα JUNB στην επαγωγή του του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1

Αποτελέσματα

Η έκφραση του γονιδίου ABCA1 επάγεται κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων THP-1 σε μακροφάγα 180

Ο μεταγραφικός παράγοντας JUNB ενεργοποιεί τον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 181

Συζήτηση 185

Μέρος IV: Λειτουργική Μεταλλαγή στο Γονίδιο ABCG1 του Ανθρώπου Ευθύνεται για Ισχαιμικά Επεισόδια

Αποτελέσματα 187

Συζήτηση 191

ΣΥΝΟΨΗ 193

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 197

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 223

Περίληψη

Τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα αποτελούν έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Ο μεμβρανικός μεταφορέας ABCA1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βιογένεση της HDL προάγοντας την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα προς τη φτωχή σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνη A-I. Μεταλλαγές στο γονίδιο ABCA1 προκαλούν τη νόσο Tangier η οποία χαρακτηρίζεται από σχεδόν ανύπαρκτα επίπεδα HDL στο πλάσμα, συσσώρευση αφρωδών κυττάρων σε ποικίλους ιστούς και σχετικά μέτρια αύξηση στο ρυθμό εμφάνισης αθηροσκλήρωσης. Η πρωτεΐνη ABCA1 στο ήπαρ αποτελεί την κύρια πηγή της HDL στο πλάσμα ενώ η δράση της ABCA1 στα μακροφάγα προστατεύει από το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και την αθηροσκλήρωση. Κατά συνέπεια, η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 έχει συνδεθεί με την αύξηση των επιπέδων λειτουργικής HDL χοληστερόλης στο πλάσμα και την προστασία από την αθηροσκλήρωση.

Ο κύριος μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 είναι μέσω της ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων LXRA/RXRa από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζουν την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 μέσω του παραπάνω μονοπατιού καθώς και η ταυτοποίηση νέων ρυθμιστικών στοιχείων και παραγόντων.

Αρχικά, εξετάσαμε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 ο οποίος βρέθηκε να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και να είναι απαραίτητος για τη βασική μεταγραφή του γονιδίου. Παρουσία οξυστερόλων και ρετινοειδών η φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ του Sp1 και των υποδοχέων LXRA/RXRa ήταν απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη επαγωγή του γονιδίου ABCA1. Στη συνέχεια, ταυτοποιήσαμε για πρώτη φορά θέσεις πρόσδεσης για το ηπατικό μεταγραφικό παράγοντα FOXA2/HNF-3β στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η πρόσδεση του FOXA2 στις θέσεις αυτές είχε κατασταλτικό ρόλο στη βασική μεταγραφή του γονιδίου ABCA1. Επιπλέον αποδείξαμε ότι η πρόσδεση του FOXA2 στο στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 μείωσε την επαγωγή από οξυστερόλες και ρετινοειδή μέσω ανταγωνισμού με τη βασική μεταγραφική μηχανή που συναρμολογείται σε αυτό το στοιχείο. Τέλος, εξετάσαμε την περιοχή του 1^{ου} ιντρονίου του γονιδίου ABCA1 η οποία περιλαμβάνει ένα λειτουργικό υποκινητή. Αποδείξαμε ότι η περιοχή του 1^{ου} ιντρονίου περιέχει θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1 ο οποίος ενεργοποιείται από τους

LXRα/RXRα ως απόκριση στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ισχυρή ενεργοποίηση της περιοχής του 1^{ου} ιντρονίου του γονιδίου ABCA1 από τον παράγοντα JunB κατά την διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα.

Ο μεταφορέας ABCG1, όμοια με τον ABCA1, παίζει ρόλο στην εκροή της χοληστερόλης προς ώριμα σωματίδια HDL και στην προστασία από την αθηροσκλήρωση. Εξετάσαμε το ρόλο μιας φυσικής μεταλλαγής στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 που εντοπίστηκε στον πληθυσμό της Κοπεγχάγης, η οποία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου και ισχαιμικά επεισόδια και με δύσπνοια. Αποδείξαμε ότι η μεταλλαγή αυτή καταστρέφει μια θέση πρόσδεσης για τον παράγοντα Sp1 και εμποδίζει την επαγωγή του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 από αυτόν τον παράγοντα.

Η σε βάθος κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της ABCA1 στο ήπαρ και ο ρόλος συγκεκριμένων παραγόντων σε αυτές τις διαδικασίες αναμένεται να οδηγήσει στην δημιουργία νέων ουσιών που θα αυξάνουν την έκφραση του ABCA1 και κατά συνέπεια τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα, προσφέροντας έτσι προστασία από την αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο.

ABSTRACT

Low levels of plasma HDL cholesterol are an independent risk factor for cardiovascular disease. The membrane ABCA1 transporter plays a key role in the biogenesis of HDL by promoting the efflux of cellular cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoprotein A-I. Mutations in the ABCA1 gene lead to Tangier disease which is characterized by near absent plasma HDL levels, accumulation of foam cells in various tissues and a moderate increase in the incidence of atherosclerosis. Hepatic ABCA1 protein is the major source of plasma HDL while macrophage ABCA1 protects against foam cell formation and atherosclerosis. Thus, the induction of ABCA1 gene expression has been associated with the increase in functional plasma HDL levels and the protection from atherosclerosis.

The best characterized and most significant mechanism of ABCA1 gene regulation is via the activation of the nuclear receptors LXR α /RXR α in response to cholesterol loading. The purpose of the present thesis was the study of the molecular mechanisms that affect the induction of the ABCA1 gene via the above-mentioned pathway as well as the identification of new regulatory elements and factors.

Initially, we investigated the role of the transcription factor Sp1 which binds to the proximal ABCA1 gene promoter and is necessary for its basal activity in hepatic cells. We showed that, physical and functional interactions between Sp1 and the nuclear receptors LXR α /RXR α were required for the optimal induction of ABCA1 gene transcription in response to their ligands, oxysterols and retinoids. Next, we identified, for the first time, binding sites for the hepatic transcription factor FOXA2/HNF-3 β in the ABCA1 gene promoter. Binding of FOXA2 to these sites repressed the basal ABCA1 gene transcription. Furthermore, we showed that binding of FOXA2 to the TATA-box of the ABCA1 gene promoter inhibited the induction by oxysterols and retinoids possibly via competition with the transcription initiation machinery which is assembled to this site. Finally, we investigated the functional promoter that is present in the first intron of the ABCA1 gene. We showed the transcription factor SREBP-1, which is activated by LXR α /RXR α heterodimers in response to oxysterols and retinoids, binds to multiple sites in the proximal intron 1 promoter region. One of these sites overlaps with an AP1 binding site which binds to the transcription factor JunB during monocyte differentiation to macrophages.

The ABCG1 transporter, similarly to ABCA1, plays a key role in cholesterol efflux to mature HDL particles and in the protection against atherosclerosis. We investigated the role of a natural mutation in the ABCG1 gene promoter which was

identified in the general population in the City of Copenhagen and is associated with increased incidence of ischemic heart disease, myocardial infarction and dyspnea. We showed that this mutation abolishes a binding site for the transcription factor Sp1 and inhibits the induction of the ABCG1 gene promoter by this factor.

Understanding in depth the molecular mechanisms that regulate ABCA1 gene expression in the liver and the role of specific transcription factors in these processes is anticipated to lead to the development of new substances that will increase ABCA1 gene expression and as a result, plasma HDL levels, providing protection against atherosclerosis and cardiovascular disease.

Εισαγωγή

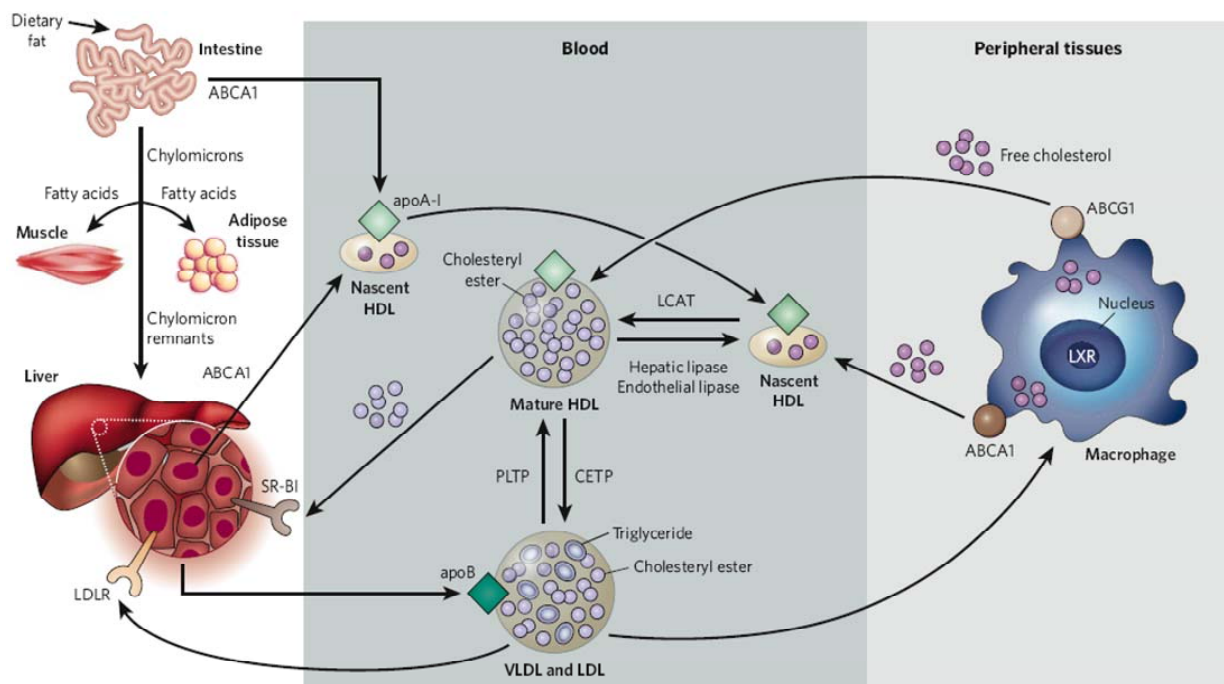
Το σύστημα των λιποπρωτεϊνών

Σε κάθε οργανισμό, τα λιπίδια έχουν πολλαπλούς ρόλους. Αποτελούν πηγή ενέργειας, συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και δομικά στοιχεία για μόρια που εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες, οι βιταμίνες και τα χολικά οξέα. Οι ανάγκες του οργανισμού για λιπίδια καλύπτονται τόσο μέσω της διατροφής όσο και από βιοσυνθετικά μονοπάτια των κυττάρων. Η μεταφορά της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων που είναι αδιάλυτα στο νερό μέσω της κυκλοφορίας επιτυγχάνεται με το πακετάρισμά τους μέσα σε σωματίδια τα οποία είναι διαλυτά στο νερό, και κατά κύριο λόγο σφαιρικά, τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος παραδοσιακά κατατάσσονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: τα χυλομικρά, τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL, very low-density lipoproteins), τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL, low-density lipoproteins) και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL, high-density lipoproteins). Κάθε λιποπρωτεΐνη έχει ξεχωριστή σύσταση σε λιπίδια και ειδικές δομικές πρωτεΐνες που καλούνται απολιποπρωτεΐνες. Τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών και των απολιποπρωτεϊνών έχουν συνδεθεί με τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (CHD, coronary heart disease). Επιδημιολογικά και γενετικά δεδομένα έχουν δείξει ξεκάθαρα ότι η αύξηση στα επίπεδα της LDL ή της απολιποπρωτεΐνης Β (apoB, apolipoprotein B) και η μείωση στην HDL χοληστερόλη ή τα επίπεδα της apoA-I συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (1, 2). Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα της HDL έχουν δειχθεί ότι προστατεύουν από τη στεφανιαία νόσο και συνεισφέρουν στη μακροζωία των ανθρώπων (1-5). Άλλοι παράγοντες κινδύνου που συμβάλουν στη στεφανιαία νόσο είναι η ηλικία, η αρτηριακή πίεση, το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η αθηρογενετική διατροφή (2).

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει τη μεταφορά λιπιδίων, ιδιαίτερα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, μέσα στο αίμα (Εικόνα 1). Τα λίπος που προέρχεται από την τροφή απορροφάται από το έντερο και πακετάρεται στα χυλομικρά (μεγάλες λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια), τα οποία μέσω του αίματος μεταφέρονται στους περιφερειακούς ιστούς. Στους μύς και το λιπώδη ιστό, το ένζυμο LPL (lipoprotein lipase) διασπά τα χυλομικρά, και τα λιπαρά οξέα εισέρχονται στους ιστούς αυτούς. Στη συνέχεια, τα υπολείμματα των χυλομικρών προσλαμβάνονται από το ήπαρ. Στο ήπαρ τα λιπίδια

«φορτώνονται» στην apoB και εκκρίνονται τα σωματίδια της VLDL (very-low density lipoprotein) τα οποία υπόκεινται σε υδρόλυση από την LPL προκειμένου να σχηματιστεί η IDL (intermediate density lipoprotein) και ακολούθως, η LDL (low density lipoprotein). Οι LDLs στη συνέχεια προσλαμβάνονται από το ήπαρ μέσω του υποδοχέα LDLR (LDL receptor), καθώς και από άλλα μονοπάτια.



Εικόνα 1: Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο κείμενο. VLDL, very low-density lipoprotein· LDL, low-density lipoprotein· HDL, high-density lipoprotein· LDLR, LDL receptor· LCAT, lecithin cholesterol acyltransferase· CETP, cholesteryl ester transfer protein· PLTP, phospholipid transfer protein. [πηγή: αναφορά (6)]

Αντίθετα, οι HDLs (high-density lipoproteins) παράγονται από το ήπαρ και το έντερο με τη συμβολή της φτωχής σε λιπίδια apoA-I η οποία εκκρίνεται από τους ίδιους ιστούς. Η apoA-I συγκεντρώνει χοληστερόλη από αυτά τα όργανα μέσω της δράσης του μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), σχηματίζοντας νέα σωματίδια HDL, και με τον τρόπο αυτό προστατεύεται από το γρήγορο καταβολισμό στα νεφρά. Στους περιφερειακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, τα νέα σωματίδια της HDL προάγουν την εκροή χοληστερόλης από τους ιστούς μέσω της δράσης του ABCA1. Οι ώριμες μορφές της HDL (HDL₂ και HDL₃) επίσης προάγουν την εκροή χοληστερόλης αλλά μέσω της δράσης του μεταφορέα ABCG1. Στα μακροφάγα, ο πυρηνικός υποδοχέας LXR επάγει την έκφραση των ABCA1 και ABCG1 ως απόκριση στην αύξηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας χοληστερόλης. Η ελεύθερη (μη εστεροποιημένη

χοληστερόλη) στα νέα σωματίδια HDL εστεροποιείται σε εστέρα της χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase), δημιουργώντας ώριμες (σφαιρικές) μορφές HDL. Η χοληστερόλη στα σωματίδια της HDL επιστρέφει στο ήπαρ τόσο απευθείας, μέσω της πρόσληψης από τον υποδοχέα SR-BI, όσο και έμμεσα, με τη μεταφορά στα σωματίδια των LDL και VLDL με τη δράση της CETP (cholesteryl ester transfer protein). Τα λιπίδια που περιέχονται στην HDL υδρολύονται από τα ένζυμα λιπάση του ήπατος (hepatic lipase) και λιπάση του ενδοθηλίου (endothelial lipase). Τέλος, τα φωσφολιπίδια της HDL μπορούν να μεταφερθούν στις VLDL/LDL από το ένζυμο PLTP (phospholipid transfer protein).

Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια συστηματική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση πλακών, πλούσιων σε λιπίδια, στα τοιχώματα των αρτηριών. Τα σοβαρότερα κλινικά συμπτώματα της αθηροσκλήρωσης είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό και ασθένεια των περιφερειακών αγγείων. Στις ανεπτυγμένες βιομηχανικά χώρες η αθηροσκλήρωση είναι η πρώτη αιτία θνησιμότητας. Αυτό συμβαίνει παρά τη σημαντικότερη πρόοδο στη θεραπεία με την ευρεία χρήση των στατινών, οι οποίες αναστέλουν την HMG-CoA αναγωγάση, ένα ένζυμο-κλειδί στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Η χρήση των στατινών έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση των περιστατικών με καρδιαγγειακές παθήσεις, κυρίως λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα (7, 8). Ωστόσο, ακόμα και σε επιθετικές θεραπευτικές στρατηγικές με τη χρήση στατινών, που μειώσαν τα επίπεδα της LDL κάτω από τα καθιερωμένα όρια, το ποσοστό των καρδιαγγειακών παθήσεων που υπολειπόταν ήταν ιδιαίτερα υψηλό (9, 10). Τέτοιες μελέτες αναδεικνύουν τα όρια της θεραπείας αποκλειστικά με στατίνες στην αναστολή της ανάπτυξης αθηροσκληρωτικών ασθενειών που βρίσκονται σε εξέλιξη. Υπάρχει, επομένως, ανάγκη, η δυναμική της θεραπείας με στατίνες να συνδυαστεί με την αντιμετώπιση και άλλων παραγόντων κινδύνου, όπως τα χαμηλά επίπεδα της HDL.

Η HDL ως παράγοντας κινδύνου

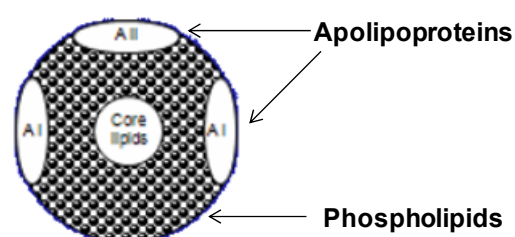
Τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης είναι αντιστρόφως ανάλογα με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (11). Τα χαμηλά επίπεδα HDL είναι η πιο κοινή λιπιδική ανωμαλία που παρατηρείται σε άνδρες με στεφανιαία νόσο (12). Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της HDL χοληστερόλης κατά 1mg

dl⁻¹ σχετίζεται με μείωση κατά 2-3% του κινδύνου για καρδιαγγειακές ασθένειες (13-15). Είναι πιθανό επομένως, θεραπείες που στοχεύουν στην αύξηση των επιπέδων της HDL να μειώσουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων.

Επιπρόσθετα, σημειώνεται παγκοσμίως μια κατακόρυφη αύξηση στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά, και η αύξηση αυτή σχετίζεται με την αύξηση των καρδιαγγειακών νόσων (16, 17). Η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου περιλαμβάνει τρία ή περισσότερα από τα ακόλουθα συμπτώματα: παχυσαρκία, υψηλή αρτηριακή πίεση, χαμηλά επίπεδα HDL, υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων ή υψηλά επίπεδα σακχάρου (σε νηστεία). Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης χαμηλών επιπέδων HDL στο μεταβολικό σύνδρομο και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, καθιστά την αύξηση των επιπέδων της HDL προφανή στόχο για τη μείωση της αθηροσκλήρωσης.

Το σωματίδιο της HDL

Η HDL του πλάσματος παράγεται κυρίως στο ήπαρ (~80%) και σε μικρότερο βαθμό (~20%) στο έντερο (18, 19) και αποτελείται από περίπου 50% απολιποπρωτεΐνες και 50% λιπίδια. Το εσωτερικό του σωματιδίου της HDL περιέχει μη πολικά (αδιάλυτα στο νερό) λιπίδια αποτελούμενα από εστέρες της χοληστερόλης (CE, cholesteryl esters) και ένα μικρό ποσό τριγλυκεριδίων (TG). Στην επιφάνεια βρίσκονται τα σχετικά πολικά λιπίδια (διαλυτά στο νερό) όπως τα φωσφολιπίδια, ένα μέρος της ελεύθερης χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνες. Το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL είναι η απολιποπρωτεΐνη A-I (apoA-I) και ακολουθεί η apoA-II (Εικόνα 2).



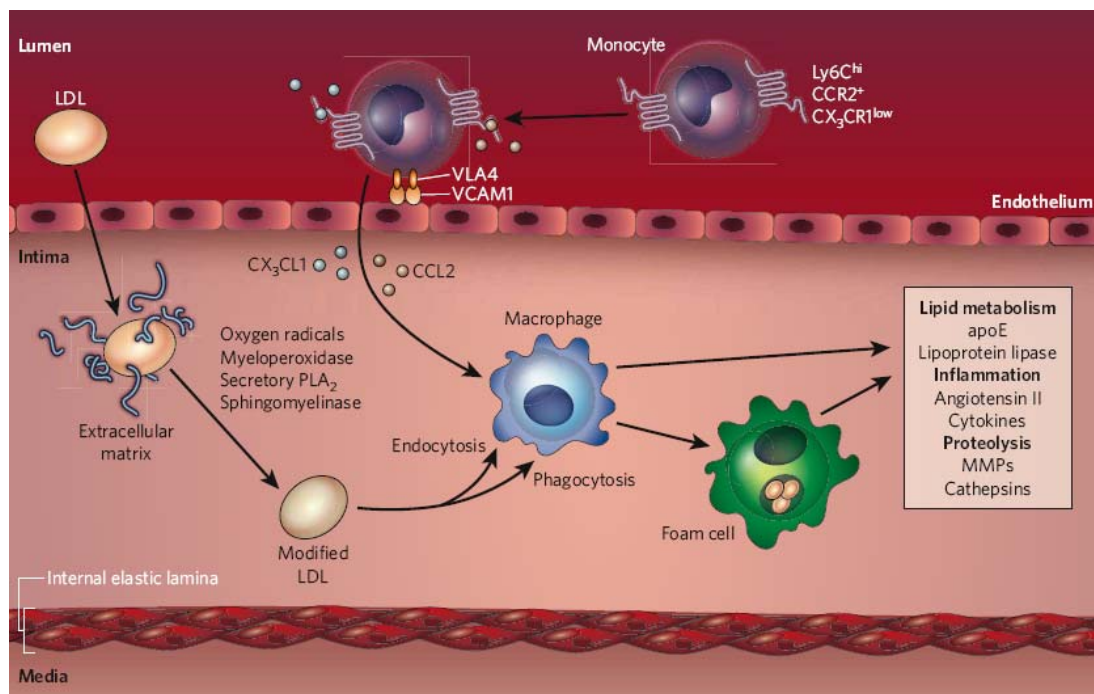
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση ενός σωματιδίου HDL.

Η αντι-αθηρογενετική δράση της HDL και η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Η αντι-αθηρογενετική δράση της HDL οφείλεται κυρίως στην ικανότητά της να διεγείρει την εκροή χοληστερόλης από τους περιφερειακούς ιστούς, τη μεταφορά της στο πλάσμα, την πρόσληψη από το ήπαρ και την αποβολή προς τη χολή, μια διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (Reverse Cholesterol Transport). Συγκεκριμένα όμως η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τα μακροφάγα του τοιχώματος των αρτηριών είναι αυτή που

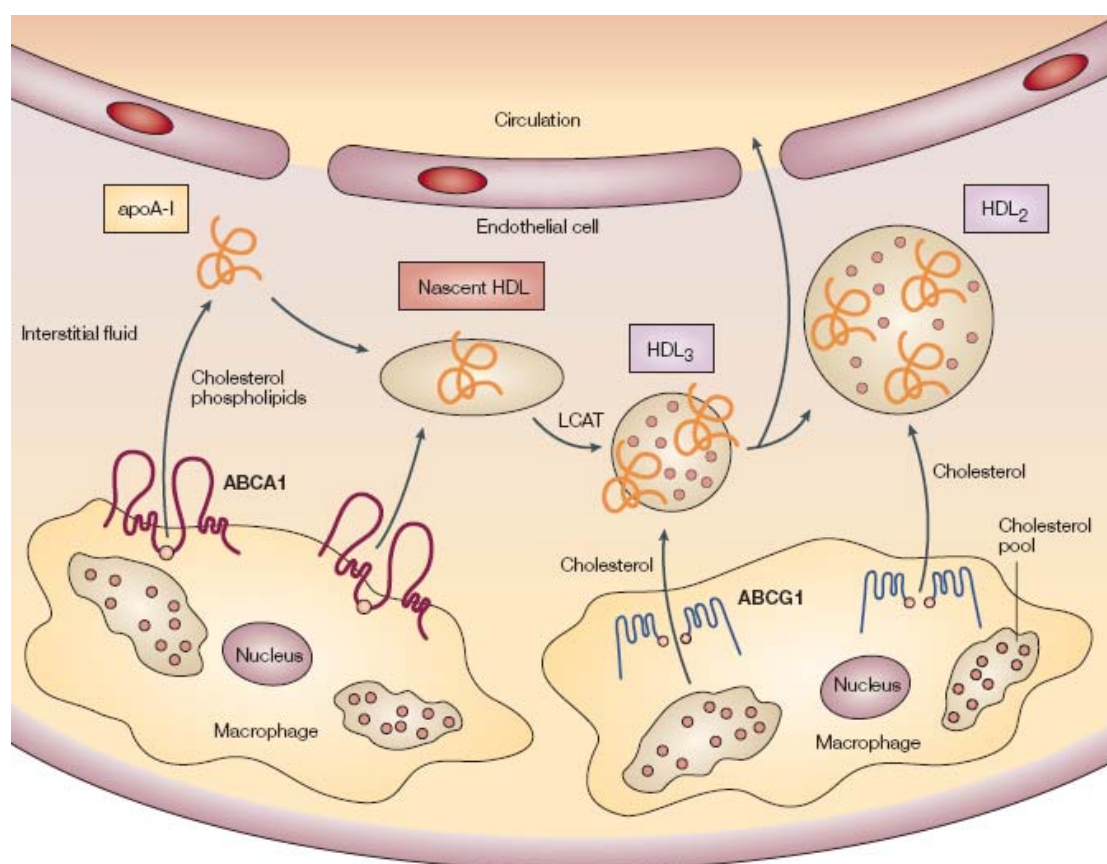
διαδραματίζει τον κεντρικό ρόλο στην αντι-αθηρογενετική δράση της HDL (Εικόνα 1) (20).

Η υπερβολική πρόσληψη τροποποιημένης LDL ή υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος δημιουργεί κύτταρα που αποκαλούνται «αφρώδη» καθώς είναι γεμάτα από χοληστερόλη και το κυτταρόπλασμα τους έχει αφρώδη όψη λόγω των σταγονιδίων από εστέρες της χοληστερόλης (Εικόνα 3). Ένας μηχανισμός που προτείνεται για την ερμηνεία της δημιουργίας των «αφρωδών» κυττάρων είναι η ανισορροπία μεταξύ της πρόσληψης λιποπρωτεϊνών και της εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Η HDL μπορεί να δράσει ως δέκτης της χοληστερόλης κατά την εκροή της από τα μακροφάγα (Εικόνα 1), γεγονός που εξηγεί εν μέρει τις αντι-αθηρογενετικές της ιδιότητες.



Εικόνα 3: Δημιουργία των «αφρωδών» κυττάρων. Οι LDLs του αίματος εισέρχονται στον έσω χιτώνα (intima) όπου συγκρατούνται μέσω της πρόσδεσης στο εξωκυττάριο πλέγμα. Στη συνέχεια οι LDLs τροποποιούνται (oxygen radicals, myeloperoxidase, secretory phospholipase A2, sphingomyelinase) με αποτέλεσμα τη δημιουργία λιπιδίων με προ-φλεγμονώδη δράση τα οποία ξεκινούν και συντηρούν μια ενεργή φλεγμονώδη διαδικασία. Η φλεγμονή αυτή οδηγεί στην παραγωγή χυμοκινών (π.χ. CX3CL1 και CCL2), οι οποίες στρατολογούν ομάδες μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα. Τα μονοκύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία προσλαμβάνουν την τροποποιημένη LDL μέσω ενδοκύττωσης ή φαγοκύττωσης και μετατρέπονται σε «αφρώδη» κύτταρα (γεμάτα με χοληστερόλη). Τα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορους παράγοντες που εμπλέκονται στην εξάπλωση της αθηροματικής πλάκας, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, τη φλεγμονή και την πρωτεόλυση. [πηγή: αναφορά (6)]

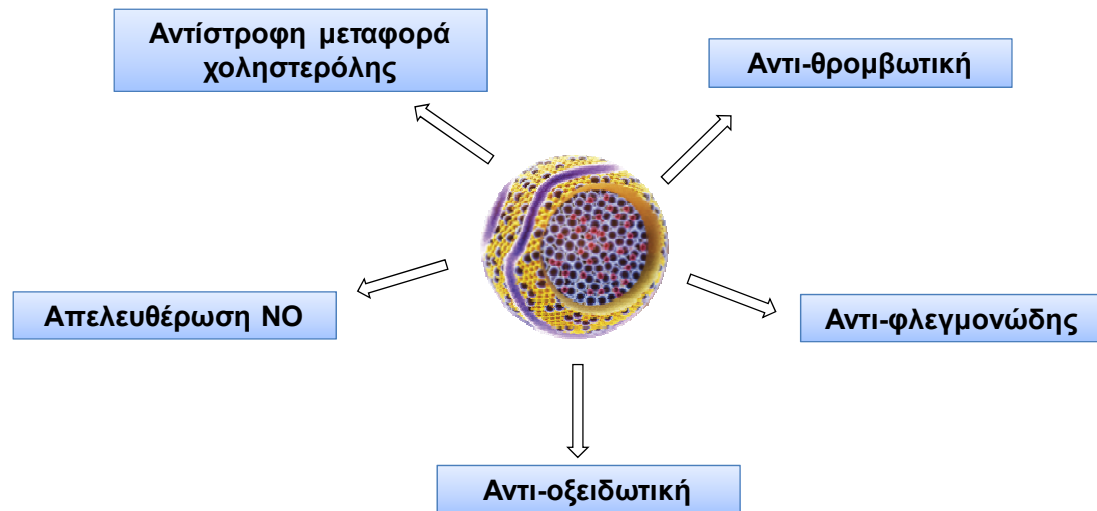
Η εκροή της χοληστερόλης από τα αφρώδη κύτταρα με τη μεσολάβηση της HDL ή των απολιποπρωτεϊνών της αντιπροσωπεύει ένα καθοριστικό βήμα στην πρόληψη ή την αντιστροφή της αθηροσκλήρωσης. Η διαδικασία της εκροής χοληστερόλης βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και τα κυριότερα μόρια που εμπλέκονται σε αυτή είναι οι μεταφορείς ABC (ATP-binding cassette) A1 (ABCA1) και ABCG1 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί εκροής της χοληστερόλης από το αρτηριακό τοίχωμα. Με την είσοδό της στο χώρο κάτω από το ενδοθήλιο η φτωχή σε λιπίδια APOA1 αλληλεπιδρά με το μεταφορέα ABCA1 στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων του αρτηριακού τοιχώματος και προάγουν την εκροή της ελεύθερης χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στο σχηματισμό μορίων HDL τα οποία υπόκεινται σε περαιτέρω τροποποίηση από το ένζυμο LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) και μετατρέπονται σε σφαιρικά σωματίδια HDL₂ (μεγαλύτερα, λιγότερο πυκνά σωματίδια) ή σε HDL₃ (μικρότερα, πιο πυκνά σωματίδια). Τα σωματίδια αυτά με τη σειρά τους μπορούν να δράσουν ως αποδέκτες της χοληστερόλης που εκρέει από τα μακροφάγα με τη μεσολάβηση του ABCG1 οδηγώντας σε περαιτέρω εμπλουτισμό της HDL, πριν την επιστροφή της στην κυκλοφορία. [πηγή: αναφορά (21)]

Οι πλειοτροπικές ιδιότητες της HDL

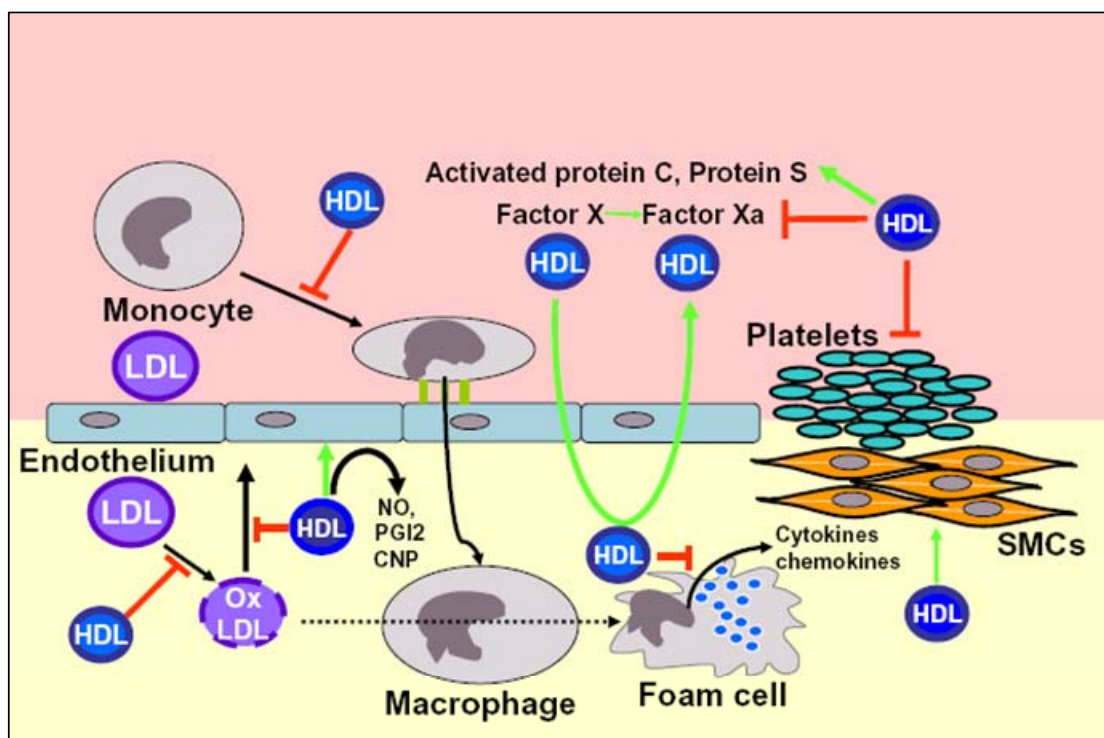
Εκτός από τη δράση της στην εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα, η HDL έχει επίσης αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (Εικόνες 5, 6), οι οποίες επίσης σχετίζονται με τη μείωση των καρδιαγγειακών νόσων.



Εικόνα 5: Η HDL προστατεύει από την αθηροσκλήρωση με πολλαπλούς τρόπους.

Στο σωματίδιο της HDL βρίσκονται πάνω από 50 διαφορετικές πρωτεΐνες πολλές από τις οποίες δεν είναι απολιποπρωτεΐνες αλλά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονής (22). Επίσης, το λιπιδικό τμήμα της HDL είναι πολύ ετερογενές και δεν περιλαμβάνει μόνο ανενεργό φορτίο αλλά και ενεργά λιπίδια όπως η sphingosine-1-phosphate (23). Η αντιφλεγμονώδης δράση της HDL προστατεύει από και αντιστρέφει την οξείδωση της LDL, η οποία συμβαίνει νωρίς κατά το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών και προάγει τη φλεγμονή στο αρτηριακό τοίχωμα (24-26). Επιπρόσθετα, οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL εμποδίζουν την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων (όπως της ιντερλευκίνης-1β) ή τη σύνθεση της αμυλοειδούς πρωτεΐνης Α από το ήπαρ, τα μακροφάγα και άλλα λευκοκύτταρα (27-30). Η HDL προστατεύει επίσης την ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία καλύπτουν τα αγγεία του αίματος και προάγει την απελευθέρωση του NO (nitric oxide) (23, 24, 31-34). Η HDL ενισχύει την παραγωγή του NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα από το ένζυμο της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου του ενδοθηλίου (eNOS) μέσω μηχανισμών που εμπλέκουν την αλληλεπίδραση της HDL με τον υποδοχέα της HDL, SR-BI, και τον υποδοχέα της sphingosine-1-phosphate (35). Με τις αντι-θρομβωτικές της ιδιότητες, η HDL βελτιώνει τη ροή του αίματος, αναστέλλει το σχηματισμό της θρομβίνης και εμποδίζει

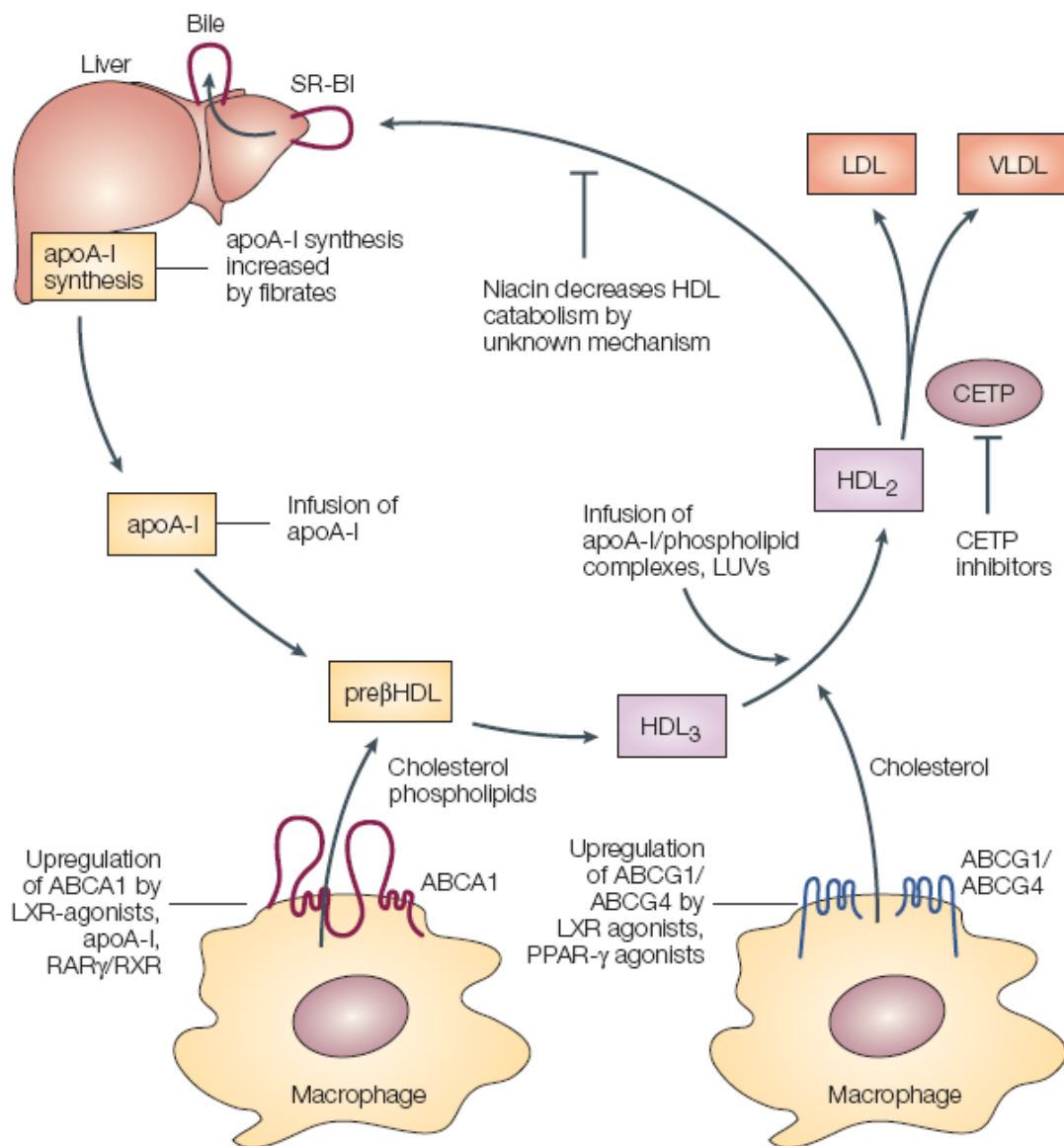
την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία αλλοιώσεων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο σχηματισμό θρόμβου (28, 33). Η HDL βοηθά επίσης στη διατήρηση της ακεραιότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων με την προώθηση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε απογυμνωμένες περιοχές των αγγείων για την αποκατάσταση του ενδοθηλίου (33, 36).



Εικόνα 6: Οι ευεργετικές δράσεις της HDL στο τοίχωμα των αγγείων. [πηγή: The HDLomics Consortium: www.hdlomics.org]

Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι στην αύξηση της HDL

Τα τελευταία χρόνια μια σειρά από προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν για την αύξηση των επιπέδων της HDL. Ανάμεσα στα θεραπευτικά μέσα περιλαμβάνονται αγωνιστές των πυρηνικών υποδοχέων PPAR, αναστολείς της CETP, η έγχυση απολιποπρωτεϊνών ή συνθετικών σωματιδίων HDL, ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων LXR/RXR, αναστολείς της λιπάσης του ήπατος και του ενδοθηλίου (21). Στην εικόνα 7, παρουσιάζονται τα σημεία στο μεταβολισμό της HDL που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για θεραπευτική παρέμβαση.



Εικόνα 7: Σύνοψη του μεταβολισμού της HDL και των πιθανών στόχων για θεραπευτική παρέμβαση. Οι φιβπράτες (fibrates) έχουνδειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση της απολιποπρωτεΐνης A-I σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (37, 38), ενώ η έγχυση apoA-I έχειδειχθεί να μειώνει την αθηροσκλήρωση σε ζώα (37, 39). Η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του ABCA1 μπορεί να ενισχυθεί με τη μεταγραφική επαγωγή από τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR (liver x receptor)/RXR (retinoid X receptor) (40) ή RARγ (retinoid acid receptor γ) (41). Με παρόμοιο τρόπο η ενεργοποίηση του LXR επάγει την έκφραση του μεταφορέα ABCG1, ο οποίος προάγει την εκροή χοληστερόλης στα σωματίδια HDL₂ και HDL₃ (42). Η αναστολή της CETP στους ανθρώπους οδηγεί σε αύξηση της HDL και μείωση της LDL χοληστερόλης (43), ενώ η νιασίνη προκαλεί αναστολή του καταβολισμού της HDL. [πηγή: αναφορά (21)]

Η αύξηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα ωστόσο, δε συνεπάγεται απαραίτητα και τη μείωση της αθηροσκλήρωσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του αναστολέα της CETP (torcetrapib) ο οποίος εμποδίζει τη μεταφορά

εστέρων της χοληστερόλης από την HDL στις LDL και VLDL. Η χορήγηση του συγκεκριμένου αναστολέα σε ασθενείς, αν και αύξησε τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα, αύξησε επίσης και τον κίνδυνο καρδιακής νόσου. Επίσης, υπάρχουν παραδείγματα ανθρώπων οι οποίοι παρά τα υψηλά επίπεδα HDL εμφάνισαν στεφανιαία νόσο (44).

Τα παραδείγματα αυτά επισημαίνουν ότι για την προστασία από τις καρδιαγγειακές νόσους δεν αρκεί να είναι τα επίπεδα της HDL ανεβασμένα αλλά κυρίως να υπάρχει λειτουργική HDL. Στα πλαίσια αυτής της στρατηγικής, η αύξηση των επιπέδων του μεταφορέα ABCA1 έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή λειτουργικής HDL με αντι-αθηρογενετική δράση.

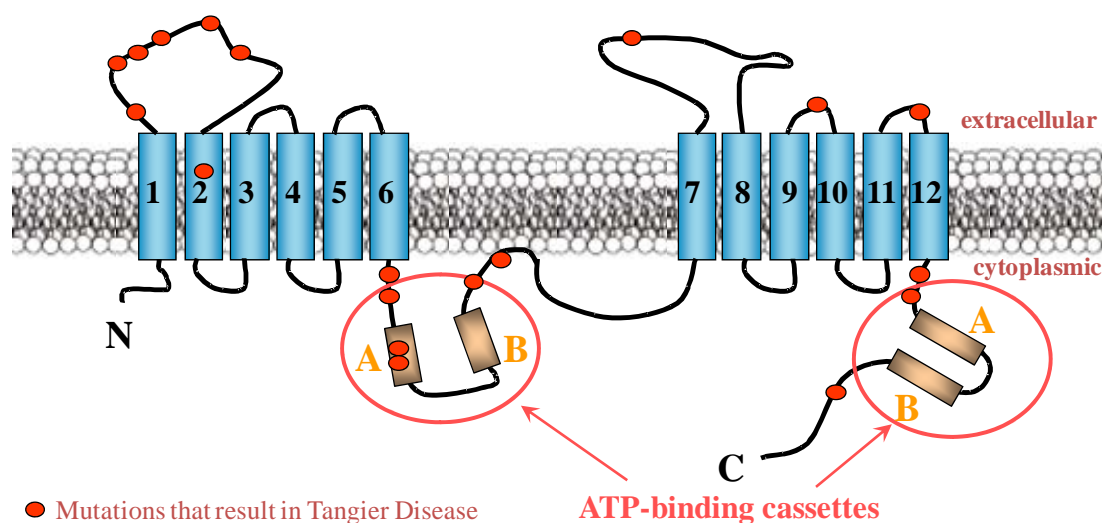
Ο μεταφορέας ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)

Ο μεταφορέας ABCA1 εκφράζεται παντού, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στον πλακούντα, τους εμβρυϊκούς ιστούς, τους πνεύμονες, τα επινεφρίδια, τον εγκέφαλο, τα μακροφάγα, και φυσικά, το ήπαρ (45-48). Ο ABCA1 έχει ταυτοποιηθεί ως το ελλατωματικό μόριο στην ασθένεια Tangier (49-51). Ασθενείς με τη νόσο Tangier έχουν σχεδόν ανύπαρκτα επίπεδα HDL στο πλάσμα λόγω ταχύτατου καταβολισμού, συσσωρεύουν αφρώδη κύτταρα σε ποικίλους ιστούς και παρουσιάζουν μια μέτρια επιτάχυνση στο ρυθμό αθηροσκλήρωσης (52-55). Ο μεταφορέας ABCA1 προωθεί την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα προς τη φτωχή σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνη A-I προκειμένου να δημιουργήσει νέα σωματίδια HDL (Εικόνα 4). Ο ABCA1 μετατοπίζει τη χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητά τους στην επιφάνεια του κυττάρου. Η φτωχή σε λιπίδια apoA-I αλληλεπιδρά απευθείας με τον ABCA1, πιθανότατα με το να προσδένεται στις δύο μεγάλες εξωκυττάρειες περιοχές του μεταφορέα. Αντίθετα όμως με την προώθηση της εκροής χοληστερόλης προς τη φτωχή σε λιπίδια apoA-I, ο ABCA1 προάγει ελάχιστα την εκροή λιπιδίων προς τα μικρότερα σωματίδια HDL₃ ενώ δεν προάγει καθόλου την εκροή λιπιδίων προς τα μεγαλύτερα σωματίδια HDL₂ (56).

Δομή της πρωτεΐνης ABCA1

Ο ABCA1 είναι μια πρωτεΐνη 2261 αμινοξέων και είναι μέλος μιας υπεροικογένειας ABC (ATP-binding cassette) μεταφορέων που χρησιμοποιούν ATP ως πηγή ενέργειας για τη μεταφορά λιπιδίων και άλλων μεταβολιτών μέσα από τις

μεμβράνες (57). Ο ABCA1 αποτελείται από δύο μισά όμοιας δομής τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά. Το κάθε μισό έχει μια περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD, nucleotide binding domain) η οποία περιέχει δύο συντηρημένα πεπτιδικά μοτίβα γνωστά ως Walker A και Walker B, τα οποία βρίσκονται σε πολλές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν ATP, και μια διαμεμβρανική περιοχή που περιέχει έξι έλικες (Εικόνα 8). Αν και η δομή της πρωτεΐνης δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένη, προβέπεται ότι το αμινοτελικό άκρο του ABCA1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ότι διαθέτει δύο μεγάλες εξωκυττάρειες θηλιές που γλυκοζυλιώνονται σε μεγάλο βαθμό και συνδέονται με ένα ή περισσότερους δεσμούς κυστεΐνης (58, 59).



Εικόνα 8: Τοπολογικό μοντέλο του ABCA1. Οι θέσεις φυσικών μεταλλαγών σε ασθενείς με τη νόσο Tangier δείχνονται με σφαίρες. A, B, Walker A και Walker B [πηγή: αναφορά (60)]

Φυσικές μεταλλαγές και μοντέλα ζώων

Περισσότερες από 20 διαφορετικές μεταλλαγές στο μεταφορέα ABCA1 έχουν βρεθεί να προκαλούν τη νόσο Tangier (Εικόνα 8). Επιπλέον, εκτιμάται ότι μεταλλαγές στο γονίδιο ABCA1 ευθύνονται για τουλάχιστον το 10% των ανθρώπων στο γενικό πληθυσμό με χαμηλά επίπεδα HDL (61, 62).

Οι μελέτες σε ζώα βοήθησαν πολύ στην διελεύκανση του φυσιολογικού ρόλου του ABCA1. Ποντίκια με απαλοιφή του ABCA1 (knock out) είχαν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης όμοια με τους ανθρώπους που πάσχουν από τη νόσο Tangier (63, 64). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αν και η έλλειψη του ABCA1 αποκλειστικά από τα μακροφάγα, είχε μια ελάχιστη επίδραση στη μείωση των επιπέδων HDL στο πλάσμα των ποντικών, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της αθηροσκλήρωσης (πιθανότατα εμποδίζοντας την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης των μακροφάγων) (65, 66). Επομένως, φαίνεται πως ο ABCA1 των

μακροφάγων συνεισφέρει ελάχιστα στο κύριο μέρος της λιπιδίωσης της HDL και κατά συνέπεια στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα αλλά είναι σημαντικός για την προστασία από την αθηροσκλήρωση (67). Αντίστροφα, έλλειψη του ABCA1 από το ήπαρ ποντικών μείωσε δραματικά τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης κατά 80% περίπου (68). Με παρόμοιο τρόπο, μείωση κατά 50% της έκφρασης του ABCA1 στο ήπαρ ποντικών, με τη χρήση αδενοϊών για τη μεταφορά siRNA, οδήγησε σε μείωση της HDL κατά 40% (69). Φαίνεται, επομένως, πως η λειτουργία του ABCA1 στο ήπαρ είναι κρίσιμη για την αρχική λιπιδίωση της νεο-εκκρινόμενης και φτωχής σε λιπίδια apoA-I, προστατεύοντάς την από τη γρήγορη αποικοδόμηση και επιτρέποντάς της να συνεχίσει προς το σχηματισμό ώριμης HDL. Επιπλέον, η υπερέκφραση του ABCA1 στο ήπαρ αύξησε τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα (70, 71) ενώ η ταυτόχρονη υπερέκφραση στα μακροφάγα και το ήπαρ σχετίζεται με την προστασία από την αθηροσκλήρωση (72-74).

Μεταγραφική ρύθμιση

Το mRNA και η πρωτεΐνη του ABCA1 είναι πολύ ασταθείς, με χρόνο ημίσειας ζωής 1-2 ώρες στα μακροφάγα (75), γεγονός που υποδηλώνει ότι η νέα μεταγραφή και μετάφραση είναι σημαντικοί παράγοντες στην εξασφάλιση της σταθερής και της επαγόμενης έκφρασης του ABCA1.

Οι οξυστερόλες και ο υποδοχέας LXR

Όπως αναμένεται για ένα μεταφορέα ο οποίος μεσολαβεί στην εκροή της περίσσειας χοληστερόλης από το κύτταρο, η μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 επάγεται σημαντικά όταν τα κύτταρα δεχθούν μεγάλο φορτίο χοληστερόλης. Η επαγωγή αυτή συμβαίνει αποκλειστικά μέσω της ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων LXR (liver X receptor)/RXR (retinoid X receptor) (40, 76). Ο LXR και ο RXR σχηματίζουν υποχρεωτικά ετεροδιμερή τα οποία προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης LXREs (LXR response elements) του τύπου DR-4 (direct repeat separated by 4 nucleotides) στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και στο πρώτο ιντρόνιο (Εικόνες 9, 10). Οι υποδοχείς LXR και RXR ενεργοποιούνται από τις οξυστερόλες και το ρετινοϊκό οξύ, αντίστοιχα (77). Από τις οξυστερόλες που παράγονται φυσιολογικά η 22-υδροξυστερόλη, η 24-υδροξυστερόλη, και η 24,25-εποξυστερόλη είναι οι κυριότεροι συνδέτες του LXR (78). Η 27-υδροξυστερόλη φαίνεται πως είναι ο κύριος συνδέτης του LXR στα μακροφάγα και άλλα περιφερειακά κύτταρα (79). Επιπρόσθετα των φυσικών συνδετών, έχουν αναπτυχθεί

και συνθετικοί (π.χ. TO901317 και GW3965) προκειμένου να επιτευχθεί η ενεργοποίηση του ABCA1 και κατά συνέπεια η εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Η πρόσδεση είτε του ενός ή και των δύο συνδετών μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Η επίδραση στα κύτταρα με μια οξυστερόλη ή με 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ επάγει την έκφραση του ABCA1, αλλά ο συνδυασμός τους έχει αξιοσημείωτα συνεργατικά αποτελέσματα (40, 76). Ο υποκινητής του γονιδίου LXRα περιέχει ένα στοιχείο LXRE υποδηλώνοντας ότι ο LXRα θα μπορούσε να ρυθμίσει την ίδια του την έκφραση (80, 81). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξυπηρετήσει την ενίσχυση της επίδρασης των στερολών στον ABCA1.

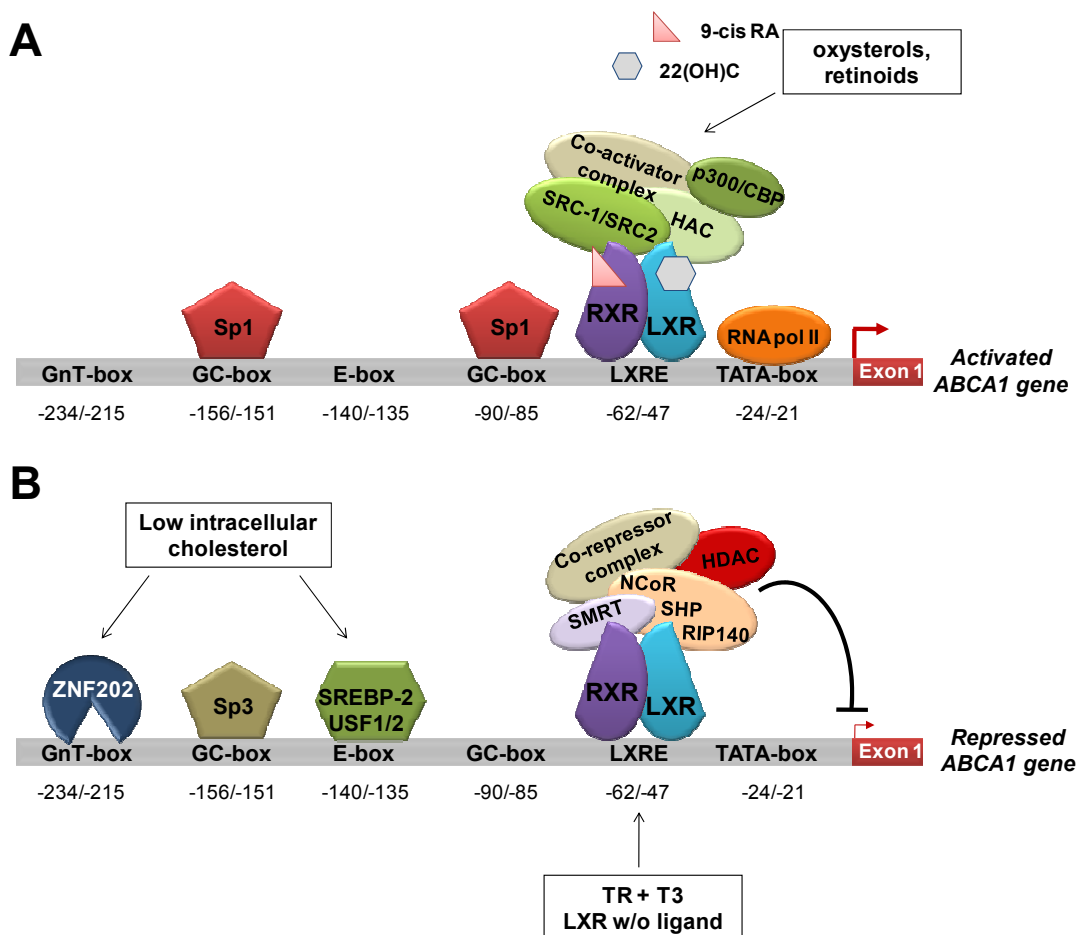
Μεταβολίτες λιπιδίων εκτός των στερολών μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου ABCA1 μέσω του συστήματος LXR. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δρουν ως ανταγωνιστές στην ενεργοποίηση του LXRα από τις οξυστερόλες και κατά συνέπεια είναι πιθανό να μειώνουν την ενεργοποίηση του γονιδίου ABCA1 (82). Το GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate), ένα προϊόν του μεταβολισμού στο μονοπάτι του μεβαλονικού το οποίο ισοπρενυλιώνει πρωτεΐνες, έχει δειχθεί να καταστέλλει την επαγόμενη από τον LXR επαγωγή του γονιδίου ABCA1 με δύο μηχανισμούς: δρώντας ως ανταγωνιστής της αλληλεπίδρασης του LXR με τον πυρηνικό συνενεργοποιητή SRC-1 και ως ενεργοποιητής των Rho GTPασών (83). Ο δεύτερος μηχανισμός πιθανόν αλλάζει την κυκλοφορία των στερολών μέσα στα κύτταρα, μειώνοντας τη διαθεσιμότητά τους ως συνδέτες του LXR.

Ο υποδοχέας της θυροειδούς ορμόνης (TR, thyroid hormone receptor) έχει αναφερθεί να καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 με το σχηματισμό ετεροδιμερών με τον RXR τα οποία ανταγωνίζονται τα ετεροδιμερή LXR/RXR για την πρόσδεση στο ίδιο στοιχείο στο DNA (LXRE) (84).

Ρετινοειδή

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η βιταμίνη A και τα παράγωγά της (ρετινοειδή) επηρεάζουν το μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης καθώς και τις αντιαθηροσκληρωτικές διαδικασίες με το να περιορίζουν την οξειδωση των σωματιδίων της LDL και να ελέγχουν την έκφραση των μεταφορέων ABC που προστατεύουν από το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων (85, 86). Μετά την πρόσληψη της βιταμίνης A από τα κύτταρα, η ρετινόλη μετατρέπεται στα ρετινοειδή, all-*trans* ρετινοϊκό όξύ (ATRA) και 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ (9-*cis* RA). Τα ρετινοειδή μπορούν να πετυχαίνουν τις βιολογικές τους δράσεις με την πρόσδεση υψηλής συγγένειας σε πυρηνικούς υποδοχείς (87). Οι υποδοχείς retinoic-X-receptors (RXR) ενεργοποιούνται κυρίως από 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ, ενώ οι retinoid-acid-receptors

(RAR) μπορούν να δεσμεύουν και 9-*cis* RA και ATRA (88). Μετά από ενεργοποίηση, οι δύο υποδοχείς είναι ικανοί να προσδεθούν σε στοιχεία απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (RARE). Ο υποκινητής του γονιδίου ABCA1 έχει δείχθει ότι μπορεί να προσδένει ετεροδιμερή RAR/RXR στο στοιχείο DR-4 πιθανώς παρακάμπτοντας μηχανισμούς που εξαρτώνται από τον LXR. Εκτός από το ABCA1, τα ρετινοειδή ενεργοποιούν και άλλα γονίδια που είναι σημαντικά για την εκροή των λιπιδίων, όπως τα ABCG1, CYP27A1, LXRα και APOE. Την ίδια στιγμή όμως είναι πιθανό να ενεργοποιούν και μηχανισμούς που ενισχύουν την πρόσληψη και αποθήκευση λιπιδίων στα μακροφάγα.



Εικόνα 9: Οι κύριοι θετικοί (A) και αρνητικοί (B) ρυθμιστές της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 του ανθρώπου. [προσαρμογή από (89)]

PPAR

Οι υποδοχείς PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) είναι πυρηνικοί υποδοχείς που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης και ενεργοποιούνται από παράγωγα των λιπαρών οξέων και συνθετικούς αγωνιστές

(90). Οι PPAR α και PPAR γ έχουν κλινική σημασία γιατί μεσολαβούν στη δράση των φιβρατών (fibrates) στη μείωση των λιπιδίων και στις αντιδιαβητικές ενέργειες των thiazolidinediones, αντίστοιχα. Και οι τρεις πρωτεΐνες PPAR α , PPAR β/δ και PPAR γ σχηματίζουν υποχρεωτικά ετεροδιμερή με τον υποδοχέα RXR και βρίσκονται στους κύριους κυτταρικούς τύπους των αθηρωματικών πλακών, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λείων μυϊκών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, και των λεμφοκυττάρων (90). Οι PPARs έχουν δειχθεί να έχουν τόσο αθηρογενετικές όσο και αντι-αθηρογενετικές δράσεις. Στις αντιαθηρογενετικές δράσεις περιλαμβάνεται η ενίσχυση της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης με τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων ABCA1 και ABCG1 (91-99).

SREBP-2

Επιπρόσθετα της επαγωγής από τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες και οξυστερόλες στα μακροφάγα και άλλους τύπους κυττάρων, η έκφραση του γονιδίου ABCA1 επάγεται από την LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (100). Επειδή τα κύτταρα αυτά εκτίθενται συνεχώς σε λιποπρωτεΐνες που βρίσκονται στην κυκλοφορία, η έκφραση του ABCA1 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα (100). Η καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων σε θρεπτικό χωρίς ορό (δηλ. απουσία λιποπρωτεϊνών) μειώνει σημαντικά το mRNA του ABCA1, αποδεικνύοντας ότι η έλλειψη χοληστερόλης από τα κύτταρα μπορεί να καταστείλει την έκφραση του ABCA1 (101). Η πρωτεΐνη SREBP-2 (sterol-regulatory element binding protein 2) συνδέει την πρόσληψη στερολών, τη βιοσύνθεση και την εκρόη χοληστερόλης. Ο SREBP-2 είναι ένας κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού της χοληστερόλης και η ενεργότητά του καταστέλεται από υψηλά επίπεδα ορού ή χοληστερόλης (102). Αντίστροφα, η έλλειψη ορού στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιεί τον SREBP-2, ο οποίος προκαλεί αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα της LDL και μείωση στην ενεργότητα του ABCA1 (101). Στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 υπάρχει ένα στοιχείο E-box (στη θέση -140/-135) στο οποίο ο SREBP-2 προσδένεται απευθείας (Εικόνα 9).

Sp1, USF, ZNF202

Στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 υπάρχουν δύο μοτίβα GnC (-156/-151 και -90/-85) στα οποία προσδένονται οι πρωτεΐνες Sp1 και Sp3 οι οποίες διαθέτουν δάκτυλους ψευδαργύρου (103). Η πρωτεΐνη Sp3 ανταγωνίζεται την Sp1 για την πρόσδεση στη θέση -156/-151 και λειτουργεί ως

καταστολέας (Εικόνα 9). Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Sp1 αύξησε το mRNA του ABCA1 στα κύτταρα HeLa και ενίσχυσε την εκροή της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων στα μακροφάγα RAW 246.7.

Το E-box που βρίσκεται στη θέση -140/-135 έχει δειχθεί *in vitro* ότι αποτελεί στοιχείο πρόσδεσης για τους παράγοντες USF1/2 (upstream regulatory factors), Fra2 και HNF-1α (hepatic nuclear factor 1α) (103-105). Η μεταλλαξιγένεση αυτού του στοιχείου ενίσχυσε τη βασική έκφραση του ABCA1 υποδηλώνοντας ότι η θέση αυτή παίζει ρόλο στην αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου.

Ένας σημαντικός παράγοντας για την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων ABCA1 και ABCG1 είναι ο ZNF202 (zinc finger gene 202). Ο ZNF202 προσδένεται στη θέση -234/-215 (Εικόνα 9) στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και καταστέλει την ενεργότητά του με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα HepG2 (106). Επίσης, ο ZNF202 καταστέλει σχεδόν πλήρως την επαγωγή του ABCA1 από οξυστερόλες και κατά συνέπεια την εκροή χοληστερόλης στα μακροφάγα RAW 246.7.

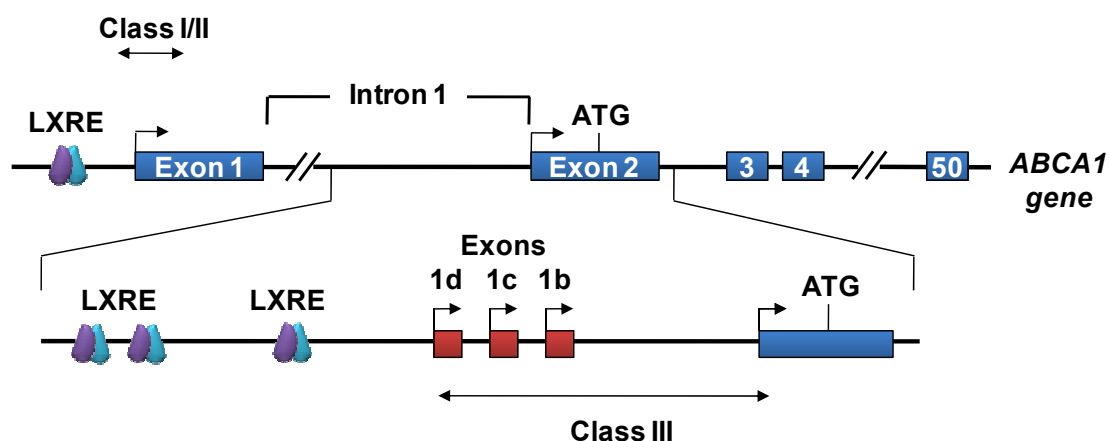
Σύμπλοκα συνενεργοποιητών/συγκатаστολέων

Η ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 είναι περίπλοκη και οι πυρηνικοί υποδοχείς που εμπλέκονται στην ομοίωση των λιπιδίων απαιτούν τη στρατολόγηση συνενεργοποιητών ή συγκатаστολέων (Εικόνα 9) (107). Γενικά, η εξαρτώμενη από τους συνδέτες ανταλλαγή συνενεργοποιητών στη θέση συγκатаστολέων μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας βασικός μηχανισμός για τη μετάβαση από την καταστολή στην ενεργοποίηση του γονιδίου (108). Οι συνενεργοποιητές είναι ικανοί να στρατολογήσουν τη βασική μεταγραφική μηχανή και ακετυλάσες ιστονών (HAT), οδηγώντας σε άνοιγμα της χρωματίνης και ενεργοποίηση των υποκινητών, ενώ οι συγκатаστολείς αναστέλουν τη μεταγραφή μέσω απακετυλασών των ιστονών (HDACs) και μεθυλοτρανσφερασών (109). Κατά την πρόσδεση των συνδετών, τα σύμπλοκα LXR/RXR προσδένονται στο στοιχείο DR-4 και στρατολογούν αρκετούς συνενεργοποιητές και ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1, συμπεριλαμβανομένων των SRC1 (steroid receptor coactivator), SRC2, p300 και CBP (CREB-binding protein), οι οποίοι στη συνέχεια ενεργοποιούν ισχυρά τη μεταγραφή και προκαλούν ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 (110, 111). Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η βασική ενεργότητα του ABCA1 αυξήθηκε σε μακροφάγα και στο έντερο ποντικών LXR^{-/-} (111). Πράγματι, ο LXR απουσία του συνδέτη του είναι ικανός να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και να προκαλεί καταστολή αλληλεπιδρώντας με τους συγκатаστολείς N-CoR (nuclear receptor corepressor), SMRT (silencing mediator of

retinoic acid and thyroid hormone receptors), RIP140 (receptor interacting protein 140) και SHP (small heterodimer partner) (112, 113).

Εναλλακτικά μετάγραφα και εναλλακτικοί υποκινητές

Η περίπλοκη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 περιλαμβάνει επίσης τη χρήση εναλλακτικών μεταγράφων. Η ανάλυση του mRNA σε διάφορους ιστούς και κυτταρικές σειρές ανέδειξε τη χρήση πολλαπλών σημείων έναρξης της μεταγραφής (40, 114-116). Τα μετάγραφα που έχουν περιγραφεί χρησιμοποιούν αλληλουχίες ανοδικά του πρώτου εξονίου (τάξεις 1 και 2) αλλά και την περιοχή του πρώτου ιντρονίου (τάξη 3). Σε όλες τις περιπτώσεις η πρωτεΐνη που παράγεται είναι η ίδια καθώς τα μετάγραφα συνεχίζουν στο εξόνιο 2 όπου και βρίσκεται το σημείο έναρξης της μετάφρασης (Εικόνα 10). Τα μετάγραφα της τάξης 2 είναι τα κυρίαρχα στους περισσότερους ιστούς ενώ τα μετάγραφα της τάξης 3 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στο ήπαρ και τους πνεύμονες όπου αποτελούν περίπου το 30% των συνολικών μεταγράφων (115).



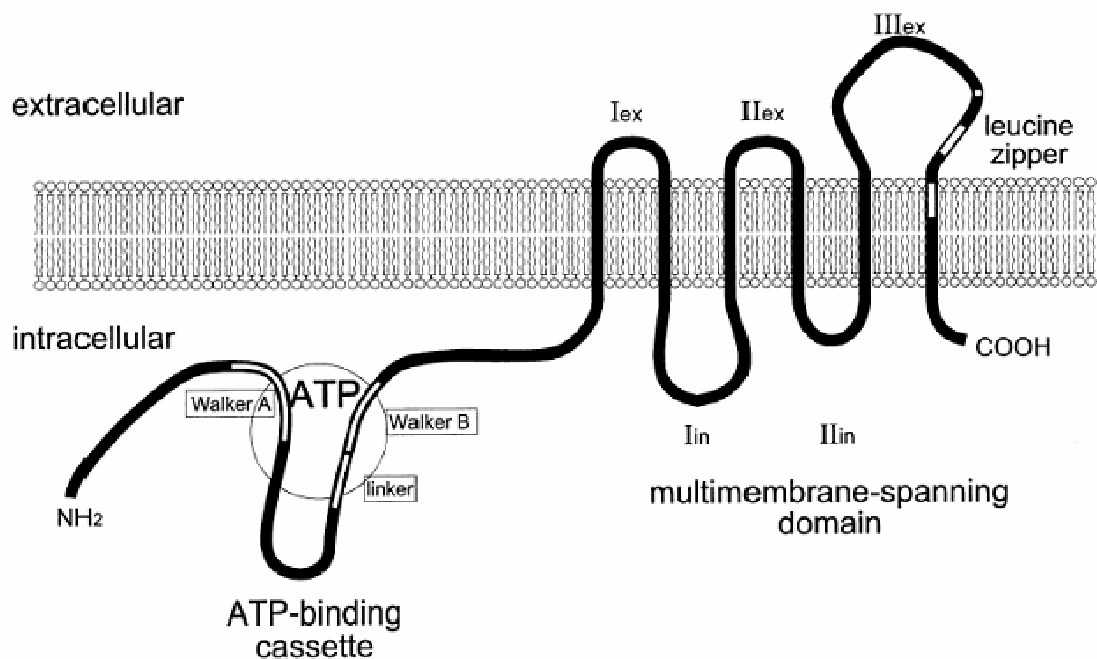
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου ABCA1. Παρουσιάζονται οι διαφορετικές τάξεις μεταγράφων (I, II, III) και τα ρυθμιστικά στοιχεία LXRE.

Οι Hayden et al. χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια (BAC) τα οποία περιελάμβαναν αλληλουχία ~13kb ανοδικά του δεύτερου εξονίου και όχι το πρώτο εξόνιο, έδειξαν ότι το πρώτο ιντρόνιο περιέχει τρία στοιχεία LXRE και είναι ένας λειτουργικός υποκινητής *in vivo* συνεισφέροντας στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 και στην αύξηση της HDL (114). Επιπλέον, χαρακτήρισαν τρία νέα μετάγραφα που ξεκινούν από διαφορετικά σημεία έναρξης της μεταγραφής (εξόνια 1b, 1c, 1d). Στη συνέχεια, εξετάσαν την έκφραση των μεταγράφων σε διάφορους ιστούς (117).

Βρήκαν ότι το ήπαρ περιέχει και τα τρία μετάγραφα, με τα 1b και 1d να είναι σε μεγαλύτερη αφθονία. Και τα τρία μετάγραφα ανιχνεύθηκαν επίσης στα μακροφάγα. Ωστόσο, όταν στα ποντίκια χορηγήθηκε διαίτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, το μετάγραφο από το εξόνιο 1b αυξήθηκε δραματικά στα μακροφάγα αλλά δεν έδειξε καμιά αλλαγή στο ήπαρ. Αντίθετα, το μετάγραφο από το εξόνιο 1d αυξήθηκε στο ήπαρ αλλά όχι στα μακροφάγα. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με άλλες μελέτες που δείχνουν ότι τα ποντίκια (BAC) εμφανίζουν σημαντική αύξηση στην πρωτεΐνη ABCA1 στο ήπαρ και τα μακροφάγα όταν ταΐστούν με πολλά λιπαρά (48). Η αύξηση του μεταγράφου 1b στα μακροφάγα και του 1d στο ήπαρ, μπορεί να ευθύνονται για την προστασία από τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και για την αύξηση της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα, αντίστοιχα. Επομένως, στο γονίδιο ABCA1 η χρήση εναλλακτικών υποκινητών μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση και να δημιουργήσει επιπλέον ευελιξία καθώς οι διαφορετικές τάξεις μεταγράφων βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο διαφορετικών στοιχείων υποκινητή.

Ο μεταφορέας ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1)

Ο μεταφορέας ABCG1 είναι μέλος της ίδιας υπεροικογένειας με τον ABCA1 αλλά ανήκει στους λεγόμενους «μισούς» μεταφορείς καθώς αποτελείται μόνο από μια περιοχή δέσμευσης ATP στο αμινοτελικό άκρο που ακολουθείται από έξι διαμεμβρανικές περιοχές (Εικόνα 11) (118). Όμοια με τον ABCA1 μεταφορέα και ο ABCG1 συμβάλλει στην εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην προστασία από την αθηροσκλήρωση (Εικόνα 1). Σε αντίθεση όμως με τον ABCA1, αποδέκτες της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων δεν είναι η φτωχή σε λιπίδια apoA-I αλλά τα σωματίδια HDL₂ και HDL₃ (Εικόνες 4, 7) (119).

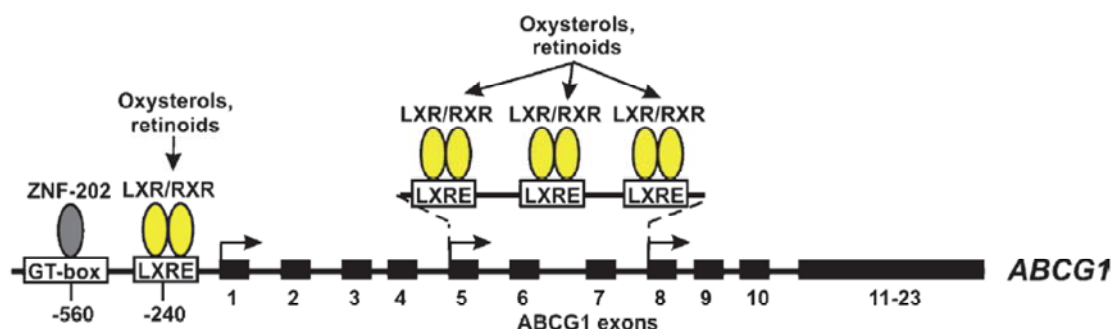


Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μεταφορέα ABCG1. [πηγή: αναφορά (118)]

Μεταγραφική ρύθμιση

Το mRNA του γονιδίου ABCG1 παρουσιάζει μέτρια και υψηλά επίπεδα έκφρασης στα μακροφάγα, τη σπλήνα, τους πνεύμονες, το θύμο αδέν, τον πλακούντα, τον εγκέφαλο, και χαμηλότερα επίπεδα στους περισσότερους άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος (46, 120). Το ανθρώπινο γονίδιο ABCG1 εκφράζεται από πολλαπλούς υποκινητές από τους οποίους προκύπτουν εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με διαφορετικά αμινοτελικά άκρα (Εικόνα 12) (118, 121, 122). Όμοια με τον ABCA1, το ABCG1 στα μακροφάγα ρυθμίζεται από το φορτίο της χοληστερόλης (123, 124). Τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά στοιχεία LXRE έχουν χαρακτηριστεί στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1: ένα LXRE είναι στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 ανοδικά του εξονίου 1 και τρία είναι στην περιοχή ανάμεσα στα εξόνια 5 και 8 (122, 125). Σε όλα αυτά τα LXREs προσδένονται ετεροδιμερή LXR/RXR και προσδίδουν συνεργατική ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου ABCG1 από ρετινοειδή και οξυστερόλες (122, 125). Ένα από αυτά τα LXREs (ανοδικά του εξονίου 1) έχει δειχθεί να μεσολαβεί στην αναστολή της έκφρασης του γονιδίου ABCG1 από ακόρεστα λιπαρά οξέα. Φαίνεται ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα επεμβαίνουν στη μεταγραφή του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 από τα ετεροδιμερή LXR/RXR παρουσία ρετινοειδών και οξυστερολών (126). Ο υποκινητής του γονιδίου ABCG1 περιέχει επαναλήψεις GhT, οι οποίες λειτουργούν ως θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα ZNF202 ο

οποίος διαθέτει δάκτυλο ψευδαργύρου και είναι καταστολέας της μεταγραφής του γονιδίου ABCG1 στα κύτταρα HepG2 (106).



Εικόνα 12: Ρυθμιστικά στοιχεία και παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ABCG1. [πηγή: Kardassis et al. 2007 in High-Density Lipoproteins. From Basic Biology to Clinical Aspects, CJ Fielding Editor, WILEY-VCH, pp237-265]

Οι πυρηνικοί υποδοχείς LXR

Οι LXRs είναι μέλη της υπερικογενείας των πυρηνικών υποδοχέων η οποία περιλαμβάνει αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούνται από συνδέτες. Οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν μια υψηλά συντηρημένη δομή αποτελούμενοι από μια αμινοτελική περιοχή η λειτουργία της οποίας δεν εξαρτάται από το συνδέτη (AF1, activation function 1), μια περιοχή για πρόσδεση στο DNA με δάκτυλους ψευδαργύρου, μια καρβοξυτελική περιοχή στην οποία προσδένεται ο συνδέτης (LBD, ligand binding domain) και μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής εξαρτώμενης από το συνδέτη (AF2, activation function 2) (127, 128). Οι LXRs ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων με το να προσδένονται ως υποχρεωτικά ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος (RXR) σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA γνωστές ως LXREs (LXR responsive elements) που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (129).

Κάτω από βασικές συνθήκες και απουσία της ενεργοποίησης από συνδέτες, το ετεροδιμερές LXR/RXR καταστέλλει ενεργά τη μεταγραφή ενός πλήθους γονιδίων-στόχων μέσα από αλληλεπιδράσεις με σύμπλοκα συγκαταστολέων, όπως οι NCoR SMRT (Εικόνα 9). Η δέσμευση του συνδέτη επάγει μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης η οποία οδηγεί στη στρατολόγηση συνενεργοποιητών, όπως ο SRC-1, ο GRIP-1 (μέλος της οικογένειας p160), ή ο PGC-1α [peroxisome-proliferator-activated (PPAR)γ coactivator 1α] και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Υπάρχουν δύο ισότυποι LXR, οι LXRα και LXRβ. Ο LXRα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, και σε χαμηλότερα επίπεδα στο έντερο, τα μακροφάγα, το λιπώδη ιστό, τους πνεύμονες, τα επινεφρίδια και τα νεφρά, ενώ ο LXRβ εκφράζεται παντού (130). Παρόλο που οι LXRα και LXRβ έχουν πολύ όμοια δομή και εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλό βαθμό ομολογίας στη θέση πρόσδεσης του συνδέτη (LBD), ο εντοπισμός τους και η διατήρηση στον πυρήνα καθώς και η λειτουργία τους εμφανίζουν διαφορές (131).

Συνδέτες των LXR

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (σελ.16), τα οξειδωμένα παράγωγα της χοληστερόλης (οξυστερόλες) ενεργοποιούν τους LXRs, με τους πιο δυνατούς ενεργοποιητές να είναι η 22(R)-υδροξυστερόλη, η 20(S)-υδροξυστερόλη, η 24(S),25-εποξυστερόλη, και η 27-υδροξυστερόλη που παράγονται φυσικά (132, 133). Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι αυτές οι οξυστερόλες ενεργοποιούν τους LXRs σε συγκεντρώσεις όμοιες με αυτές που συναντώνται σε εκχυλίσματα ιστών (48, 78). Επιπλέον, κάποιες οξυστερόλες όπως η 27-υδροξυστερόλη, μπορεί να είναι συνδέτες του LXR σε συγκεκριμένα κύτταρα (79, 134) ενώ κάποιες άλλες οξυστερόλες μπορεί να έχουν εξειδίκευση ως προς το γονίδιο-στόχο *in vivo* (135).

Οι περισσότεροι ενδογενείς συνδέτες του LXR που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα ενεργοποιούν και τον LXRα και τον LXRβ. Ωστόσο, η 24(S),25-διεποξυστερόλη είναι ένας συνδέτης σχετικά ειδικός για τον LXRα, υποδηλώνοντας ότι είναι εφικτή η ανάπτυξη συνδέτων με εξειδίκευση ως προς τον υπότυπο των LXR για φαρμακολογικές εφαρμογές (78). Επιπρόσθετα, τα φυσικά και συνθετικά 6α-υδροξυχολικά οξέα είναι πιο εξειδικευμένοι ενεργοποιητές του LXRα από τον LXRβ (136).

Εκτός από τους φυσικούς συνδέτες, έχουν αναπτυχθεί και συνθετικοί συνδέτες των LXRs. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι διπτοί αγωνιστές που ενεργοποιούν και τον LXRα και τον LXRβ, και εμφανίζουν θετικές επιδράσεις στο μεταβολισμό της χοληστερόλης αλλά και ανεπιθύμητες δράσεις στο μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων. Από πειράματα σε ποντίκια έχει δειχθεί ότι η ειδική ενεργοποίηση του LXRα ή του LXRβ μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα *in vivo* (137). Η υπάρχουσα υπόθεση υποστηρίζει ότι ένας ειδικός αγωνιστής για τον LXRβ θα αυξήσει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα και τα επίπεδα έκφρασης του ABCA1 στα μακροφάγα (επάγοντας και την εκροή χοληστερόλης), χωρίς να προκαλέσει συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ.

Δύο μη στεροειδείς συνθετικοί αγωνιστές, ο TO901317 και ο GW3965, διαφέρουν δομικά και παρουσιάζουν διαφορές στις βιολογικές τους δράσεις. Αν και *in*

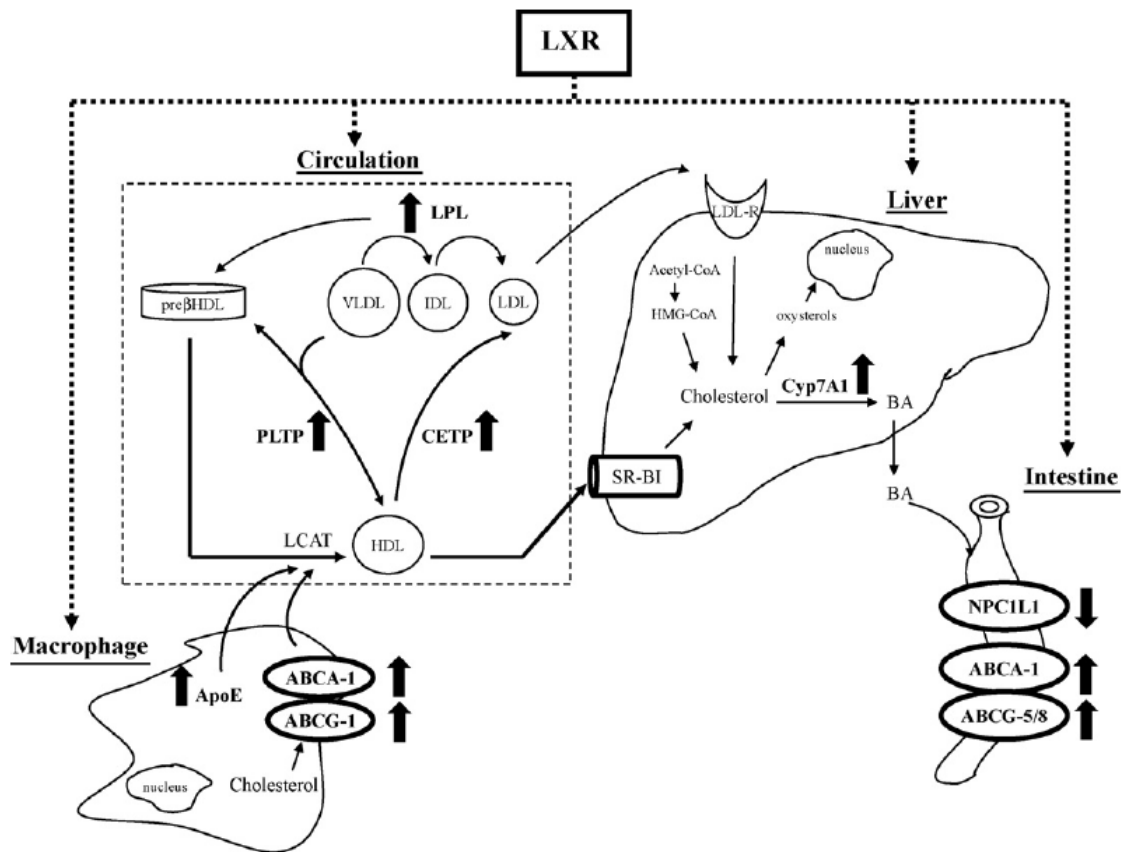
νίνο σε ποντίκια και τα δύο σκευάσματα αυξάνουν την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, οι δράσεις τους στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων διαφέρουν. Κατά συνέπεια, ενώ και οι δύο συνδέτες όταν χορηγηθούν σε ποντίκια αυξάνουν τα επίπεδα της HDL, μόνο ο TO901317 προκαλεί στεάτωση (138). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι και ο GW3965 οδηγεί σε αύξηση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (134). Η διαφορετική δράση των δύο συνθετικών αγωνιστών μπορεί να οφείλεται στη στρατολόγηση διαφορετικών συνενεργοποιητών (138).

Οι LXRs ως αισθητήρες του μεταβολισμού των λιπιδίων

Ομοιόσταση της χοληστερόλης

Παρόλο που η χοληστερόλη είναι ένα απαραίτητο συστατικό των μεμβρανών του κυττάρου καθώς και υπόστρωμα για τη σύνθεση χολικών οξέων και στεροειδών ορμονών, η περίσσεια χοληστερόλης στο κύτταρο μπορεί να είναι τοξική και να οδηγήσει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και των επακόλουθων καρδιαγγειακών ασθενειών. Για το λόγο αυτό ο έλεγχος της ομοιόστασης της χοληστερόλης έχει ιδιαίτερη σημασία.

Οι LXRs διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ομοιόστασης της χοληστερόλης με τη συντονισμένη δράση τους (1) στην απορρόφηση της χοληστερόλης της τροφής μέσω του εντέρου, (2) στη βιοσύνθεση και την πρόσληψη της χοληστερόλης από το ήπαρ, (3) στη σύνθεση των σωματιδίων της HDL και την αναδόμησή της, ρυθμίζοντας την επακόλουθη ενεργότητα στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, (4) στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από το σώμα με τη ρύθμιση, τουλάχιστον στα τρωκτικά, της μετατροπής της σε χολικά οξέα και την απέκκριση της χοληστερόλης στη χολή (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ο ρόλος του LXR στην ομοίωση της χοληστερόλης. Ο LXR παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοίωσης της χοληστερόλης μέσω συντονισμένων δράσεων στην απορρόφηση της χοληστερόλης στο έντερο με την επαγωγή των μεταφορέων ABCG5 και ABCG8 και την καταστολή του NPC1L1, στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης με απευθείας δράση στα γονίδια που εμπλέκονται στην ωρίμανση της HDL (ABCA1 και ABCG1) στα μακροφάγα και την επαγωγή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αναδόμηση της HDL (apoE, PLTP, LPL, CETP), και τελικά στην απέκκριση της χοληστερόλης από το ήπαρ επάγοντας την αποβολή της στη χολή με την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου Cyp7A1. PLTP, phospholipid transfer protein· LPL, lipoprotein lipase· CETP, cholesterol ester transfer protein. [πηγή: αναφορά (139)]

Απορρόφηση της χοληστερόλης από την τροφή

Έχει δείχθει ότι αγωνιστές του LXRα αναστέλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο στα ποντίκια (140). Δύο μεταφορείς στερολών της οικογένειας των ABC, οι ABCG5 και ABCG8, οι οποίοι εντοπίζονται στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων του εντέρου, έχουν δείχθει ότι αποτελούν στόχο του LXR, αν και ο ρόλος τους στη μειωμένη απορρόφηση της χοληστερόλης δεν είναι ξεκάθαρος (141).

Η πρωτεΐνη Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στη λαχνοειδή πλευρά των εντεροκυττάρων στο λεπτό έντερο και αποτελεί το μοριακό στόχο του αναστολέα της απορρόφησης ezitimibe. Έχει αποδειχθεί ότι ο NPC1L1 είναι ο μεταφορέας της χοληστερόλης της τροφής στο έντερο (142) και ότι η έκφραση του μειώνεται από τον LXR (143).

Βιοσύνθεση και πρόσληψη της χοληστερόλης από το ήπαρ

Το ήπαρ αποτελεί έναν από τους κύριους ιστούς στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, ένα σημείο-κλειδί για τη βιοσύνθεση και την αποικοδόμηση της χοληστερόλης. Επιπλέον το ήπαρ προσλαμβάνει χοληστερόλη από την LDL στο πλάσμα μέσω του υποδοχέα της, LDLR. Ο LXR έχει δειχθεί ότι μπορεί να δράσει ως αναστολέας της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης με το να καταστέλλει απευθείας τη δράση των ενζύμων CYP51A1 (lanosterol 14a-demethylase) και της squalene synthase (144). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του LXRα επάγει την έκφραση του υποδοχέα LDLR σε κύτταρα ηπατοβλαστώματος (145).

Αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Ένα αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης είναι ότι σε καθένα από τα ξεχωριστά στάδια εμπλέκονται μόρια που αποτελούν απευθείας στόχους των μεταγραφικών παραγόντων LXR (liver X receptor) / RXR (retinoid X receptor) (146, 147). Η ενεργοποίηση των LXRs από τη συσσώρευση συγκεκριμένων οξυστερολών στα κύτταρα, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου μοριακού μηχανισμού που έχει αναπτυχθεί για να διευκολύνει την απομάκρυνση της χοληστερόλης από το σώμα.

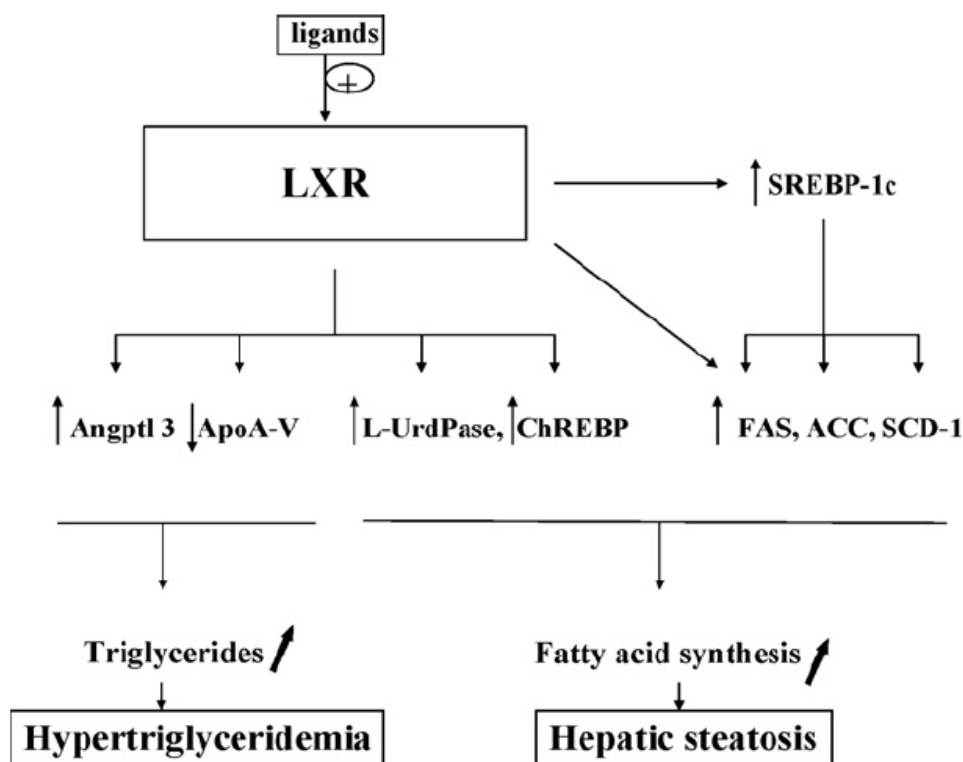
Οι LXRs ελέγχουν την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης με αρκετούς μηχανισμούς. Καταρχήν, οι LXRs ενεργοποιούν την κινητοποίηση της χοληστερόλης από τις ενδοκυττάρια δεξαμενές προς την πλασματική μεμβράνη και κατά συνέπεια αυξάνουν τη διαθεσιμότητά της για εκροή προς τους εξωκυττάρια αποδέκτες (148, 149). Σε αυτό το πρώτο βήμα, οι LXRs έχουν καθοριστικό ρόλο καθώς ενεργοποιούν την έκφραση του μεταφορέα ABCA1 ο οποίος προωθεί την εκροή χοληστερόλης προς τις φτωχές σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνες apoA-I και apoE (56). Επίσης, αρκετές λιποπρωτεΐνες και ένζυμα αναδιαμόρφωσης των λιπιδίων αποτελούν μεταγραφικούς στόχους των LXRs. Πράγματι, οι LXRs επάγουν την έκφραση της apoE στα μακροφάγα του ποντικού, όλα τα γονίδια του συμπλόκου apoC-I/apoC-IV/apoC-II στα

μακροφάγα του ανθρώπου και του ποντικού (150) και της apoA-IV στο ήπαρ του ποντικού και στην ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 (151). Επιπρόσθετα, οι LXRs ενεργοποιούν το ένζυμο PLTP (phospholipid transfer protein) το οποίο καταλύει την ανταλλαγή φωσφολιπιδίων μεταξύ των σωματιδίων της HDL και των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα HDL και σε αυξημένο μέγεθος των σωματιδίων της HDL (152, 153). Ωστόσο, οι LXRs ενεργοποιούν και το ένζυμο CETP (cholesterol ester transfer protein), το οποίο διευκολύνει τη μεταφορά εστέρων της χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων μεταξύ της HDL και των σωματιδίων που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη apoB και παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τα επίπεδα της HDL. Η έκφραση του ενζύμου LPL (lipoprotein lipase) επίσης ενεργοποιείται από τους LXRs στο ήπαρ και τα μακροφάγα για να καταλύσει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των λιποπρωτεϊνών που εμπλέκεται στην ωρίμανση της HDL (154).

Εκτός από την επαγωγή του ABCA1, οι LXRs επάγουν την έκφραση δύο άλλων μεταφορέων ABC, των ABCG1 και ABCG4, οι οποίοι μεσολαβούν την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα προς την HDL (42). Ο ABCG1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα μακροφάγα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ποντίκια με έλλειψη του LXR που υποβλήθηκαν σε δίαιτα με χαμηλά λιπαρά εμφάνισαν σημαντική συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα της σπλήνας, τους πνεύμονες και το αρτηριακό τοίχωμα, ταυτόχρονα με μειωμένη έκφραση του ABCA1 στο ήπαρ (155).

Μεταβολισμός των λιπαρών οξέων

Εκτός από το ρόλο των LXRs στην ομοίωση της χοληστερόλης, η ενεργοποίηση των LXRs αυξάνει την έκφραση γονιδίων της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων (λιπογένεση), και αυξάνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα (υπερτριγλυκεριδαιμία) (156, 157) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Ο ρόλος του LXR στο μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων. Μετά από την ενεργοποίησή του, ο LXR επάγει την έκφραση ηπατικών γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (SREBP-1c, FAS, ACC, SCD1, ChREBP και πιθανότατα L-UrdPase) και καταστέλει γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων (Angptl1, apoA-V), οδηγώντας σε ηπατική στεάτωση και υπερτριγλυκεριδαιμία. FAS, fatty acid synthase · ACC, acetyl-coA carboxylase · SCD1, stearyl-coenzyme A desaturase 1 · ChREBP, carbohydrate response element binding protein. [πηγή: αναφορά (139)]

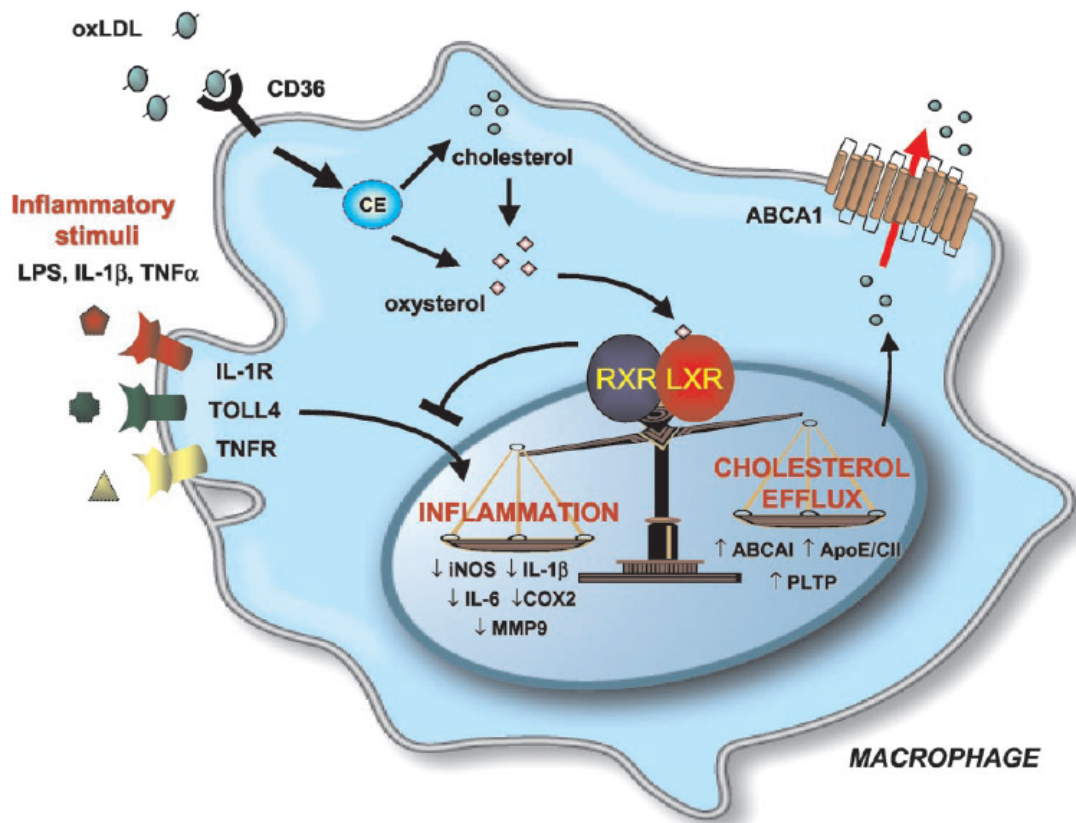
Σοβαρή στεάτωση του ήπατος αναπτύσσεται σε ποντίκια μετά χορήγηση αγωνιστών LXR, και πολλές μελέτες ερμηνεύουν αυτό το αποτέλεσμα ως απευθείας επαγωγή του SREBP-1c, την κύρια ισομορφή SREBP-1 στο ήπαρ, ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων της λιπογένεσης όπως τα FAS (fatty acid synthase), ACC (acetyl-coA carboxylase) και SCD1 (stearyl-coenzyme A desaturase 1) (ενός ενζύμου που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των μονοακόρεστων λιπαρών) (156, 158-161).

Εκτός από τη στεάτωση του ήπατος, έχει αναφερθεί ότι η φαρμακολογική ενεργοποίηση του LXR στα ποντίκια οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα (156) και προάγει την έκκριση της VLDL (very low-density lipoprotein) (157).

Η επαγωγή της λιπογένεσης εμποδίζει την ανάπτυξη των αγωνιστών των LXRs ως θεραπευτικά μέσα, και απαιτείται μια εις βάθος κατανόηση των διαφορετικών ρόλων των δύο υποτύπων (LXRα και LXRβ) σε αυτή τη διαδικασία προκειμένου να σχεδιαστούν βελτιωμένα εξειδικευμένα μόρια.

Η δράση των LXR στην φλεγμονή

Η αθηροσκλήρωση θεωρείται πλέον τόσο μια χρόνια φλεγμονώδης ασθένεια όσο και μια διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων. Οι LXR, επιπρόσθετα της ρύθμισης του μεταβολισμού της χοληστερόλης, έχουν αναδειχθεί ως ρυθμιστές γονιδίων της φλεγμονής. Η ενεργοποίηση των LXR ανταγωνίζεται την έκφραση γονιδίων της φλεγμονής στα σηματοδοτικά μονοπάτια των TLR4 (Toll-like receptor 4), IL-1 β και TNF- α (162, 163). Τα φλεγμονώδη γονίδια που καταστέλλονται από τους LXR περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια-στόχους του NF- κ B, όπως iNOS (inducible nitric oxide synthase), IL-6 (interleukin-6), MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9), κυκλοξυγενάση 1 (COX-1), CCL2 (CC-chemokine ligand 2), CCL7, IL-1 β . Αντίστροφα, η ενεργοποίηση είτε του TLR3 ή του TLR4 αναστέλλει τη λειτουργία των LXR στην ομοιοστάση της χοληστερόλης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα IRF-3 (interferon-regulatory factor 3), υποδηλώνοντας ότι οι LXR ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ των φλεγμονωδών και των μεταβολικών μονοπατιών (Εικόνα 15).

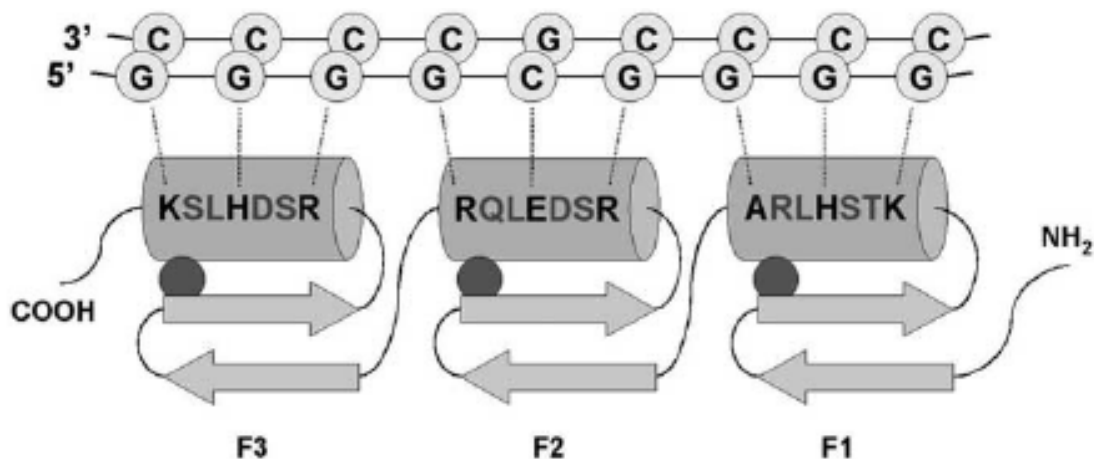


Εικόνα 15: Το μονοπάτι σηματοδότησης του LXR στα μακροφάγα εμπλέκεται τόσο στην επαγωγή του μεταβολισμού των λιπιδίων και στην εκροή της χοληστερόλης όσο και στην καταστολή των γονιδίων της φλεγμονής. [πηγή: αναφορά (147)]

Sp1

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 (specificity protein 1) είναι ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας του τύπου C₂H₂ (C: Cysteine, H: histidine) με δακτύλους ψευδαργύρου που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε από κύτταρα θηλαστικών (164). Ο Sp1 προσδένεται σε στοιχεία GC (GC-boxes) με την ομόφωνη αλληλουχία 5'-G/T-**GGGCGG**-G/A-G/A-C/T-3' ή 5'-G/T-G/A-**GGCG**-G/T-G/A-C/T-3' (165). Προδένεται επίσης σε στοιχεία GT (GT-boxes), αλλά με σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια. Για παράδειγμα, το στοιχείο GT 5'-GGGG**A**GGGGC-3' και το στοιχείο GT 5'-GGGG**I**GGGGC-3' προσδένονται τρεις ή έξι φορές πιο ασθενικά, αντίστοιχα, σε σχέση με το στοιχείο GC (5'-GGGG**C**GGGGC-3') (166).

Ο Sp1 είναι μέλος της οικογένειας Sp/KLF (Krüppel-like factor) και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Τα μέλη της οικογένειας Sp/KLF μοιράζονται μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) (με ταυτότητα στην αλληλουχία μεγαλύτερη από 65%) με τρεις γειτονικούς δακτύλους ψευδαργύρου του τύπου C₂H₂ ώστε να προσδένονται σε GC- και/ή GT-boxes με επικαλυπτόμενη ειδικότητα και συγγένεια (167-173) (Εικόνα 16). Κατά συνέπεια δεν επαρκεί η γνώση της έκφρασης μόνο του Sp1 γιατί το τελικό αποτέλεσμα καθορίζεται από την τρέχουσα αναλογία της έκφρασης και της ενεργότητας του Sp1 προς την έκφραση και την ενεργότητα άλλων μελών της οικογένειας Sp/KLF.

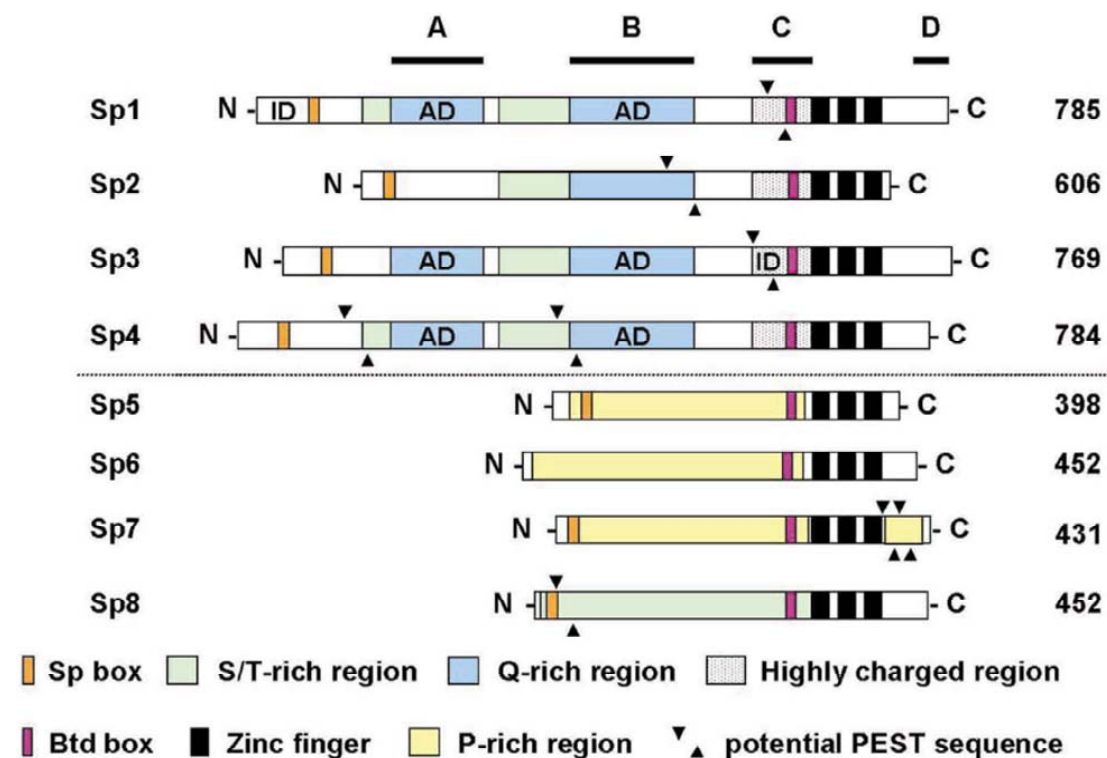


Εικόνα 16: Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου των μεταγραφικών παραγόντων Sp/KLF. Ο κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου (F1, F2, F3) παριστάνεται ως μια β-πτυχωτή επιφάνεια (τόξα) και μια α-έλικα (κύλινδρος) που συγκροτούνται μαζί από ένα ιόν ψευδαργύρου (σκούρα γκρι σφαίρα). Το DNA με την κλασική θέση πρόσδεσης GC (5' GGGGCGGGG 3') φαίνεται στο πάνω μέρος. [πηγή: αναφορά (174)]

Η οικογένεια Sp/KLF υποδιαιρείται στην οικογένεια Sp, η οποία δείχνει προτίμηση για τα στοιχεία GC, και την οικογένεια KLF, η οποία προτιμά τα στοιχεία GT και περιλαμβάνει ενεργοποιητές αλλά και καταστολείς (167, 171). Ωστόσο, τουλάχιστον τρία μέλη της οικογένειας KLF οι KLF9, KLF10 και KLF11, έχουν ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA πολύ όμοια, αν όχι πανομοιότυπη, με τον Sp1 ώστε να αναγνωρίζουν και αυτοί τα κλασικά στοιχεία GC (168, 169, 175).

Η οικογένεια Sp

Η οικογένεια Sp υποδιαιρείται στους Sp1-4 και Sp5-9, ανάλογα με το αν περιέχουν ή όχι αμινοτελικές περιοχές ενεργοποίησης (ADs, activation domains) πλούσιες σε γλουταμίνες, αντίστοιχα (Εικόνα 17) (174).



Εικόνα 17: Δομικά μοτίβα στους παράγοντες Sp. Δείχνονται τα στοιχεία Sp και Btd (Buttonhead), οι περιοχές που είναι σε σερίνες/θρεονίνες (S/T), σε γλουταμίνες (Q) και σε φορτισμένα αμινοξέα, οι περιοχές ενεργοποίησης (AD), και οι περιοχές καταστολής (ID). [πηγή: αναφορά (174)]

Δομικά χαρακτηριστικά των παραγόντων Sp

Οι Sp1, Sp3 και Sp4 περιέχουν δύο πλούσιες σε γλουταμίνη περιοχές (A και B) που είναι απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Δίπλα σε αυτές τις

περιοχές βρίσκονται περιοχές πλούσιες σε σερίνες και θρεονίνες, οι οποίες μπορεί να αποτελούν στόχο για μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Ο παράγοντας Sp2 έχει μόνο μία πλούσια σε γλουταμίνες περιοχή αλλά μοιάζει με τους άλλους παράγοντες όσον αφορά στη φορτισμένη περιοχή C και σε μια περιοχή πλούσια σε σερίνες/θρεονίνες. Ο Sp2 έχει διαφορετική περιοχή πρόσδεσης λόγω μιας αντικατάστασης ενός κρίσιμου καταλοίπου ιστιδίνης από λευκίνη στον πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου (176).

Όλοι οι παράγοντες Sp περιέχουν την αποκαλούμενη Buttonhead περιοχή (Btd) αμινοτελικά των δακτύλων ψευδαργύρου (177). Αυτή η συντηρημένη ακολουθία από 11 κατάλοιπα αμινοξέων αναγνωρίστηκε αρχικά στην ομόλογη πρωτεΐνη του Sp1 στη Δροσόφιλα, Buttonhead (Btd). Η περιοχή αυτή μπορεί να συνεισφέρει στην μεταγραφική ικανότητα των παραγόντων (178).

Η ακολουθία συντηρημένων αμινοξέων SPLALLAATCSR/KI (Sp box) εντοπίζεται στο αμινοτελικό τμήμα των πρωτεϊνών. Το στοιχείο αυτό περιέχει μια θέση ενδοπρωτεολυτικής κοπής και είναι τοποθετημένο στο αμινοτελικό άκρο του Sp1 το οποίο κατευθύνει την αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος *in vitro* (179). Παρόλο που δεν απαιτείται για την απευθείας κοπή, το γεγονός ότι το στοιχείο Sp είναι υψηλά συντηρημένο υποδηλώνει ότι μπορεί να έχει ρόλο στη ρύθμιση της πρωτεόλυσης των παραγόντων Sp. Ένας άλλος πιθανός ρόλος είναι η ρύθμιση του δυναμικού της μεταγραφής μέσω της αλληλεπίδρασης με καταστολέα (180).

Ο Sp1 μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή από κοντινούς υποκινητές αλλά και από μακρινούς ενισχυτές (181). Πειράματα *in vitro* υποδηλώνουν ότι τετραμερή του Sp1 εμπλέκονται στη συνεργατική ενεργοποίηση μέσω απομακρυσμένων θέσεων πρόσδεσης παρακάμπτοντας την ενδιάμεση περιοχή του DNA (182). Για τη δημιουργία των πολυμερών συμπλόκων, η περιοχή ενεργοποίησης B είναι μεγάλης σημασίας (183). Μαζί με την περιοχή A, η περιοχή B μεσολαβεί στην υπερενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων από τον Sp1 η οποία στην περίπτωση πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης μπορεί να επιτευχθεί από μεταλλάγματα του Sp1 που δεν έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA (181). Για τη συνεργατική ενεργοποίηση μέσω της πρόσδεσης σε πολλαπλά στοιχεία DNA απαιτείται η περιοχή D καθώς και οι δύο περιοχές ενεργοποίησης A και B (183).

Sp1 και Sp3

Οι Sp1 και Sp3 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και επιδεικνύουν πολύ όμοια αν όχι ταυτόσημη ειδικότητα και συγγένεια πρόσδεσης στο DNA με αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στα ίδια GC-, CT- και GT-στοιχεία (184). Επομένως η αναλογία Sp1: Sp3 παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση

με το αποτέλεσμα να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και την αρχιτεκτονική του υποκινητή, η οποία καθορίζει την ξεχωριστή συμπεριφορά του Sp3 (185). Σε κάποιους υποκινητές, ο Sp3 συνεργάζεται με τον Sp1 ενώ σε άλλους υποκινητές ο Sp3 καταστέλλει τη μεταγραφή που μεσολαβείται από τον Sp1. Με παρόμοιο τρόπο, οι υποκινητές διαφέρουν ως προς τη δυνατότητα του Sp3 να αντικαταστήσει τον Sp1. Επιπρόσθετα, υπάρχουν πολλές ισομορφές του Sp3 αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης (186).

Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις

Κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης έχει η επικοινωνία με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Και οι δύο περιοχές ενεργοποίησης A και B του Sp1 αλληλεπιδρούν με τους TBP/TFIID και TAF4 (187, 188). Η στρατολόγηση του TBP/TFIID από τον Sp1 εξηγεί την ικανότητα του Sp1 να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων από τα οποία απουσιάζει το TATA-box. Επιπλέον, το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CRSP (cofactor required for Sp1) προάγει τη μεταγραφή μέσω του Sp1. Το CRSP λειτουργεί σε συνδυασμό με τους TBP-συνδεδεμένους παράγοντες και περιέχει υπομονάδες και πολυπεπτίδια που μοιράζονται με άλλα σύμπλοκα συμπαραγόντων (189).

Το αμινοτελικό άκρο του Sp1 έχει ανασταλτικό ρόλο και καταστέλλει την ενεργοποίηση μέσω των περιοχών A και B (180). Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, η περιοχή ID αλληλεπιδρά απευθείας με τους συγκαταστολείς SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptor), NCoR (nuclear hormone receptor corepressor) και BCoR (BCL-6 interacting corepressor) (190).

Ο Sp1 αλληλεπιδρά επίσης απευθείας με τον p300 που λειτουργεί ως συνενεργοποιητής των περιοχών A και B και απαιτείται για την ενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων *p21* και *12(S)-λιποξυγενάσης*. Ο συνενεργοποιητής CBP/p300 είναι ακετυλοτρανσφεράση (HAT) και η δράση του ενεργοποιείται από τον Sp1 (191).

Επιπλέον, ο Sp1 στρατολογεί το ATP-εξαρτώμενο σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF (192, 193). Ο Sp1 προσδένεται απευθείας στις υπομονάδες του συμπλόκου SWI/SNF BAF155, BAF170 και BRG1 (Brahma-related gene 1). Ωστόσο, ο Sp1 δεν εμπλέκεται μόνο στην ενεργοποίηση των γονιδίων αλλά και στην αρνητική τους ρύθμιση με το να προσδένεται απευθείας στην απεκετυλάση ιστονών 1 (HDAC1, histone deacetylase 1) και στην μεθυλοτρανσφεράση 1 (DNMT1, DNA methyltransferase) (194, 195).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Ο Sp1 υπόκειται σε αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης, την πρόσδεση στο DNA ή το δυναμικό της ενεργοποίησης του Sp1. Τέτοιες τροποποιήσεις περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση (196, 197), ακετυλίωση από τον p300 (198), γλυκοζυλίωση (O-GlcNAc) (199, 200), ουμπικουτινίωση (201), σουμοϋλίωση (201) και πολυριβοζυλίωση από την PARP-1 (202).

SREBP

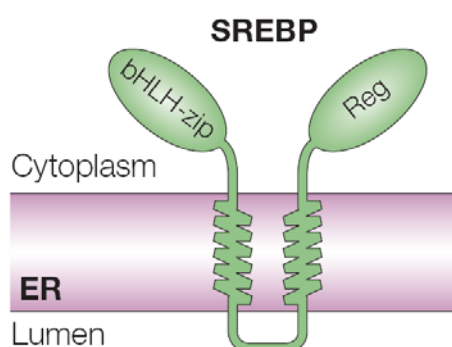
Η ρύθμιση του τελικού προϊόντος στο μεταβολισμό της χοληστερόλης επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αναστολής της μεταγραφής γονιδίων που ελέγχουν τη σύνθεση και την πρόσληψη της χοληστερόλης. Ωστόσο, στη λειτουργία της χοληστερόλης ως καταστολέα της μεταγραφής προκύπτει ένα ειδικό πρόβλημα, καθώς η χοληστερόλη είναι ένα αδιάλυτο λιπίδιο που εντοπίζεται αποκλειστικά στις μεμβράνες του κυττάρου. Το κύτταρο επομένως, πρέπει να αντιλαμβάνεται τα επίπεδα λιπιδίων που βρίσκονται βυθισμένα στη μεμβράνη και η πληροφορία αυτή να μεταδίδεται στον πυρήνα για να ρυθμίζεται η μεταγραφή. Η ομοιόσταση των λιπιδίων στα κύτταρα των θηλαστικών ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των SREBP μεταγραφικών παραγόντων (sterol regulatory element-binding proteins) που εντοπίζονται στη μεμβράνη και προσδένονται σε ρυθμιστικά στοιχεία στερολών (SREs, sterol regulatory elements) (203).

Δύο γονίδια – τρεις πρωτεΐνες

Το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί για τρεις ισομορφές των SREBPs, που ονομάζονται SREBP-1a, SREBP-1c και SREBP-2. Η πρωτεΐνη SREBP-2 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 22q13. Τόσο ο SREBP-1a όσο και ο SREBP-1c προέρχονται από ένα και μόνο γονίδιο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 17p11.2 με τη χρήση εναλλακτικών σημείων έναρξης της μεταγραφής τα οποία παράγουν εναλλακτικές μορφές του πρώτου εξονίου, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως 1a και 1c (203, 204). Τα mRNAs των ανθρώπινων SREBP-1a και SREBP-1c μπορούν επίσης να υποστούν εναλλακτική συναρμογή στο 3' άκρο και να παράγουν πρωτεΐνες που διαφέρουν στα τελευταία 113 αμινοξέα (205, 206).

Δομή των SREBP πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες SREBP ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων bHLH (basic helix-loop-helix) με φερμουάρ λευκίνης (bHLH-Zip) αλλά διαφέρουν από τις άλλες πρωτεΐνες bHLH-Zip στο ότι συντίθενται ως ανενεργές πρόδρομες μορφές (~120kDa) προσδεδεμένες στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου ή του πυρηνικού φακέλου (203, 207). Κάθε πρόδρομη μορφή των SREBPs αποτελείται από περίπου 1150 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις περιοχές: (α) μια αμινοτελική περιοχή περίπου 480 αμινοξέων η οποία περιλαμβάνει την περιοχή bHLH-Zip για πρόσδεση στο DNA και διμερισμό, (β) δύο υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα που διαχωρίζονται από μια μικρή υδρόφιλη θηλιά η οποία εντοπίζεται μέσα στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου, και (γ) μια καρβοξυτελική περιοχή περίπου 590 αμινοξέων η οποία παίζει ρυθμιστικό ρόλο. Η πρόδρομη πρωτεΐνη έχει τη μορφή φουρκέτας (εικόνα 18) με αποτέλεσμα τόσο η αμινοτελική περιοχή όσο και η καρβοξυτελική να βρίσκονται προς το κυτταρόπλασμα (208).



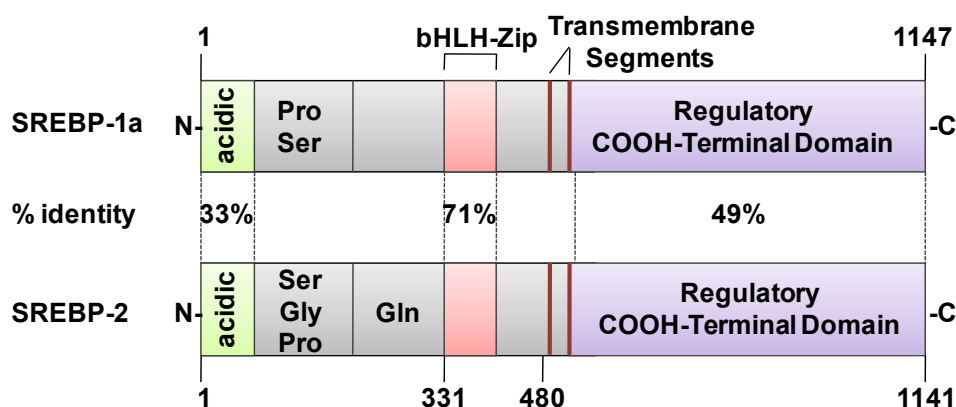
Εικόνα 18: Δομή των πρωτεϊνών SREBP. Κάθε πρωτεΐνη SREBP έχει τη μορφή φουρκέτας, αποτελούμενη από την αμινοτελική bHLH-Zip περιοχή, τα δύο διαμεμβρανικά τμήματα και την καρβοξυτελική ρυθμιστική (Reg) περιοχή. ER, ενδοπλασματικό δίκτυο. [πηγή: αναφορά (209)]

Η αμινοτελική περιοχή των SREBP είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής

Οι πρωτεΐνες SREBP-1 και SREBP-2 έχουν 47% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία (Εικόνα 19). Η αμινοτελική περιοχή των ~480 αμινοξέων κάθε πρωτεΐνης SREBP είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας bHLH-Zip. Το τμήμα αυτό ξεκινά με μια όξινη περιοχή όμοια με αυτή άλλων μεταγραφικών ενεργοποιητών. Όταν η περιοχή αυτή αφαιρεθεί, οι πρωτεΐνες διατηρούν την ικανότητά τους να προσδένονται στα αντίστοιχα στοιχεία του DNA, αλλά χάνουν την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή, και μετατρέπονται σε καταστολείς της μεταγραφής (210). Η αμινοτελική όξινη περιοχή του ανθρώπινου SREBP-1a αποτελείται από 42 αμινοξέα, 12 από τα οποία είναι όξινα. Στην πρωτεΐνη SREBP-2, η περιοχή αυτή περιλαμβάνει 48 αμινοξέα, από τα οποία 14 είναι όξινα, ενώ στην πρωτεΐνη SREBP-1c περιλαμβάνει μόνο 6 όξινα αμινοξέα. Η πιο μικρή όξινη περιοχή του SREBP-1c είναι αποτέλεσμα

της χρήσης του εναλλακτικού πρώτου εξονίου το οποίο περιλαμβάνει μικρότερη κωδική περιοχή και καθιστά τον SREBP-1c πιο αδύναμο ενεργοποιητή της μεταγραφής σε σύγκριση με τον SREBP-1a ή τον SREBP-2 (211).

Η όξινη αμινοτελική αλληλουχία στις πρωτεΐνες SREBPs ακολουθείται από μια περιοχή που είναι πλούσια σε σερίνες και προλίνες στον SREBP-1 και από μια περιοχή που είναι σε σερίνες, προλίνες και γλυκίνες στον SREBP-2. Επιπλέον, στην πρωτεΐνη SREBP-2, αλλά όχι στην SREBP-1, η περιοχή αυτή ακολουθείται από μια άλλη περιοχή ~120 αμινοξέων που είναι πολύ πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης (Εικόνα 19) (212). Οι περιοχές αυτές ακολουθούνται από μια κλασική αλληλουχία bHLH-Zip η οποία μεσολαβεί το διμερισμό και την πρόσδεση στο DNA (210).



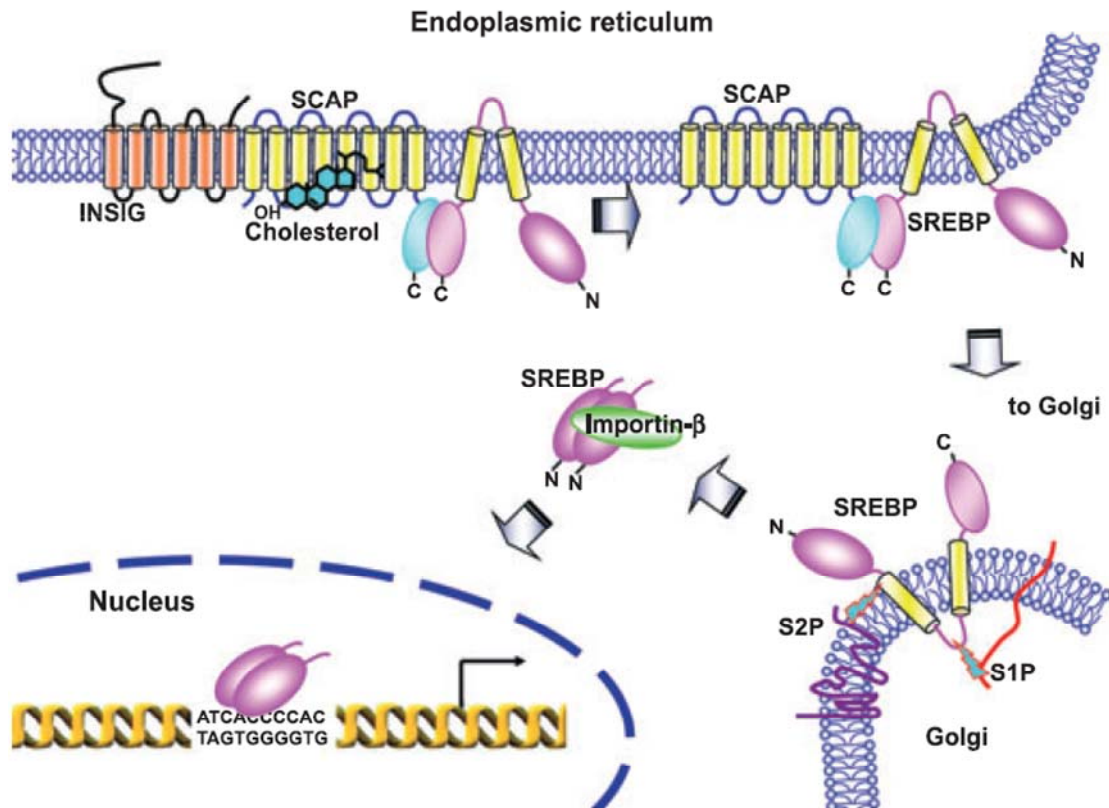
Εικόνα 19: Δομή των ανθρώπινων πρωτεϊνών SREBP-1a και SREBP-2. Η δομή του SREBP-1c είναι ακριβώς ίδια με αυτή του SREBP-1a εκτός από τη μικρότερη όξινη αμινοτελική περιοχή. [πηγή: αναφορά (203)]

Πρωτεολυτικός καταρράκτης ενεργοποίησης των SREBP

Προκειμένου να επιδράσουν στη μεταγραφή, η αμινοτελική περιοχή των SREBPs πρέπει να απελευθερωθεί από τη μεμβράνη προκειμένου να εισέλθει στον πυρήνα. Η απελευθέρωση αυτή πραγματοποιείται με δύο διαδοχικά βήματα πρωτεόλυσης τα οποία ρυθμίζονται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα στερολών (Εικόνα 20).

Οι πρωτεΐνες SREBPs εντοπίζονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου συνδέονται με μια άλλη μεμβρανική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, τη SCAP (SREBP cleavage-activating protein). Η αμινοτελική περιοχή της SCAP έχει οκτώ διαμεμβρανικές έλικες, οι οποίες περιλαμβάνουν τη λεγόμενη «περιοχή-αισθητήρα της χοληστερόλης» (SSD, sterol sensing domain). Η

καρβοξυτελική περιοχή της SCAP περιλαμβάνει πέντε επαναλήψεις WD, οι οποίες είναι αλληλουχίες των περίπου 40 αμινοξέων που συναντώνται σε πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Το τμήμα WD είναι η περιοχή της SCAP η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με το καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών SREBPs (213). Παρουσία στερολών, το σύμπλοκο SCAP-SREBP συγκρατείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της περιοχής-αισθητήρα της χοληστερόλης (SSD) της SCAP με τις επίσης μεμβρανικές πρωτεΐνες Insig-1 ή Insig-2. Αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύεται από τη χοληστερόλη (στην περίπτωση της Insig-1), ή είναι απόλυτα εξαρτημένη από τη χοληστερόλη (στην περίπτωση της Insig-2) (214, 215). Όταν τα κύτταρα στερούνται χοληστερόλης, τα σύμπλοκα SCAP-SREBP μετακινούνται μέσα σε κυστίδια COPII (216, 217) από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi, όπου βρίσκονται οι δύο πρωτεάσες, S1P (site 1 protease) και S2P (site 2 protease). Στο σύστημα Golgi, η S1P, μια μεμβρανική πρωτεάση σερίνης, κόβει τις SREBPs από τη μεριά της κοιλότητας μεταξύ των δύο διαμεμβρανικών περιοχών τους. Κατόπιν, το αμινοτελικό τμήμα απελευθερώνεται από τη μεμβράνη με τη δράση της S2P, μιας μεμβρανικής μεταλλοπρωτεάσης ψευδαργύρου. Στο κυτταρόπλασμα, οι αμινοτελικές μορφές των SREBPs αλληλεπιδρούν με την importin-β, μια πρωτεΐνη-συνοδό των πυρηνικών πρωτεϊνών, και κατόπιν, μεταφέρονται στον πυρήνα (218). Για την αλληλεπίδραση με την importin-β απαιτείται ο διμερισμός των SREBPs μέσω της περιοχής του φερμουάρ λευκίνης (219). Στον πυρήνα, οι πρωτεΐνες SREBPs αποκολλώνται από την importin-β, και η μεταγραφική τους ενεργότητα ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση με μια ποικιλία πυρηνικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων οι μεταγραφικοί παράγοντες Sp1 και NF-Υ (220-223).



Εικόνα 20: Ο πρωτεολυτικός καταρράκτης ενεργοποίησης των πρωτεϊνών SREBP. Ο μηχανισμός περιγράφεται στο κείμενο. [πηγή: αναφορά (224)]

Η ρύθμιση της διαδικασίας της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης από τα επίπεδα στερολών δεν ισχύει για όλες τις ισομορφές SREBP καθώς και άλλοι παράγοντες, όπως η ινσουλίνη, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεόλυσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η ελάτωση των στερολών δε ρυθμίζει την κοπή της ισομορφής SREBP-1c (225).

Στοιχεία απόκρισης στις στερόλες (SREs)

Οι βασικές περιοχές των bHLH-Zip πρωτεϊνών προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται E-boxes και είναι αντίστροφες επαναλήψεις της αλληλουχίας 5'-CANNTG-3'. Παρόλο που οι πρωτεΐνες SREBP μπορούν να αναγνωρίζουν κανονικά E-boxes *in vitro*, στον πυρήνα προσδένονται σε άμεσες (direct) επαναλήψεις του τύπου 5'-PyCAPγ-3' (226), όπως για παράδειγμα στον υποδοχέα της LDL όπου η θέση πρόσδεσης είναι 5'-ATCACCCCAC-3' (205). Όπως έδειξαν οι μελέτες από τους Kim et al. (227), η ικανότητα των SREBPs να αναγνωρίζουν μια άμεση, αντί για μια αντεστραμμένη επανάληψη οφείλεται σε μια τυροσίνη η οποία αντικαθιστά μια αργινίνη που βρίσκεται σε όλες τις άλλες bHLH-Zip πρωτεΐνες.

Λειτουργία της κάθε ισομορφής SREBP *in vivo*

Οι SREBP-1a και SREBP-2 είναι οι κυρίαρχες ισομορφές των SREBPs στις περισσότερες κυτταρικές σειρές, ενώ οι SREBP-1c και SREBP-2 κυριαρχούν στο ήπαρ και τους άλλους ιστούς (204). Ο SREBP-1a είναι πολύ ισχυρός ενεργοποιητής όλων των γονιδίων που αποκρίνονται στις στερόλες, συμπεριλαμβανομένων αυτών που συμμετέχουν στη σύνθεση της χοληστερόλης, των λιπαρών οξέων και των τριγλυκεριδίων. Ο ρόλος των SREBP-1c και SREBP-2 είναι πιο περιορισμένος και σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, ο SREBP-1c ευνοεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι των λιπαρών οξέων ενώ ο SREBP-2 την παραγωγή χοληστερόλης (203). Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν τις πυρηνικές (ώριμες) μορφές των SREBPs (nSREBPs) στο ήπαρ έχει δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια-στόχους της κάθε ισομορφής.

Η ισομορφή SREBP-1a εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ των ενήλικων ποντικών, αρουραίων, χοιριδίων και ανθρώπων (204). Τα διαγονιδιακά ποντίκια nSREBP-1a που υπερεκφράζουν την πυρηνική μορφή της SREBP-1a αναπτύσσουν λιπαρό ήπαρ γεμάτο από χοληστερόλη και τριγλυκερίδια (228) και εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και ακόμη πιο δραματική αύξηση των γονιδίων που ελέγχουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Πίνακας 1). Η προτίμηση στην ενεργοποίηση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων (αύξηση κατά 26-φορές) σε σχέση με τη σύνθεση της χοληστερόλης (αύξηση κατά 5 φορές) εξηγεί τη μεγαλύτερη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (229).

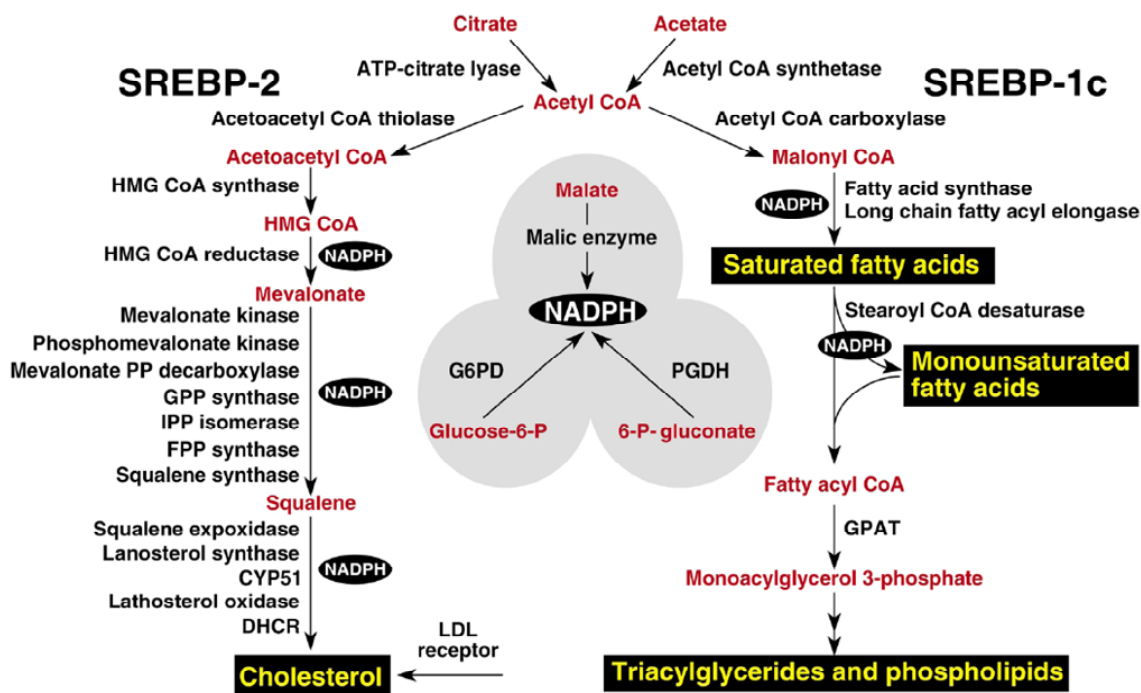
Genetic manipulation	Amount of nSREBPs	Expression of target genes			Lipid synthesis		Liver content		Plasma levels	
		HMGCR	FAS	LDLR	Chol	FA	Chol	TG	chol	TG
Fold difference relative to values in wild-type mice										
Transgenic mice										
SREBP-1a	↑ 1a	↑ 37	↑ 20	↑ 6	↑ 5	↑ 26	↑ 6	↑ 22	↓ 0.7	↓ 0.4
SREBP-1c	↑ 1c	n.c.	↑ 4	n.c.	n.c.	↑ 4	n.c.	↑ 4	n.c.	↓ 0.6
SREBP-2	↑ 2	↑ 75	↑ 15	↑ 6	↑ 28	↑ 4	↑ 3	↑ 4	n.c.	↓ 0.5

Πίνακας 1: Αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τις πυρηνικές μορφές των SREBPs (nSREBP). HMGCR, HMG-CoA reductase· FAS, fatty acid synthase· LDLR, LDL receptor· Chol, cholesterol· TG, triglycerides· n.c., no change [πηγή: αναφορά (229)]

Η υπερέκφραση του nSREBP-1c στο ήπαρ των διαγονιδιακών ποντικών δημιουργεί λιπαρό ήπαρ εμπλουτισμένο σε τριγλυκερίδια αλλά δεν αυξάνει την χοληστερόλη (211). Τα mRNAs των ενζύμων για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και οι ρυθμοί σύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι αυξημένοι κατά τέσσερις φορές στον ιστό αυτό, ενώ τα mRNAs των ενζύμων για τη σύνθεση της χοληστερόλης και ο ρυθμός σύνθεσης της χοληστερόλης δεν αυξάνονται (Πίνακας 1) (230).

Αντίθετα, η υπερέκφραση του nSREBP-2 στο ήπαρ αυξάνει τα mRNAs που κωδικοποιούν για όλα τα γονίδια των ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, με πιο δραματική την αύξηση κατά 75 φορές του mRNA της HMGR (HMG-CoA reductase) (231). Τα mRNAs για τα ένζυμα της σύνθεσης των λιπαρών οξέων αυξάνονται σε μικρότερο βαθμό, σε συμφωνία με την *in vivo* παρατήρηση ότι ο ρυθμός σύνθεσης της χοληστερόλης αυξάνεται κατά 28 φορές στο ήπαρ των διαγονιδιακών ποντικών nSREBP-2, ενώ η σύνθεση των λιπαρών οξέων αυξάνεται μόνο τέσσερις φορές.

Στην εικόνα 21, παρουσιάζονται τα γονίδια-στόχοι των SREBPs στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, ενώ πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι οι SREBPs ενισχύουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη παραγωγή του NADPH, ενός υποχρεωτικού συμπαραγόντα για τη σύνθεση των λιπιδίων.



Εικόνα 21: Γονίδια που ρυθμίζονται από τους SREBPs. Το διάγραμμα δείχνει τα κύρια ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού στα μονοπάτια για τη σύνθεση της χοληστερόλης, των λιπαρών οξέων, των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων. *In vivo*, ο SREBP-2 ενεργοποιεί κατά προτίμηση γονίδια του μεταβολισμού της χοληστερόλης, ενώ ο SREBP-1c ενεργοποιεί κατά προτίμηση γονίδια του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων. DHCR, 7-dehydrocholesterol reductase· FPP, farnesyl diphosphate· GPP, geranylgeranyl pyrophosphate synthase· CYP51, lanosterol 14 α -demethylase· G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase· PGDH, 6-phosphogluconate dehydrogenase· GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase. [πηγή: αναφορά (229)]

Ρύθμιση των SREBPs

Η ρύθμιση των SREBPs λαμβάνει χώρα σε δύο επίπεδα – μεταγραφικά και μεταμεταφραστικά (224, 229, 232).

Μεταγραφική ρύθμιση

Η μεταγραφική ρύθμιση των SREBPs είναι αρκετά περίπλοκη. Οι SREBP-1c και SREBP-2 υπόκεινται σε διαφορετικές μορφές μεταγραφικής ρύθμισης, ενώ ο SREBP-1a φαίνεται πως εκφράζεται συνεχώς σε χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ και στους περισσότερους άλλους ιστούς των ενήλικων ζώων (204). Ένας κοινός

μηχανισμός ρύθμισης για τους SREBP-1c και SREBP-2 είναι μέσω των στοιχείων απόκρισης στις στερόλες (SREs) που εντοπίζονται στον ενισχυτή/υποκινητή του κάθε γονιδίου (233, 234). Μέσω του μηχανισμού αυτού, οι nSREBPs ενεργοποιούν την μεταγραφή των ίδιων τους των γονιδίων.

Τρεις παράγοντες ρυθμίζουν αποκλειστικά τη μεταγραφή του SREBP-1c: ο πυρηνικός υποδοχέας LXR (liver X receptor), η ινσουλίνη και το γλυκογόνο. Οι πρώτες ενδείξεις για τη μεταγραφική ρύθμιση του SREBP-1c προήλθαν από μελέτες σε ζώα που υποβάλλονταν σε δίαιτα νηστείας/ταΐσματος, και έδειξαν ότι οι μεταβολές στο καθεστώς διατροφής ρυθμίζουν την έκφραση του SREBP-1c στο ήπαρ (235), το λευκό λιπώδη ιστό (236) και τους σκελετικούς μύες (237, 238). Η έκφραση του SREBP-1c καταστέλλεται κατά τη διάρκεια νηστείας αλλά αυξάνεται εντυπωσιακά όταν στα ζώα χορηγείται πάλι δίαιτα με αυξημένους υδατάνθρακες. Αντίθετα, τέτοιοι χειρισμοί είχαν μόνο μικρό αντίκτυπο στην έκφραση των υπολοίπων ισομορφών SREBP. Επακόλουθες μελέτες σε απομονωμένα λιποκύτταρα (236) και ηπατοκύτταρα (239) έδειξαν ότι η μεταγραφή του SREBP-1c επάγεται από την ινσουλίνη. Αυτή η επαγωγή της μεταγραφής του SREBP-1c οδηγεί σε μια παράλληλη αύξηση τόσο της πρόδρομης μορφής στο ενδοπλασματικό δίκτυο όσο και στην πυρηνική μορφή του μεταγραφικού παράγοντα (240). Με έναν τυπικό μηχανισμό αντιστάθμισης, η δράση του γλυκογόνου μέσω του cAMP αντιτίθεται στην επίδραση της ινσουλίνης στη μεταγραφή του SREBP-1c (241). Οι δράσεις της ινσουλίνης στην έκφραση του SREBP-1c πραγματοποιούνται με τη μεσολάβηση ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από την PI(3) κινάση (240, 242).

Η μεταγραφή του SREBP-1c μπορεί επίσης να ενισχυθεί από την ενεργοποίηση του πυρηνικού υποδοχέα LXRA (liver X receptor). Όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πυρηνικοί υποδοχείς: LXR/RXR – Μεταβολισμός των Λιπαρών οξέων» (σελ.29), ο LXRA είναι ένας ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας που ενεργοποιείται από τις οξυστερόλες, που αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού της χοληστερόλης (78, 160, 243). Ο υποδοχέας LXRA μεσολαβεί στην επαγωγή του SREBP-1c μέσω ενός στοιχείου LXRE στον υποκινητή του γονιδίου SREBP-1c όπου προσδένονται τα ετεροδιμερή LXR/RXR (160). Ζώα από τα οποία απουσιάζει ο LXRA παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των SREBP-1c, FAS (fatty acid synthase), ACC (acetyl-coA carboxylase) και SCD-1 (stearoyl CoA desaturase) (158, 160). Αντίθετα, ζώα στα οποία χορηγείται δίαιτα με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης ή συνθετικοί αγωνιστές του LXR επιδεικνύουν επιλεκτική αύξηση στο mRNA του SREBP-1c και στην πυρηνική πρωτεΐνη, αυξημένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη λιπογένεση και αυξημένους ρυθμούς σύνθεσης λιπαρών οξέων (156, 160, 244). Ο LXRA θεωρείται ότι δρα ως αισθητήρας της χοληστερόλης και σε

συμφωνία με το ρόλο αυτό προτείνεται ότι επάγει τον SREBP-1c προκειμένου να παράγει τα λιπαρά οξέα που απαιτούνται για το σχηματισμό εστέρων της χοληστερόλης, οι οποίοι εξισορροπούν τη συγκέντρωση της ελεύθερης χοληστερόλης (147).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το στοιχείο LXRE είναι απαραίτητο για την επαγωγή του SREBP-1c από την ινσουλίνη (245). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η πλήρης ενεργοποίηση του SREBP-1c από το συνθετικό αγωνιστή του LXR TO901317 λαμβάνει χώρα μόνο παρουσία ινσουλίνης (246). Στην περίπτωση αυτή προτείνεται ότι ο LXR παίζει ρόλο στην προετοιμασία του SREBP-1c με το να επάγει την παραγωγή της πρόδρομης μορφής του ενώ η πρωτεολυτική διαδικασία του SREBP-1c να αναστέλλεται από την επαγωγή της Insig-2. Η ενεργοποίηση του SREBP-1c τελικά λαμβάνει χώρα άμεσα όταν εμφανιστεί η ινσουλίνη. Με τον τρόπο αυτό, η απόκριση των γονιδίων στην ινσουλίνη μέσω του SREBP-1c πραγματοποιείται άμεσα χωρίς την καθυστέρηση των διαδικασιών μεταγραφής-μετάφρασης. Επίσης διασφαλίζεται ότι η λιπογένεση θα λάβει χώρα μόνο όταν υπάρχει αφθονία γλυκόζης.

Μετα-μεταφραστική ρύθμιση

Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση αφορά την καταστολή της πρωτεολυτικής διάσπασης των SREBPs από τις στερόλες, η οποία προκύπτει από την αναστολή της μετακίνησης του συμπλόκου SCAP-SREBP από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi. Η ρύθμιση των SREBPs περιλαμβάνει επίσης ουμπικουϊνίωση, σουμοϋλίωση και φωσφορυλίωση (224).

Στον πυρήνα, οι SREBPs είναι ασταθείς και αποικοδομούνται γρήγορα από το μονοπάτι ουμπικουϊνίνης-πρωτεασώματος (247). Ο γρήγορος καταβολισμός των πυρηνικών SREBPs δεν επηρεάζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα στερολών, και ο χρόνος της ημίσειας ζωής τους υπολογίζεται περίπου στις τρεις ώρες. Παρουσία αναστολέων πρωτεασώματος, οι πυρηνικοί SREBPs σταθεροποιούνται και ενισχύουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Η κινάση GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) φωσφορυλιώνει σε κατάλοιπα σερίνης και/ή θρεονίνης, κοντά στο σημείο ουμπικουϊνίνωσης, τους SREBP-1 και SREBP-2, και ενισχύει την ουμπικουϊνίνωση των SREBPs. Οι SREBPs τροποποιούνται και από μία ακόμη πρωτεΐνη, την SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Η σουμοϋλίωση των μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των SREBPs, τείνει να οδηγεί σε εξασθένηση της μεταγραφικής τους ενεργότητας (248-250). Αντίθετα με την ουμπικουϊνίνωση, η οποία απαιτεί φωσφορυλίωση κοντά στο σημείο ουμπικουϊνίνωσης, η σουμοϋλίωση ανταγωνίζεται με τη φωσφορυλίωση κοντά στο σημείο σουμοϋλίωσης, η οποία συμβαίνει ως απόκριση σε ερεθίσματα αναπτυξιακών

παραγόντων (251). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ερεθίσματα αναπτυξιακών παραγόντων εμπλέκονται στη σουμοϋλίωση και ενισχύουν με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφική ενεργότητα των SREBPs, και τη σύνθεση λιπιδίων που απαιτείται για την ανάπτυξη του κυττάρου. Οι σουμοϋλιωμένοι SREBPs στρατολογούν ένα σύμπλοκο που περιέχει την απακετυλάση των ιστονών 3 για να καταστείλουν τη μεταγραφική τους δραστηριότητα (251).

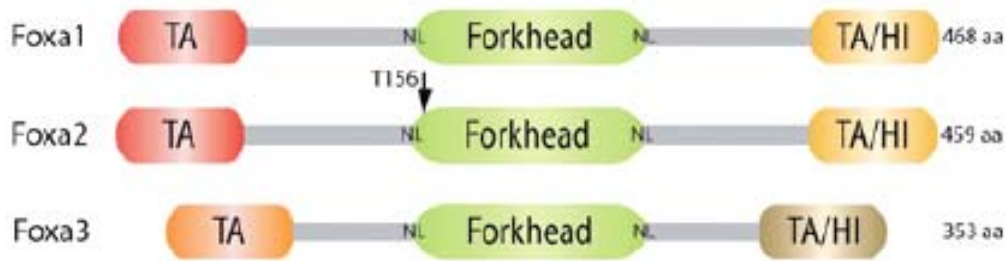
FOXA2

Η πρωτεΐνη FOXA2 ανήκει στην υποοικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων FOXA, που με τη σειρά τους υπάγονται στην ευρύτερη οικογένεια των forkhead box (Fox) παραγόντων. Οι πρωτεΐνες forkhead χαρακτηρίζονται από ένα μοτίβο 110 αμινοξέων το οποίο είναι συντηρημένο από το σακχαρομύκητα μέχρι τον άνθρωπο και λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης στο DNA (252). Περισσότερα από 100 γονίδια έχουν αναγνωρισθεί και κατηγοριοποιηθεί και αρκετά από αυτά φαίνεται να έχουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (253). Η υποοικογένεια μεταγραφικών παραγόντων FOXA των θηλαστικών περιλαμβάνει τους FOXA1, FOXA2 και FOXA3. Οι λειτουργίες των μελών της οικογένειας FOXA διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και στην μετέπειτα ζωή των οργανισμών.

Δομή και λειτουργία

Η οικογένεια των FOXA ανακαλύφθηκε αρχικά σε πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος βάσει της ικανότητάς τους να προσδένονται ειδικά στους υποκινητές των γονιδίων Ttr (transthyretin), Serpina1 (α 1-antitrypsin) και Alb1 (albumin). Για το λόγο αυτό τα γονίδια ονομάστηκαν αρχικά ηπατικός παράγοντας-3 α , -3 β και -3 γ (HNF-3, hepatocyte nuclear factor 3).

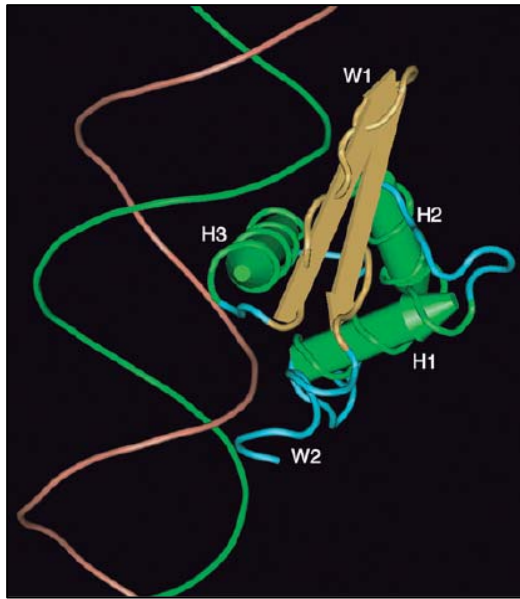
Οι πρωτεΐνες FOXA εκφράζονται σε ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα, όπως το ήπαρ, τα σπλάγχνα και το ενδοκρινές πάγκρεας (254). Η δράση των πρωτεϊνών αυτών είναι σημαντική για το μεταβολισμό και πολλά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και των αμινοξέων διαθέτουν στον υποκινητή τους θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες FOXA (254). Οι πρωτεΐνες FOXA αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις-στόχους στο DNA με την ομόφωνα ακολουθία 5'-T(G/A)TTT(A/G)(C/T)T-3' (255-257).



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών των Foxa1-3. Τα τρία μέλη εμφανίζουν ομοιότητα 95% στο forkhead box, ενώ έξω από αυτό οι Foxa1 και Foxa2 είναι 39% ταυτόσημοι και 51% όμοιοι. Το καρβοξυτελικό άκρο έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H3 και H4 (HI) (258). Μόνο ο Foxa2 έχει θέση φωσφορυλίωσης από AKT2/PKB στη T156. Η αρίθμηση αναφέρεται στις πρωτεΐνες του ποντικού. TA, transactivation domain· HI, histone interaction domain· NL, nuclear localization. [πηγή: αναφορά (259)]

Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών FOXA1-3 στο forkhead box είναι κατά 95% ταυτόσημες και περιβάλλονται από αλληλουχίες απαραίτητες για τον πυρηνικό εντοπισμό (Εικόνα 22). Οι FOXA1-3 μοιράζονται πιο χαμηλή ομολογία έξω από το forkhead box, και η πιο υψηλή ομολογία είναι στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο. Συνολικά, ο FOXA3 εμφανίζεται να έχει τη μικρότερη συγγένεια σε σχέση με τους FOXA1 και FOXA2. Ο FOXA2 είναι μοναδικός στο ότι μόνο αυτός περιέχει μια θέση για φωσφορυλίωση από την AKT2/PKB στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής forkhead.

Η τρισδιάστατη δομή των FOXA περιλαμβάνει τρεις έλικες τοποθετημένες σε διάταξη έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix) στον πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από θηλιές. Η δομή αυτή αναφέρεται και ως winged helix ή forkhead box (Εικόνα 23). Η δομή του forkhead box είναι πολύ όμοια με αυτή της ιστόνης 1 (H1). Η σημασία αυτής της ομοιότητας φαίνεται από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες FOXA είναι σε θέση να «ανοίξουν» την καλά πακεταρισμένη χρωματίνη *in vitro* με τρόπο που δεν απαιτεί το σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF (258). Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες FOXA αποκαλούνται πρωτοπόροι (pioneer) μεταγραφικοί παράγοντες, εκτοπίζοντας τις ιστόνες από τη συμπυκνωμένη χρωματίνη και διευκολύνοντας την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων.



Εικόνα 23: Τριδιάστατη δομή της περιοχής forkhead όπου φαίνεται η αλληλεπίδραση με το DNA. Μέσα στην έλικα 3 (H3) και το wing/loop (W2) πολλαπλά κατάλοιπα κάνουν επαφές με το DNA απευθείας και με τη μεσολάβηση του νερού. Η H3 αλληλεπιδρά με τη μεγάλη αύλακα, ενώ η W2 κάνει επαφές και με τη μεγάλη και με τη μικρή αύλακα. [πηγή: αναφορά (259)]

Έξω από το forkhead box, το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο των FOXA1-3 είναι συντηρημένα και η λειτουργική ανάλυση αυτών των περιοχών στον FOXA2 έδειξε ότι λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές (260).

Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στο μεταβολισμό

Μια συντηρημένη λειτουργία των πρωτεϊνών FOXA είναι η προστασία του οργανισμού από την υπογλυκαιμία (261-263). Επειδή τα έμβρυα *Foxa2*^{-/-} πεθαίνουν νωρίς, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, κρίθηκε αναγκαία η ιστοειδική απαλοιφή του *Foxa2*. Στο διαγονιδιακό ποντίκι *Foxa2*^{loxP/loxP}; *Foxa3-Cre* ο *Foxa2* δεν εκφράζεται σε όλη την περιοχή έκφρασης του *Foxa3*, η οποία περιλαμβάνει την περιοχή του ενδοδέρματος από την οποία θα αναπτυχθεί το ήπαρ στο έμβρυο. Το ποντίκι *Foxa2*^{loxP/loxP}; *Foxa3-Cre* είναι ελαφρώς υπογλυκαιμικό και πεθαίνει κατά την πρώτη εβδομάδα της ζωής του (264). Ο φαινότυπος αυτός αντανάκλα την ανάγκη έκφρασης του *Foxa2* τόσο στο ήπαρ όσο και στο πάγκρεας, τα δύο όργανα που είναι απαραίτητα για την ομοίωση της γλυκόζης. Επιπλέον εστιασμένες απαλοιφές του *Foxa2* βοήθησαν στην κατανόηση του ρόλου του στο πάγκρεας. Στο ποντίκι *Foxa2*^{loxP/loxP}; *Ins.Cre*, το γονίδιο *Foxa2* απενεργοποιήθηκε αποκλειστικά στα β-κύτταρα του παγκρέατος, οδηγώντας σε υπογλυκαιμία και σχετική υπερινσουλιναιμία. Τα νησίδια που απομονώθηκαν από αυτά τα ποντίκια είχαν δύο ελλωτώματα: δεν εκκρίναν ινσουλίνη αποκρινόμενα σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, και εκκρίναν ινσουλίνη όταν δεν χρειαζόταν αποκρινόμενα σε αμινοξέα. Οι τελευταίες παρατηρήσεις εξηγούνται από τη μειωμένη έκφραση των γονιδίων-στόχων του

Foxa2 Kir6.2 (Kcnj11) και *Sur1 (Abcc8)*, τα οποία απαρτίζουν το K-ATP κανάλι που λειτουργεί ως αισθητήρας της γλυκόζης (263).

Στο ήπαρ, μερικά από τα γονίδια που αποτελούν πρώιμους στόχους των πρωτεϊνών Foxa εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης, ιδιαίτερα κατά την απόκριση σε συνθήκες νηστείας. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το *Perck* (phosphoenolpyruvate carboxykinase), το *G6pc* (glucose-6-phosphatase), και το *Tat* (tyrosine aminotransferase) (265). Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το ποντίκι *Foxa2^{loxP/loxP};Alfp.Cre*, στο οποίο το γονίδιο *Foxa2* είχε απαλοιφθεί ειδικά στα ηπατοκύτταρα, διερευνήθηκε ο ρόλος του *Foxa2* στην ομοιόσταση της γλυκόζης στο ήπαρ. Παρόλο που τα ποντίκια αυτά ήταν ευγλυκαιμικά, απέτυχαν να ενεργοποιήσουν πλήρως τα γονίδια *Perck*, *Tat* και *Igfbr1* (IGF-binding protein) κατά την απόκριση σε συνθήκες νηστείας (265).

Ο *Foxa2* παίζει επίσης ρόλο στη χρήση της ενέργειας στο λιπώδη ιστό, όπως αναδεικνύεται στα ποντίκια *Foxa2^{+/-}*. Παρόλο που τα ποντίκια *Foxa2^{+/-}* φαίνονται φυσιολογικά και έχουν φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης ταϊσμένα ή σε κατάσταση νηστείας, εμφανίζουν ένα φαινότυπο όταν τους χορηγηθεί δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (266), έχουν αυξημένο πάχος και μειωμένη κατανάλωση ενέργειας. Η μοριακή βάση για το φαινότυπο αυτό αποκαλύπτεται από το εύρημα ότι στα κύτταρα του λιπώδους ιστού σε καλλιέργεια, η υπερέκφραση του *Foxa2* οδηγεί σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη γλυκόζης, τη γλυκόλυση, τη λιπόλυση, και την σπατάλη ενέργειας (266). Αντίθετα, σε πρωτογενή κύτταρα του λιπώδους ιστού από ποντίκια *Foxa2^{+/-}* ταϊσμένα με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, τα ίδια γονίδια εκφράζονται σε χαμηλότερο βαθμό και τα λιποκύτταρα έχουν μειωμένη ευαισθησία στη γλυκόζη και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης, γλυκόλυση και λιπόλυση (266). Κατά συνέπεια, ο *Foxa2* προωθεί την χρήση της ενέργειας στο λιπώδη ιστό (παρά την αποθήκευση τριγλυκεριδίων) όταν γίνεται πρόσληψη περίσσειας θερμίδων.

Οι Stoffel et al. με την πρόσφατη δουλειά τους (267, 268) εισήγαγαν μια νέα έννοια για το ρόλο του FOXA2 στο μεταβολισμό της τροφής. Έδειξαν ότι σε κύτταρα σε καλλιέργεια, η μεταγραφική ενεργότητα του FOXA2 εμποδίζεται από την ινσουλίνη, και ότι αυτή η ρύθμιση εξαρτάται από μια θέση φωσφορυλίωσης από την επαγόμενη από την ινσουλίνη κινάση AKT2/PKB στο κατάλοιπο της θρεονίνης στη θέση 156 (T156) στον *Foxa2* του ποντικού. Δείχθηκε ότι αυτή η φωσφορυλίωση οδήγησε στον πυρηνικό αποκλεισμό του FOXA2, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό ένα ελκυστικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η ενεργότητα του FOXA2 στη γλυκονεογένεση αναστέλεται από την ινσουλίνη που παράγεται παρουσίας τροφής (267, 268). Οι Stoffel et al. (267) έδειξαν ότι ο πυρηνικός αποκλεισμός του FOXA2 συμβαίνει επίσης σε ταϊσμένα ποντίκια, σε ποντίκια *ob/ob* με υπερινσουλιναμία, σε

διαγονιδιακά ποντίκια *Srebp-1c*, και σε ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Επιπρόσθετα, η έκφραση του *Foxa2* με μεταλλαγμένη τη θέση φωσφορυλίωσης από την AKT2/PKB (που οδηγεί σε διαρκή πυρηνικό εντοπισμό) σε αυτά τα διαβητικά ποντίκια οδήγησε σε βελτίωση στα επίπεδα γλυκόζης, αυξημένη ευαισθησία στη γλυκόζη, αυξημένο μεταβολισμό του λίπους στο ήπαρ, και ενίσχυση της κατανάλωσης ενέργειας. Στο μοντέλο που προτείνουν οι Stoffel et al. ο FOXA2 είναι πυρηνικός μόνο στην κατάσταση νηστείας, κατά την οποία ενεργοποιεί πολλά γονίδια που οδηγούν σε αυξημένη χρήση της γλυκόζης του ήπατος, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων και στην κετογένεση.

Ωστόσο, αυτό το μοντέλο δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως. Άλλα εργαστήρια παρατήρησαν ότι σε ταϊσμένα ποντίκια αγρίου τύπου ή ακόμα και σε ποντίκια *ob/ob*, τα οποία έχουν αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης, η πρωτεΐνη *Foxa2* βρισκόταν στον πυρήνα ανεξάρτητα από τη μεταβολική κατάσταση (265, 269). Αντίστοιχα, και η πρόσδεση του *Foxa2* σε ένα πλήθος στόχων στη χρωματίνη ήταν πανομοιότυπη στο ήπαρ ταϊσμένων ποντικών και ποντικών σε νηστεία (265).

Οι FOXA ως πρωτοπόροι (pioneer) μεταγραφικοί παράγοντες

Η οικογένεια των FOXA ρυθμίζει την ανάπτυξη ενός πλήθους οργάνων, μεταξύ των οποίων το πάγκρεας και το ήπαρ. Είναι αξιοθαύμαστο το πως οι ίδιοι παράγοντες μπορούν να διαδραματίσουν διάφορους ρόλους σε διαφορετικούς ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα. Η υπάρχουσα θεωρία υποστηρίζει ότι πριν τη δέσμευση στην ιστοειδική διαφοροποίηση, το ενδόδερμα εισέρχεται σε μια κατάσταση «ικανότητας», η οποία χαρακτηρίζεται από την ικανότητα απόκρισης σε σήματα επαγωγής (270). Οι Zaret et al., έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες FOXA2 αλληλεπιδρούν απευθείας με τις ιστόνες H3 και H4 και μπορούν να προσδένονται στις θέσεις τους στον ενισχυτή *Alb1* ακόμα και όταν αυτός είναι πακεταρισμένος από τις ιστόνες. Απουσία του FOXA, άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες (C/EBP, NF-1) δεν μπορούν να έχουν πρόσβαση στις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης πάνω στο DNA, αλλά η πρόσδεση του FOXA οδηγεί σε χαλάρωση της χρωματίνης και επιτρέπει την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων στον ενισχυτή. Η δράση αυτή δεν εξαρτάται από το σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF (258). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, η κατάσταση «ικανότητας» του ενδοδέρματος θεωρείται ότι αντανακλά τη δράση των μελών της οικογένειας FOXA. Επίσης, η έκφραση των FOXA καθιστά τους ειδικούς για κάθε όργανο υποκινητές γονιδίων ικανούς να αποκριθούν σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες των οποίων η έκφραση περιορίζεται στην κατάλληλη περιοχή.

Οι παράγοντες FOXA και οι ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς

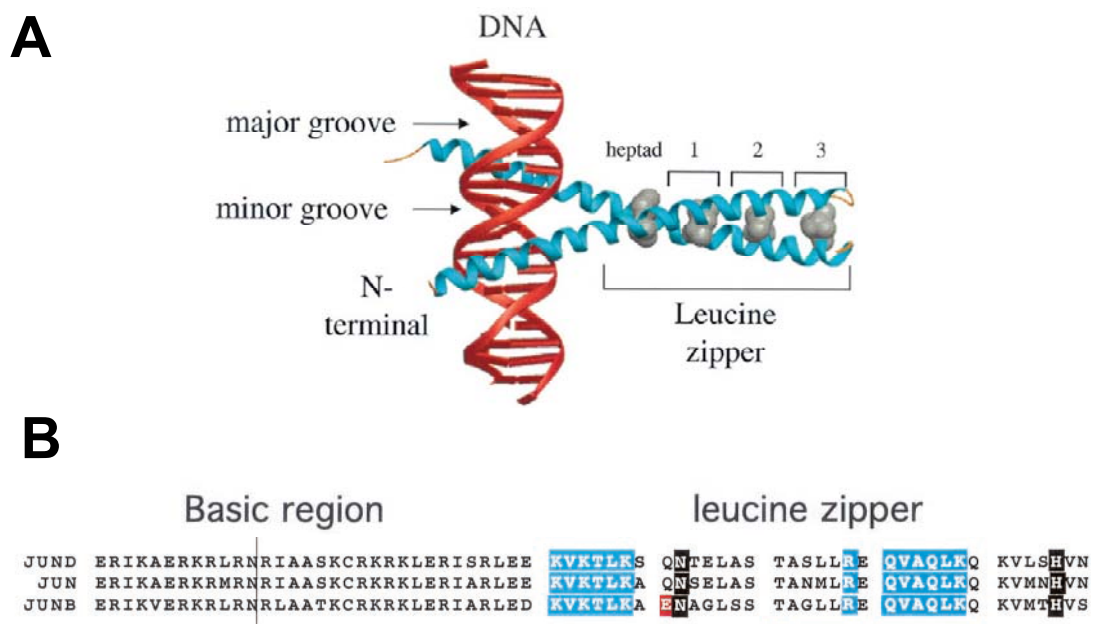
Μια από τις δράσεις των παραγόντων FOXA είναι να διευκολύνουν την πρόσδεση των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων στους στόχους τους σε διάφορα συστήματα οργάνων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR, glucocorticoid receptor) στους υποκινητές-στόχους, η οποία ενεργοποιείται σε κατάσταση νηστείας, εξαρτάται εν μέρει από τον FOXA2 (265). Κατά τον ίδιο τρόπο, θέσεις πρόσδεσης για τον FOXA1 και στοιχεία απόκρισης στα ανδρογόνα βρίσκονται κοντά σε αρκετά γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά στον προστάτη, και η πρόσδεση του FOXA1 προηγείται αυτής του υποδοχέα των ανδρογόνων (271). Επιπλέον, πολλά στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα βρέθηκαν σε κοντινή απόσταση από θέσεις πρόσδεσης FOXA1 και η αναστολή της έκφρασης του FOXA1 μείωσε την ενεργοποίηση των γονιδίων που αποκρίνονται στα οιστρογόνα (272, 273).

Το μεταγραφικό σύμπλοκο AP1

Το μεταγραφικό σύμπλοκο AP-1 (activator protein 1) περιλαμβάνει μια συλλογή από μεταγραφικούς παράγοντες που περιέχουν τη δομή b-Zip (basic region leucine zipper motif) μέσω της οποίας σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους. Τα καλύτερα μελετημένα συστατικά του συμπλόκου είναι τα μέλη των οικογενειών Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 και Fra-2) και Jun (c-Jun, JunB και JunD), τα οποία προσδένονται στο DNA μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA η οποία είναι πλούσια σε φορτισμένα αμινοξέα (basic region) (Εικόνα 24). Τα διμερή AP-1 προσδένονται στην ακολουθία 5'-TGAG/CTCA-3' γνωστή και ως TRE [phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) response element] (274-276) λόγω της ικανότητας τους να μεσολαβούν στην επαγωγή της μεταγραφής από τον εστέρα της φορβόλης TPA. Ανάμεσα στις άλλες πρωτεΐνες που έχουν αναφερθεί να ετεροδιμερίζονται με τα μέλη της οικογένειας Jun είναι οι CNC, ATF2, ATF3 και c-Maf (277, 278).

Οι πρωτεΐνες Fos δε σχηματίζουν σταθερά ομοδιμερή αλλά μπορούν να προσδένονται στο DNA σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες Jun τα οποία είναι πιο σταθερά από τα διμερή Jun:Jun (279, 280). Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεΐνες ATF, σχηματίζουν ομοδιμερή καθώς και ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες Jun τα οποία προσδένονται κατά προτίμηση σε στοιχεία απόκρισης cAMP (CRE, 5'-TGACGTCA-3'). Η συγγένεια πρόσδεσης στο DNA και η ικανότητα ενεργοποίησης ποικίλουν πολύ ανάμεσα στις πρωτεΐνες Jun, αλλά η πρωτεΐνη c-Jun εμφανίζει το

υψηλότερο δυναμικό ενεργοποίησης (274). Ο ετεροδιμερισμός με τον c-Fos αυξάνει περισσότερο την ικανότητα του c-Jun να ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω του σχηματισμού ακόμα πιο σταθερών διμερών (279, 280), ενώ ο ετεροδιμερισμός με τον JunB μειώνει τη μεταγραφική ικανότητα του c-Jun (281). Κατά συνέπεια, η διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών AP-1 σε απόκριση σε εξωκυτάρια ερεθίσματα έχει προταθεί ότι είναι από τους κύριους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ενεργότητα των πρωτεϊνών AP-1 (281). Πράγματι, ο ανταγωνισμός ανάμεσα στους c-Jun και JunB παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των βιολογικών λειτουργιών των συμπλόκων AP-1 που περιέχουν τις πρωτεΐνες αυτές (282-284). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών AP-1 ρυθμίζει επιπλέον την ενεργότητά τους και παρέχει έναν επιπλέον τρόπο ρύθμισης της ενεργότητας των πρωτεϊνών AP-1 από εξωκυτάρια ερεθίσματα (285, 286).



Εικόνα 24: (A) Παράδειγμα διμερούς πρωτεΐνης bZip κατά την πρόσδεση στο DNA. (B) Ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία των μελών της οικογένειας Jun του ανθρώπου. [πηγή: αναφορά (287)]

Ρύθμιση των πρωτεϊνών AP-1 από φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά ερεθίσματα

Ο ρόλος των παραγόντων AP-1 στη μεταγραφή μπορεί να είναι είτε θετικός ή αρνητικός ανάλογα με τη σύστασή τους, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, το γονίδιο-στόχο, τον κυτταρικό τύπο και τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Θέσεις πρόσδεσης AP-1 βρίσκονται σε πολλά γονίδια και η δράση των AP-1 πρωτεϊνών

ρυθμίζει πολλές θεμελιώδεις διαδικασίες όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την απόκριση στο στρες.

Ο AP-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος συμβάλει τόσο στη βασική γονιδιακή έκφραση όσο και στην επαγόμενη έκφραση από TPA (276, 288). Ωστόσο, σύντομα αναγνωρίστηκε ότι και άλλα ερεθίσματα, όπως ο ορός (289), αυξητικοί παράγοντες (288, 290), ογκοπρωτεΐνες (291), ο TNF- α (tumor necrosis factor- α) (292) και η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) (293) είναι επίσης ισχυροί επαγωγείς της ενεργότητας του AP-1. Η παρατήρηση ότι αυξητικοί παράγοντες και επαγωγείς όγκων επάγουν την ενεργότητα των πρωτεϊνών AP-1, και ότι οι πρωτεΐνες c-Jun και c-Fos κωδικοποιούνται από ογκογονίδια φανερώνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης και στο μετασχηματισμό των κυττάρων. Επιπλέον, η απόκριση σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-1) και το εύρημα γονιδίων-στόχων των AP-1 όπως η κολλαγενάση (276) και η IL-2 (294) υποδηλώνουν ότι οι AP-1 είναι πιθανό να εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση.

Αρκετοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών AP-1 από αυξητικούς παράγοντες, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ακτινοβολία UV (285). Η απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες γίνεται με τη μεσολάβηση κυρίως των ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) MAP κινασών (MAPK, mitogen-activated protein kinases) (295) ενώ η απόκριση σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ακτινοβολία UV εξαρτάται κυρίως από τις MAP κινάσες JNK και p38 (285). Στην πρωτεΐνη c-Jun υπάρχουν θέσεις φωσφορυλίωσης από JNK, αλλά αυτές δεν είναι συντηρημένες στην πρωτεΐνη JunB (296). Ωστόσο, οι Li et al. έδειξαν ότι η πρωτεΐνη JunB μπορεί να φωσφορυλιωθεί από MAPKs στα κατάλοιπα Thr-102 και Thr-104 προκειμένου να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου της IL-4 (297). Επιπλέον, οι Bakiri et al. ανέφεραν ότι τα σύμπλοκα CDK–cyclin B1 (CDK, cyclin-dependent kinase) φωσφορυλιώνουν *in vitro* την πρωτεΐνη JunB στις θέσεις Ser-23, Thr-150 και Ser-186 και ρυθμίζουν την ενεργότητα του JunB στον κυτταρικό κύκλο (282).

Ειδικόί Στόχοι

Ο μεταφορέας λιπιδίων και χοληστερόλης ABCA1 παίζει έναν κεντρικό ρόλο στη βιογένεση της HDL και στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, προστατεύοντας από την αθηροσκλήρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση των επιπέδων λειτουργικής HDL χοληστερόλης στο πλάσμα. Αντίστοιχες προσεγγίσεις στοχεύουν και στην επαγωγή του γονιδίου του μεταφορέα ABCG1, ο οποίος παίζει σημαντικό αντι-αθηρογενετικό ρόλο στα μακροφάγα.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήσαμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων ABCA1 και ABCG1 του ανθρώπου. Οι ειδικοί στόχοι της διατριβής ήταν οι εξής:

- ↪ Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοϊκό οξύ.
- ↪ Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στην αναστολή της σηματοδότησης μέσω των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα.
- ↪ Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός νέων ρυθμιστικών στοιχείων στην περιοχή του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου ABCA1.
- ↪ Ο χαρακτηρισμός μιας φυσικής μεταλλαγής (-376C>T) στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 του ανθρώπου.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα (T4 DNA ligase, Klenow fragment of DNA polymerase I, shrimp alkaline phosphatase) ήταν από τη Minotech, τη New England Biolabs, τη GIBCO/BRL ή τη Roche. Τα θρεπτικά Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI-1640, το αντιβιοτικό penicillin/streptomycin, το Trizol, η SuperScript Rnase H-reverse transcriptase, η Lipofectamine 2000 και τα μανητικά σφαιρίδια Dynabeads M-280 streptavidin ήταν από την Invitrogen/Life Technologies. 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), το θρεπτικό Shields and Sang M3 Insect Medium για τα κύτταρα S2, τα streptavidin-agarose σφαιρίδια και το streptavidin-HRP ήταν από τη Sigma-Aldrich. 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. Το QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit ήταν από Stratagene. Τα glutathione-Sepharose 4B και τα protein G Sepharose σφαιρίδια ήταν από τη GE healthcare. Το υπόστρωμα για το ECL (Super Signal West Pico chemiluminescent substrate) ήταν από την Pierce. Τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια συντέθηκαν στη VBC Biotech. Όλα τα υπόλοιπα ολιγονουκλεοτίδια συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας στο IMBB. Τα Foxa2 siRNA και scrambled siRNA συντέθηκαν στην MWG. Ο αναστολέας LY294002 ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Χ. Στουρνάρα.

Αντισώματα

Το anti-HNF-3β/FOXA2 (M20), το anti-RXRα (D20), anti-Sp1 (H225) και το anti-SREBP-1 (H160) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology. Το anti-mouse-HRP ήταν από την Chemicon International Inc. Το anti-myc (9E-10) και το anti-goat-HRP ήταν από τη Sigma-Aldrich. Το rabbit α-mouse IgG ALEXA 488 ήταν από την Invitrogen/Life Technologies. Το donkey α-goat IgG ALEXA 555 ήταν μια ευγενική προσφορά της Δρ. Δ.Καραγωγέως. Το anti-AKT (Cell Signaling Technology) ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Χ. Στουρνάρα. Το α-adenovirus ήταν από την Chemicon.

Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζης

Η απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, ο καθαρισμός αντιδράσεων PCR ή αντιδράσεων με περιοριστικά ένζυμα έγινε με τη χρήση Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας (Promega).

Αποφωσφορυλίωση DNA

Στην περίπτωση που ένας πλασμιδιακός φορέας κόπηκε μόνο με ένα ένζυμο, προτού χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση συρραφής υποβλήθηκε σε αποφωσφορυλίωση των άκρων του. Για το λόγο αυτό στην αντίδραση της πέψης προστίθεται 1μl ενζύμου SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά με 1 ώρα. Ακολούθησε καθαρισμός με το Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System της Promega ή κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH₂O.

Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

- ✓ Προσθήκη 2^{1/2} όγκων απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M
- ✓ Επώαση O/N στους -20°C ή για 20 λεπτά στους -80°C
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 15 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου (RT)
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 5 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου (RT)
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Επαναδιάλυση σε ddH₂O

Αντίδραση συρραφής πλασμιδιακού φορέα με τμήμα DNA

Για την αντίδραση συρραφής (ligation) χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες μορίων του φορέα και του τμήματος DNA που θέλαμε να ενθέσουμε σε αυτόν. Συνήθως η αναλογία των μορίων στην αντίδραση ήταν ίση ή με περίσσεια του τμήματος DNA ως προς το φορέα. Για μια αντίδραση τελικού όγκου 15μl, προστίθενται 1 μl λιγάση (T4 DNA ligase), 1,5 μl διαλύματος συρραφής 10x (ligation buffer με ATP, τελικής συγκέντρωσης 1x) και νερό. Η αντίδραση επωάζεται στους 4°C ή στους 16°C για περίπου 16 ώρες.

Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών με πλασμιδιακές κατασκευές με χρήση χημικών επιδεκτικών κυττάρων

- ✓ Ένα μέρος ή ολόκληρη η ποσότητα της αντίδρασης συρραφής προστίθεται σε 100μl χημικών επιδεκτικών κυττάρων (π.χ. DH10β)
- ✓ Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο
- ✓ Θερμικό σοκ στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα
- ✓ Προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου (SOC, SOB ή LB)
- ✓ Επώαση για 45 λεπτά στους 37°C
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000rpm
- ✓ Απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του θρεπτικού μέσου και επαναδιάλυση της πελέτας
- ✓ Επιστροφή των κυττάρων σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό με το οποίο γίνεται η επιλογή
- ✓ Επώαση στους 37°C για περίπου 16 ώρες (O/N), προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

- ✓ Μόλυνση 2ml LB (με αντιβιοτικό) με βακτήρια και επώαση O/N στους 37°C
- ✓ Μεταφορά 1,5ml από κάθε καλλιέργεια σε σωληνάκια των 1,5ml
- ✓ Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000rpm
- ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου

A. Λύση των βακτηρίων με βρασμό παρουσία λυσοζύμης

- ✓ Στην πελέτα προστίθενται: 600μl διαλύματος λύσης και
20-30μl λυσοζύμη (10mg/ml)
- ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας με vortex
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Βράσιμο των δειγμάτων για 90 δευτερόλεπτα
- ✓ Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για περίπου 15 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm
- ✓ Απομάκρυνση της πελέτας με μια οδοντογλυφίδα
- ✓ Προσθήκη 600μl ισοπροπανόλης (παγωμένη) και ανακίνηση
- ✓ Τοποθέτηση στους -20°C για ~20-30 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm (max)

- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm
- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου και στέγνωμα της πελέτας
- ✓ Επαναδιάλυση σε ~50μl H₂O ή TE με 100 μg/ml RNase A

B. Αλκαλική λύση των βακτηρίων

- ✓ Στην πελέτα προστίθενται 150μl διαλύματος P1 (QIAGEN) με 100 μg/ml RNase A
- ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας με πιπέτα
- ✓ Προσθήκη 150μl διαλύματος P2 (QIAGEN) και απότομη ανακίνηση
- ✓ Προσθήκη 150μl διαλύματος P3 (QIAGEN) και απότομη ανακίνηση
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm
- ✓ Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρά σωληνάκια των 1,5ml
- ✓ Προσθήκη 2/3 του όγκου (300μl) ισοπροπανόλη και ανακίνηση
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm (max)
- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm
- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου και στέγνωμα της πελέτας
- ✓ Επαναδιάλυση σε ~30-35μl H₂O
 - * Με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης το DNA απομονώνεται σε πιο καθαρή μορφή, π.χ. είναι κατάλληλο για αντίδραση αλληλούχισης (sequencing)

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Η απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα έγινε με τη χρήση κολώνας QIAGEN-tip100 ή tip-500 σύμφωνα με το πρωτόκολλο “QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Protocol” της εταιρίας QIAGEN.

Υπολογισμός ποσότητας

5 μl RNA σε 1ml H₂O

[OD 260nm] x 10 = μg/μl

Πλασμιδιακές κατασκευές

Υποκινητής του γονιδίου ABCA1 (περιοχή εξονίου 1)

Τα πλασμίδια (-668/+33)-ABCA1-luc, (-668/+205)-ABCA1-luc, (-204/+205)-ABCA1-luc, (-76 ως +205)-ABCA1-luc και (-44/+205)-ABCA1-luc δημιουργήθηκαν με κλωνοποίηση των αντίστοιχων περιοχών του υποκινητή του ABCA1 στις θέσεις *KpnI*-*XhoI* του φορέα pGL3 basic. Οι περιοχές αυτές απομονώθηκαν με PCR από γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές του πίνακα 2.

Τα τμήματα -204 ως +205, -76 ως +205 και -44 ως +205 κλωνοποιήθηκαν επίσης στο φορέα pBluescript-luc (pBS-luc) και πάλι στις θέσεις *KpnI*-*XhoI*. Το πλασμίδιο (-668/+205)mutAB-ABCA1-luc καθώς και τα pBS(-76/+205)-TATA-M2-ABCA1-luc και pBS(-76/+205)-TATA-M4-ABCA1-luc δημιουργήθηκαν με μεταλλαγμένη και περιγράφονται στην αντίστοιχη ενότητα. Το πλασμίδιο (-668/+33)mutAB-ABCA1-luc δημιουργήθηκε με απομόνωση με PCR του τμήματος -668/+33 από το πλασμίδιο (-668/+205)mutAB-ABCA1-luc και κλωνοποίησή του στο φορέα pGL3 basic στις θέσεις *KpnI*-*XhoI*. Οι κατασκευές που περιλαμβάνουν την περιοχή του υποκινητή παρουσιάζονται στην εικόνα 25.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
ABCA1-668	Forward 5' - CGGGGTACCGACCTGGGGAGCTCAGGCTGGGAAT -3'
ABCA1+33	Reverse 5' - CCGCTCGAGCCCCACTCACTCTCGCTCGCAATTA - 3'
ABCA1-204F	Forward 5' - CGGGGTACCCCAACTCCCTAGATGTGTCTGTG - 3'
ABCA1-76F	Forward 5' - CGGGGTACCGAGAGCACAGGCTTTGACCGATAG -3'
ABCA1-44F	Forward 5' - CGGGGTACCGCGCTCGGTGCAGCCGAATCTAT - 3'
ABCA1+205R	Reverse 5' - CCGCTCGAGGTCTCTTTCTCCTACCCCTTGACA - 3'
S16-F	Forward 5' - GGTACCGGGTGAACCCAGAGGCTGGGAGCTG - 3'
S16-R	Reverse 5' - CTCGAGGTTCCCTCAGCCAGCACCCCCAGCG - 3'

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην κλωνοποίηση τμημάτων του υποκινητή και του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Οι θέσεις περιορισμού *KpnI* (GGTACC) και *XhoI* (CTCGAG) είναι υπογραμμισμένες.

Περιοχή ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1

Τα πλασμίδια Int1(-8000/+224)-luc, Int1(-6000/+224)-luc, Int1(-5000/+224)-luc, Int1(-4000/+224)-luc και Int1(-3000/+224)-luc κατασκευάστηκαν από τον Dr. Horng-Yuan Kan (Boston University). Τα πλασμίδια Int1(-1491/+224)-CAT (S11), Int1(-1341/+224)-CAT (S12), Int1(-994/+224)-CAT (S13), Int1(-681/+224)-CAT (S14), Int1(-471/+224)-CAT (S15), Int1(-171 /+224)-CAT (S16) και Int1(+26/+224)-CAT

(S17) υπήρχαν επίσης διαθέσιμα στο εργαστήριο από τον Dr. Horng-Yuan Kan (Boston University) αλλά ο φορέας ήταν ο PUCSH-CAT, ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αναφοράς της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (CAT). Όσα τμήματα περιείχονταν στο φορέα PUCSH-CAT (S11-S17) απομονώθηκαν με πέψη με τα ένζυμα *KpnI-XhoI* και κλωνοποιήθηκαν στις ίδιες θέσεις στο φορέα pGL3 basic. Το ίδιο πραγματοποιήθηκε και για τις κατασκευές που περιλαμβάναν την περιοχή -171/+92 με τις μεταλλαγές των θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1, A και B (S4mut, S5mut και P4P5 mutant). Για να δημιουργηθεί το πλασμίδιο S16N που περιλαμβάνει την αντίστοιχη αγρίου τύπου περιοχή, το κομμάτι -171/+92 απομονώθηκε με PCR με τους εκκινητές S16-F και S16-R (βλ.πίνακα 2) και κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* στο φορέα pGL3 basic μετά από τη δράση του ενζύμου *Klenow* για να γίνουν λεία τα άκρα.

Το πλασμίδιο Int1(-4000/-1524)-luc περιλαμβάνει την περιοχή -4000/-1524 και δημιουργήθηκε με αφαίρεση του τμήματος -1523/+224 από το πλασμίδιο Int1(-4000/+224)-luc μετά από πέψη με το ένζυμο *BglII*. Το πλασμίδιο Int1(-4000/-2769)-luc περιλαμβάνει την περιοχή -4000/-2769 και δημιουργήθηκε με αφαίρεση του τμήματος -2768/-1524 από το πλασμίδιο Int1(-4000/-1524)-luc μετά από πέψη με το ένζυμο *HindIII*. Οι κατασκευές που περιλαμβάνουν την περιοχή του ιντρονίου παρουσιάζονται στην εικόνα 26 .

Τα πλασμίδια (-1576/-56)-luc-Int1(-1491/+224), Luc-Int1(-1491/+224) και (-1576/-56)-luc ήταν από τον Horng-Yuan Kan.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς LXRα και RXRα

LXRα: Ο φορέας pCMX-LXRα ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Ι. Ταλιανίδη. Προκειμένου να κατασκευαστούν οι φορείς έκφρασης που κωδικοποιούν για την πλήρους μήκους πρωτεΐνη LXRα (1-447) ή των ελλειματικών της μορφών (1-163, 164-447, 1-97, 98-163, 30-163, 1-127 και 30-127) οι αντίστοιχες περιοχές απομονώθηκαν με PCR από το πλασμίδιο pCMX-LXRα χρησιμοποιώντας τους εκκινητές όπως φαίνεται στον πίνακα 3 που ακολουθεί και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pCDNA3-6myc. Η αλληλουχία των εκκινητών εμφανίζεται στον πίνακα 4.

περιοχή LXRα (αα)	Όνομα εκκινήτη		θέσεις ένθεσης στον pCDNA3-6myc
	Forward	Reverse	
1-447	HLXR-F	HLXR-R	<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I
1-163	HLXR-F	hLXR-ABC-R	<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I
164-447	hLXR-LBD-F	HLXR-R	<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I
1-97	HLXR-F	hLXR-97-Rev	<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I
98-163	hLXR-98-Frw	hLXR-ABC-R	<i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I
1-127	HLXR-F	hLXR-127-Rev	<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I
30-127	hLXR-30-Fw	hLXR-127-Rev	<i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I

Πίνακας 3: Οι συνδυασμοί των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των τμημάτων του πυρηνικού υποδοχέα LXRα. Η αναλυτική αλληλουχία τους παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

RXRα: Ο φορέας έκφρασης pCDNA3-6myc-RXRα κατασκευάστηκε με απομόνωση της κωδικής περιοχής από το φορέα PMT2-RXRα με πέψη με *Eco*RI και κλωνοποίηση στην ίδια θέση στο φορέα pCDNA3-6myc. Με τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκε και ο φορέας GST-RXRα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2

Ο φορέας έκφρασης CMV-HNF-β για το μεταγραφικό παράγοντα FOXA2 (του αρουραίου) ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. R. Costa. Η κωδική περιοχή του γονιδίου rFOXA2 απομονώθηκε από το φορέα CMV-HNF-β με πέψη με *Eco*RI και κλωνοποιήθηκε στην ίδια θέση στο φορέα pBluescript (pBS-FOXA2). Ο φορέας pAd-Track-rFOXA2 κατασκευάστηκε με απομόνωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου rFOXA2 από το φορέα pBS-FOXA2 με πέψη με *Kpn*I-*Not*I και κλωνοποίηση στις ίδιες θέσεις στο φορέα pAd-Track-CMV. Το πλασμίδιο pCDNA3-Bio-FOXA2 δημιουργήθηκε με απομόνωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου FOXA2 με PCR από το φορέα CMV-HNF-3β, χρησιμοποιώντας τους εκκινήτες rHNF-3b-F και rHNF-3b-R (πίνακας 4) και με την κλωνοποίησή της στις θέσεις *Eco*RI-*Not*I του φορέα pCDNA3-Bio. Η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης FOXA2, η FOXA2-T156A, όπου η θρεονίνη στη θέση 156 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη δημιουργήθηκε με μεταλλαγμένη και περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBP

Ο φορέας έκφρασης SREBP-1α που περιλαμβάνει τα πρώτα 460 αμινοξέα που αντιστοιχούν στην ώριμη μορφή (ενεργή) ήταν διαθέσιμος στο εργαστήριο (Pissios et al, 1999). Οι φορείς έκφρασης pCDNA3-6myc-SREBP-1α (αα 1-461), -1c (αα 1-437) και -2 (αα 1-458) για τις συστατικά ενεργές (ώριμες) μορφές των πρωτεϊνών δημιουργήθηκαν με απομόνωση των αντίστοιχων περιοχών με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (hSREBP-1C-F, hSREBP-1C-R, hSREBP-1a-F, hSREBP-2-F, hSREBP-2-R) του πίνακα 4 από cDNA ηπατικών κυττάρων (HepG2) και κλωνοποίησή τους στις θέσεις *EcoRI-NotI* του φορέα pCDNA3-6myc. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αντίστροφος εκκινητής ήταν κοινός (hSREBP-1C-R) για τα SREBP-1α και -1c καθώς διαφέρουν μόνο αμινοτελικά. Τα ίδια τμήματα μαζί με τον επίτοπο 6myc απομονώθηκαν από το pCDNA3-6myc με πέψη με τα ένζυμα *KpnI-NotI* και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pAd-Track-CMV, προκειμένου να δημιουργηθούν τα πλασμίδια pAd-Track-6myc-SREBP-1α, -1c και -2.

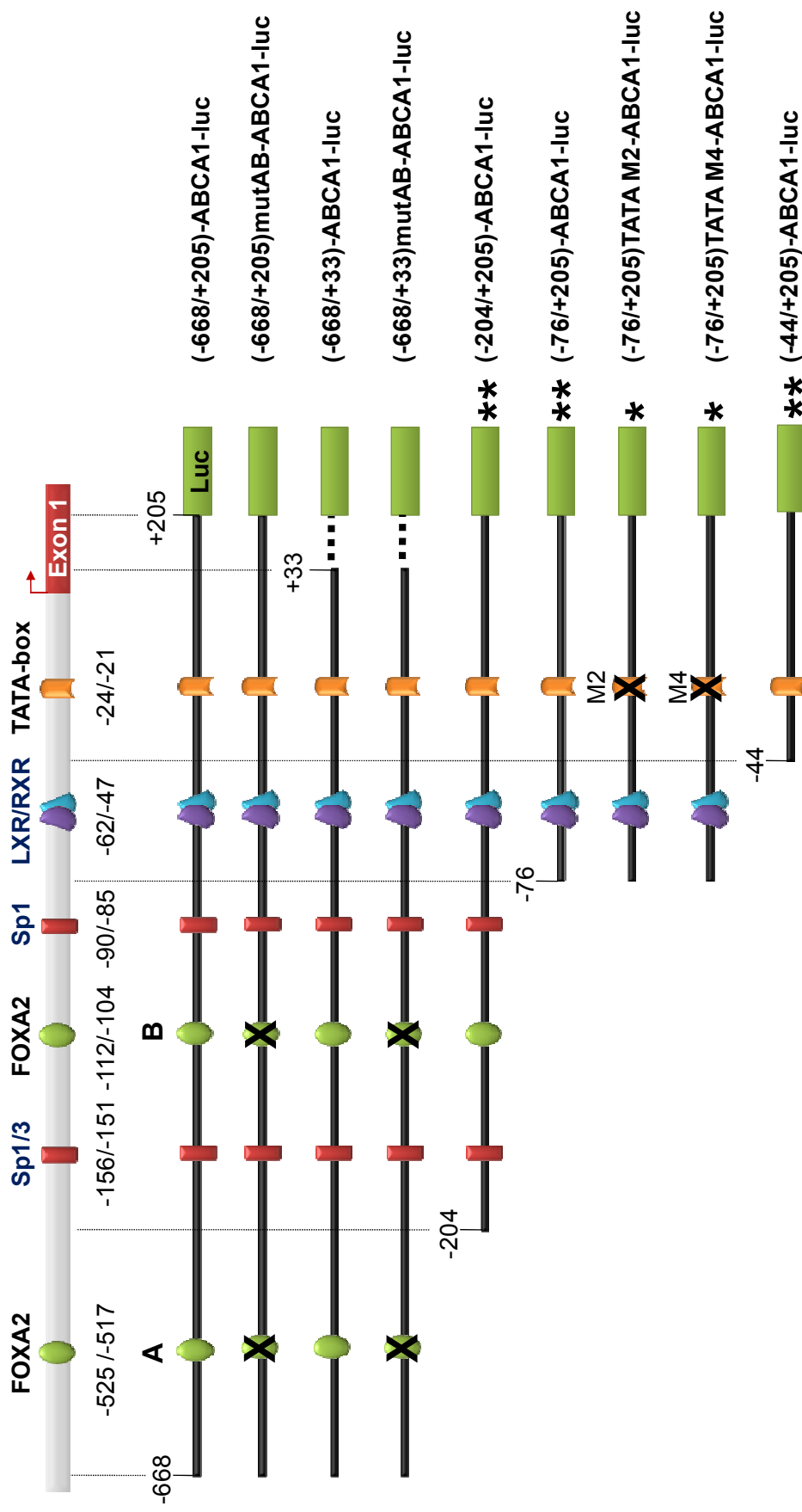
Sp1

Οι φορείς που εκφράζουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες GST και του Sp1 αγρίου τύπου, καθώς και GST και κάθε υποπεριοχής του παράγοντα Sp1 ήταν μια ευγενική προσφορά της Ελευθερίας Βασιλάκη. Ο φορέας pCDNA3-Bio-Sp1 ήταν διαθέσιμος στο εργαστήριο. Ο φορέας έκφρασης pPac-Sp1 ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. John Noti.

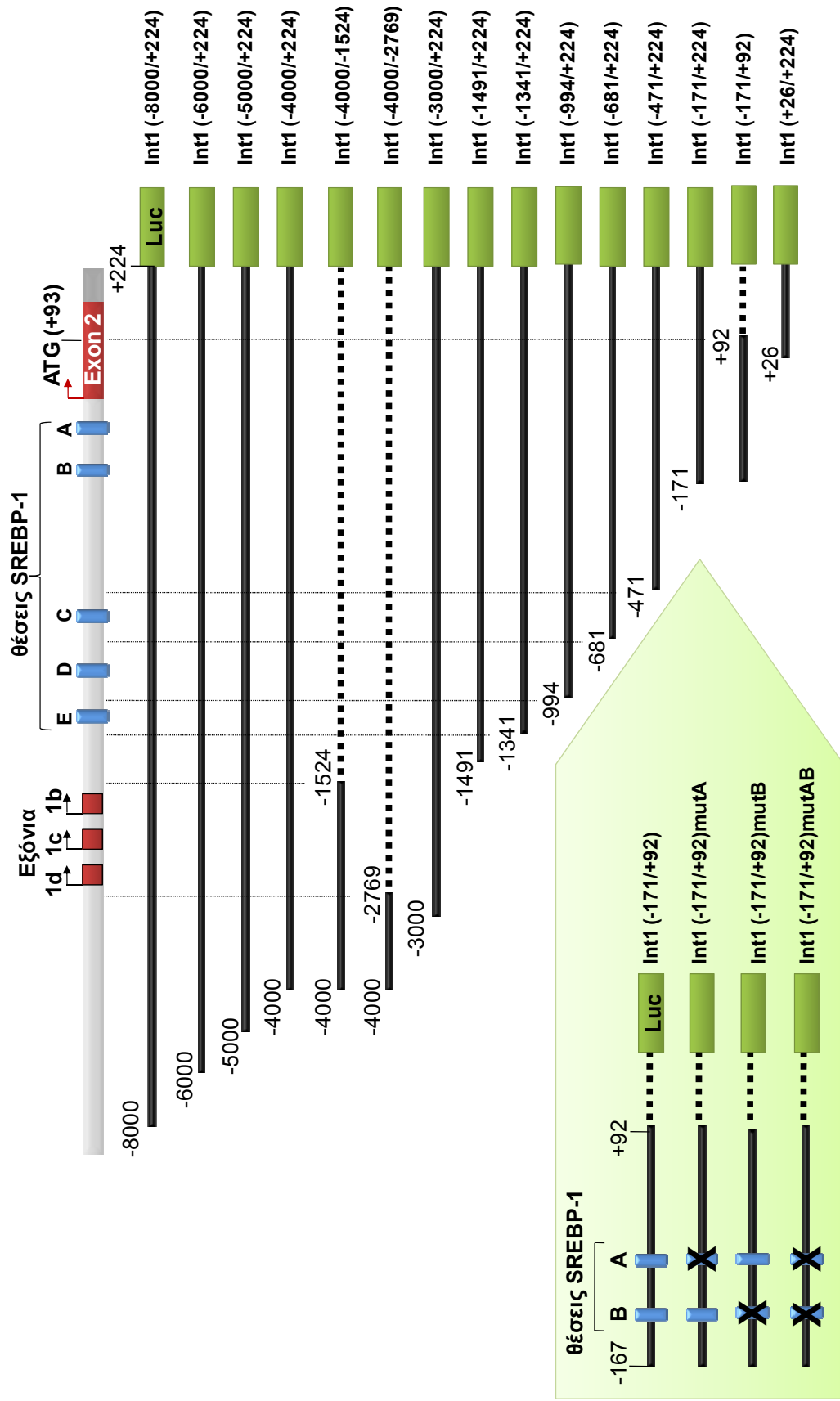
Άλλοι φορείς

Ο φορέας pBluescript-luc κατασκευάστηκε με κλωνοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης στις θέσεις *HindIII-BamHI* το οποίο απομονώθηκε από το φορέα pGL3 basic.

Ο φορέας έκφρασης hsp-lacZ, που χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των παροδικών επιμολύνσεων ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Χ. Δελιδάκη. Ο φορέας έκφρασης της λιγάσης της βιοτίνης pCDNA3-BirA και ο φορέας pCDNA3-Bio ήταν διαθέσιμοι στο εργαστήριο.



Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν τμήματα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένα). Με ένα αστερίσκο σημειώνονται τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν μόνο στο φορέα pBluescript-luc, ενώ με δύο αστερίσκους σημειώνονται τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν και στο φορέα pGL3 basic. Χωρίς αστερίσκο σημειώνονται τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν μόνο στον pGL3 basic. Luc: γονίδιο της λουσιφεράσης.



Εικόνα 26 : Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν τμήματα της περιοχής του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Στο ένθετο σχήμα παρουσιάζονται οι κατασκευές που φέρουν μεταλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1 στην κοντινή περιοχή.

Πίνακας 4: Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των LXRα, FOXA2 και SREBP-1a, -1c και -2. Οι θέσεις περιορισμού *Xba*I (CTCGAG), *Xba*I (TCTAGA), *Eco*RI (GAATTC) και *Not*I (GCGGCCGC) είναι υπογραμμισμένες.

Όνομα εκκινητή		Αλληλουχία
HLXR-F	Forward	5' - <u>CCGCTCGAG</u> ATGTCCITGTGGCTGG - 3'
HLXR-R	Reverse	5' - <u>CGCTCTAGAT</u> CATTTCGTGCACATCC - 3'
hLXR-ABC-R	Reverse	5' - <u>TGCTCTAGAT</u> CACATGCCAGCCTGACGGCATTGCGG - 3'
hLXR-LBD-F	Forward	5' - <u>CCGCTCGAG</u> CGGGAGGAGTGTCTCCTGTCAGAAG - 3'
hLXR-97-Rev	Reverse	5' - <u>TGCTCTAGAT</u> CATAGCTCGTTCCTCCAGCATTTTG - 3'
hLXR-98-Frw	Forward	5' - <u>CCGGAATTC</u> TGCAGCGGTGTGGGACAAG - 3'
hLXR-30-Fw	Forward	5' - <u>CCGGAATTC</u> AGCCAGGCCAGGGAGGCAGCAG - 3'
hLXR-127-Rev	Reverse	5' - <u>TGCTCTAGAT</u> CAGACGCTGCGGGGAAGAATCCC - 3'
rHNF-3b-F	Forward	5' - <u>CCGGAATTC</u> ATGCTGGAGCCGTGAAGATGGAAGG - 3'
rHNF-3b-R	Reverse	5' - <u>TTTGGGCCGC</u> TTAGGACGAGTTCATAATAGCCTGG - 3'
hSREBP-1C-F	Forward	5' - <u>CGCGAATTC</u> ATGGATTGCACITTCGAAGACATGCTTCAGC - 3'
hSREBP-1C-R	Reverse	5' - <u>TTTGGGCCGC</u> TCAGCTGTCAGGCTCCGAGTCACT - 3'
hSREBP-1a-F	Forward	5' - <u>CGCGAATTC</u> ATGGACGAGCCACCCTTCAGCGAGGCGG - 3'
hSREBP-2-F	Forward	5' - <u>CGCGAATTC</u> ATGGACGACAGCGGGCGGAGCTGGG - 3'
hSREBP-2-R	Reverse	5' - <u>TTTGGGCCGC</u> TCACAATAGAGGGCTTCCTGGCTC - 3'

Ο υποκινητής του γονιδίου ABCG1

Το πλασμίδιο (-1080/+14)-ABCG1(-376C)-luc δημιουργήθηκε με κλωνοποίηση της αντίστοιχης περιοχής του υποκινητή του ABCG1 στις θέσεις *KpnI*-*XhoI* του φορέα pGL3 basic. Η περιοχή αυτή απομονώθηκε με PCR από γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές του πίνακα 5. Η μεταλλαξιγένεση της θέσης -376 (-376C>T) στο πλασμίδιο (-1080/+14)-ABCG1(-376T)-luc πραγματοποιήθηκε με μεταλλαξιγένεση όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Σκοπός
ABCG1-1080-F	5' -CCCGGTACCCAGGTGTGCTGGAAATG-3'	Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCG1
ABCG1+14-R	5' -CCGCTCGAGGAGAAAGCGGCCATCAGACA-3'	
ABCG1-487F	5' -CCTCTTCGACCCCATCACACAGC-3'	ChIP
ABCG1-144R	5' -CCGCTCGAGTCCGGCTCCGGCTCTGGTTCCAGC-3'	

Πίνακας 5: Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 του ανθρώπου και στην ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης. Οι θέσεις περιορισμού *KpnI* (GGTACC) και *XhoI* (CTCGAG) είναι υπογραμμισμένες. ChIP, chromatin immunoprecipitation.

Μεταλλαξιγένεση

Για τη μεταλλαξιγένεση θέσεων στον υποκινητή των γονιδίων ABCA1 και ABCG1 και στην κωδική περιοχή του γονιδίου rFOXA2 χρησιμοποιήθηκε το QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit της Stratagene.

Αρχικά πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR που έχει ως εξής:

- 5 μl 10× reaction buffer
- 10 ng dsDNA template
- 50 ng εκκινητή #1
- 50 ng εκκινητή #2 (συμπληρωματικός του #1)
- 1 μl dNTPs 10mM
- 1 μl *PfuTurbo* DNA polymerase (2.5 U/μl)
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

- 95°C 30 secs
 - 95°C 30 secs
 - 55°C 1 min
 - 68°C 6:30 min
- } 18 κύκλοι

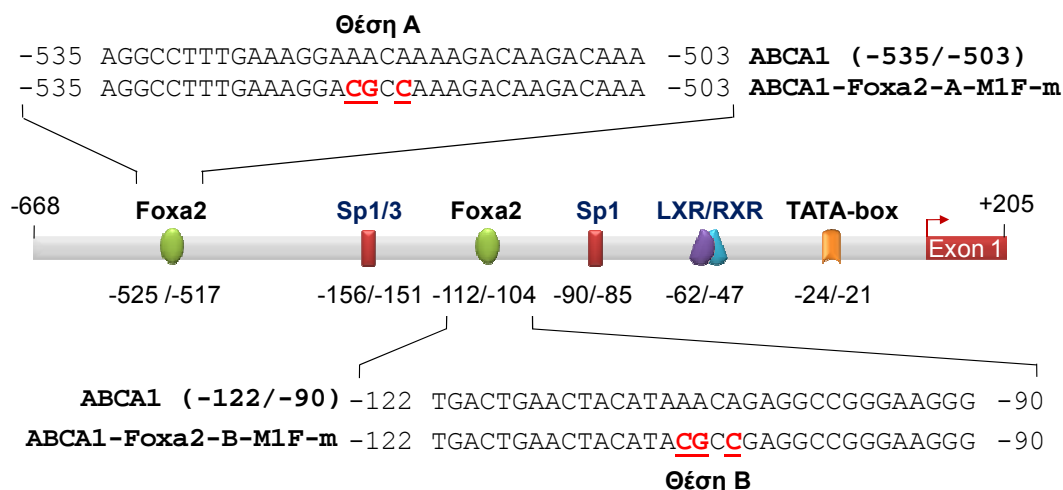
Μετά το τέλος της PCR στην αντίδραση προστίθεται 1 µl ενζύμου *DpnI* και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C προκειμένου να κοπεί το αρχικό μεθυλιωμένο πλασμίδιο.

- ✓ Η αντίδραση αραιώνεται 1:3 με ddH₂O και 1 µl της αραιώσης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό ηλεκτροεπιδεκτικών βακτηρίων DH10β της Invitrogen (ElectroMAX DH10B Cells) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας.
- ✓ Το σύνολο των κυττάρων απλώνεται σε τριβλία με LB και αντιβιοτικό.
- ✓ Το DNA ορισμένων αποικιών απομονώνεται σε μικρή κλίμακα και η παρουσία της μετάλλαξης επιβεβαιώνεται με αλληλούχιση.

Μεταλλαγές στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1

Με το παραπάνω πρωτόκολλο μεταλλάχθηκαν δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (θέσεις A και B) όπως φαίνονται στην εικόνα 27 που ακολουθεί. Οι μεταλλαγές αυτές έγιναν χρησιμοποιώντας ως αρχικό πλασμίδιο (template) το (-668/+205)-ABCA1-luc. Η κατασκευή (-668/+205)mutAB-ABCA1-luc που προέκυψε φέρει μεταλλαγές και στις δύο θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα FOXA2.

Για τις μεταλλαγές M2 και M4 στην περιοχή TATA χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό πλασμίδιο (template) το πλασμίδιο (-76/+205)-ABCA1-luc (pBluescript). Οι κατασκευές που προέκυψαν ονομάστηκαν (-76/+205)-TATA M2-ABCA1-luc και (-76/+205)-TATA M4-ABCA1-luc, αντίστοιχα.



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγών στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 στις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 (A και B). Η αγρίου τύπου αλληλουχία εμφανίζεται στην πάνω σειρά και από κάτω βρίσκεται η αλληλουχία του εκκινητή (#1) που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταλλαγή. Με κόκκινο χρώμα και υπογραμμισμένες εμφανίζονται οι σημειακές αλλαγές.

Μεταλλαγή στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1

Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ABCG1-391F και ABCG1-361F (πίνακας 6) και ως αρχικό πλασμίδιο (template) το (-1080/+14)-ABCG1(-376C)-luc κατασκευάσαμε το πλασμίδιο (-1080/+14)-ABCG1(-376T)-luc στο οποίο η κυτοσίνη στη θέση -376 έχει μεταλλαχθεί σε θυμιδίνη.

Μεταλλαγή στην πρωτεΐνη FOXA2

Η θρεονίνη στη θέση 156 της πρωτεΐνης FOXA2 του αρουραίου μεταλλάχθηκε σε αλανίνη με αλλαγή μίας βάσης (CMV-FOXA2-T156A) χρησιμοποιώντας ως αρχικό πλασμίδιο (template) το φορέα CMV-HNF-3β και τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις μεταλλαξιγενέσεις (ανά ζεύγη).

Πίνακας 6: Παρουσίαση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταλλαξιγένεση (ανά ζεύγη) και συνοπτική περιγραφή του σκοπού σε κάθε περίπτωση.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Σκοπός
ABCA1-Foxa2-A-M1F-m	εκκινητής #1 5' - AGGCCTTTGAAAGGACGGCCAAAGACAAAGACAAA - 3'	Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση στην περιοχή -535/-503 του υποκινητή του ABCA1. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές στην πιθανή θέση πρόσδεσης A (site A) του μεταγραφικού παράγοντα Foxa2.
ABCA1-Foxa2-A-M1R-m	εκκινητής #2 5' - TTTGTCTTGTCCTTTGGCGTCCTTTCAAAGGCCT - 3'	
ABCA1-Foxa2-B-M1F-m	εκκινητής #1 5' - TGA CTGAACTACATACGGCCGAGGCCGGGAAGGG - 3'	Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση στην περιοχή -122/-90 του υποκινητή του ABCA1. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές στην πιθανή θέση πρόσδεσης B (site B) του μεταγραφικού παράγοντα Foxa2.
ABCA1-Foxa2-B-M1R-m	εκκινητής #2 5' - CCC TCCCGGCCTCGGGTATGTAGTTCAGTCA - 3'	
ABCA1-TATA-M2F-m	εκκινητής #1 5' - TGCAGCCGAATCGGTACACAGGAACTAGTCCCG - 3'	Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση στην περιοχή -36/-5 του υποκινητή του ABCA1. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές στο TATA-box. Η θέση περιορισμού Kpn I είναι υπογραμμισμένη.
ABCA1-TATA-M2R-m	εκκινητής #2 5' - CGGGACTAGTTCCTGGTACCGATTCCGGCTGCA - 3'	
ABCA1-TATA-M4F-m	εκκινητής #1 5' - TGCAGCCGAGCGTATAAACTGACTAGTCCCG - 3'	Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση στην περιοχή -36/-5 του υποκινητή του ABCA1. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές εκατέρωθεν του TATA-box.
ABCA1-TATA-M4R-m	εκκινητής #2 5' - CGGGACTAGTCAAGTTTATACGCTCGGCTGCA - 3'	
rFoxa2-156A-F	εκκινητής #1 5' - TACCGGCGCAGCTACGCTCACGCCAAGCCTCCC - 3'	Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση της θρεονίνης στη θέση 156 στην πρωτεΐνη Foxa2 του αρουραίου. Με κόκκινο σημειώνεται η σημειακή μεταλλαγή.
rFoxa2-156A-R	εκκινητής #2 5' - GGGAGGCTTGGCGTGAGCGGTAGCTGCCCGGTA - 3'	
ABCG1-391F	εκκινητής #1 5' - CCCGTGCTGGCCCGAGTCCCGCGAGTTCGGG-3'	Εκκινητές για τη μεταλλαξιγένεση C>T στη θέση -376 στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1. Με κόκκινο σημειώνεται η σημειακή μεταλλαγή.
ABCG1-361R	εκκινητής #2 5' - CCCGAACTCGCGGGGACTGGCCAGCACGGG-3'	

Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν η ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά HepG2, τα ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα εμβρύου HEK293T, η κυτταρική σειρά 911 και τα εμβρυϊκά κύτταρα Δροσόφιλας S2 (Schneider's). Τα κύτταρα HepG2, HEK293T και 911 διατηρούνται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει 4,5 g/L D-γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% FBS (ορός εμβρύου βοοειδούς) και 1% P/S (πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη). Για πειράματα που αφορούν τη δράση πυρηνικών υποδοχέων χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα HepG2 που διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει 1 g/L D-γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% FBS (ορός εμβρύου βοοειδούς) και 1% P/S (πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη). Τα εμβρυϊκά κύτταρα Δροσόφιλας S2 (Schneider's) διατηρούνται στους 25°C σε θρεπτικό μέσο Shields and Sang M3 Insect Medium, εμπλουτισμένο με 10% FBS (ορός εμβρύου βοοειδούς) και 1% P/S (πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη).

Αφαίρεση ορμονών από τον ορό (Charcoal Stripped Serum, CSS)

Στις περιπτώσεις που απαιτούνται πολύ χαμηλά επίπεδα ορμονών ο ορός (FBS) που χρησιμοποιήθηκε είχε υποβληθεί σε επεξεργασία με κάρβουνο (charcoal) και δεξτράνη (dextran). Η επεξεργασία αυτή απομακρύνει λιπόφιλες ενώσεις και κατά συνέπεια μειώνει την περιεκτικότητα του ορού σε χοληστερόλη και σε ορμόνες όπως η εστραδιόλη, η προγεστερόνη, η κορτιζόλη, η τεστοστερόνη, η T3 και η T4.

Σε 50 ml FBS προσθέτουμε:

- ✓ 0,125g charcoal
- ✓ 0,0125g dextran
- ✓ Ανάδευση και τοποθέτηση στους 56°C για 30 λεπτά (ανάδευση ανά 5 λεπτά)
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3000rpm
- ✓ Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάκι (falcon) των 50ml και προσθήκη:
 - ✓ 0,125g charcoal
 - ✓ 0,0125g dextran
- ✓ Ανάδευση και τοποθέτηση στους 37°C για 30 λεπτά (ανάδευση ανά 5 λεπτά)
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3000rpm
- ✓ Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό falcon

- ✓ Αποστείρωση με φίλτρο 0,22 μm
- ✓ Αποθήκευση στους -20°C

Παροδικές διαμολύνσεις

Οι παροδικές διαμολύνσεις που σκοπό είχαν τη μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης (luc assays) πραγματοποιήθηκαν σε τριβλία με έξι πηγαδάκια (6-well plates) για τις κυτταρικές σειρές HepG2 και HEK293T, και σε τριβλία με δώδεκα πηγαδάκια (12-well) για τα S2. Για την έκφραση πρωτεϊνών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε αλληλεπιδράσεις οι παροδικές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριβλία p60 ή p100. Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικοί υποδοχείς και οι αντίστοιχοι συνδέτες (ligands) τα κύτταρα μεγάλωσαν στο αντίστοιχο θρεπτικό με 5% CSS (charcoal stripped serum).

Κατάλληλος αριθμός κυττάρων τοποθετείται στα τριβλία και επωάζεται για 24 ώρες. Κατόπιν πραγματοποιείται η διαμόλυνση με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου. Για το σκοπό αυτό παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα που περιέχει το DNA και CaCl₂ (2M). Στο μίγμα DNA και CaCl₂ προστίθεται ίσος όγκος 2x Hebes Buffered Saline (HBS) με συνεχή ανακίνηση (vortex). Το τελικό μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά προτού προστεθεί στα κύτταρα με ήπια ανακίνηση. Τα κύτταρα επωάζονται στη συνέχεια για 16-18 ώρες και κατόπιν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας προκειμένου να αντικατασταθεί από φρέσκο (εκτός από τα S2). Τα κύτταρα επωάζονται για ακόμη 24 ώρες προτού συλλεχθούν για τις αντίστοιχες πειραματικές διαδικασίες. Οι συνδέτες και οι αναστολείς (9-*cis*-retinoic acid, 22-(*R*)-hydroxycholesterol, LY294002) προστίθενται μετά την αλλαγή θρεπτικού και παραμένουν στα κύτταρα για περίπου 24 ώρες.

Για την εξισορρόπηση του ποσού DNA των δειγμάτων και την κάλυψη του απαραίτητου ποσού DNA για τον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων χρησιμοποιήθηκε DNA σπέρματος σολωμού (salmon sperm). Στα πειράματα που περιελάμβαναν μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης (luc assays) χρησιμοποιήθηκε φορέας έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης (1μg/well) προκειμένου να γίνει η εξισορρόπηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων (CMV-β-gal ή actin-β-gal). Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς S2 χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος φορέας έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης που είναι ο hs-lacZ.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι συνθήκες παροδικής διαμόλυνσης στα διαφορετικά τριβλία για τις τρεις κυτταρικές σειρές:

Τριβλίο	αριθμός κυττάρων			DNA (μg)	CaCl ₂ 2M (μl)	H ₂ O (μl)	2xHBS (μl)
	HepG2	HEK293T	S2				
12-well			10 ⁶	3	7,75	μέχρι 62,5	62,5
6-well	500.000	250.000		6	15,5	μέχρι 125	125
p60	10 ⁶	500.000		15	31	μέχρι 250	250
p100	2x10 ⁶	10 ⁶		30	31	μέχρι 250	250

2x HBS	
NaCl	274mM
KCl	10mM
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	1,5mM
Dextrose	12mM
Hepes	42mM
pH 7±0,1	

Συλλογή κυττάρων και μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης

HepG2, HEK293T

- ✓ Απομάκρυνση θρεπτικού από τα πηγαδάκια
- ✓ Προσθήκη 1ml 1x PBS (phosphate buffer saline) και απομάκρυνση
- ✓ Προσθήκη 200-250μl 1x διαλύματος λύσης (Promega Lysis Buffer)
- ✓ Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση σε πλατφόρμα
- ✓ Συλλογή των κυττάρων, ισχυρή ανάδευση (vortex) και τοποθέτηση στους -80°C για 15 λεπτά
- ✓ Ξεπάγωμα στους 37 °C για 2 λεπτά, ισχυρή ανάδευση (vortex)
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου

Το εκχύλισμα των κυττάρων στη συνέχεια χρησιμοποιείται για μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.

S2

- ✓ Συλλογή των κυττάρων από τα πηγαδάκια με πιπέτα
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου

- ✓ Προσθήκη 1ml 1x PBS (phosphate buffer saline) και επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων με πιπέτα
 - ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
 - ✓ Προσθήκη 200 μl 1x διαλύματος λύσης (Promega Lysis Buffer) και επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων με πιπέτα
 - ✓ Τοποθέτηση στους -80°C για 15 λεπτά
 - ✓ Ξεπάγωμα στους 37 °C για 2 λεπτά, ισχυρή ανάδευση (vortex)
 - ✓ Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Το εκχύλισμα των κυττάρων στη συνέχεια χρησιμοποιείται για μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.

Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης

60μl από το κυτταρικό εκχύλισμα αναμιγνύονται με 60μl από το υπόστρωμα (PROMEGA) και τοποθετούνται στην ειδική συσκευή μέτρηση της φωταύγειας (lunimometer) όπου μετρώνται οι σχετικές μονάδες φωτός (Relative Light Units) που απελευθερώνονται.

Μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης

- ✓ Ετοιμασία μίγματος για κάθε δείγμα:

456 μl Phosphate buffer

132 ONPG (8mg/ml)

6μl Mg²⁺ Buffer (Salt)

- ✓ Προσθήκη των 594μl του μίγματος σε 5-20μl εκχυλίσματος κυττάρων
- Στο τυφλό χρησιμοποιούμε ίση ποσότητα διαλύματος λύσης στη θέση του εκχυλίσματος των κυττάρων.
- ✓ Ανάμιξη και επώαση στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη κίτρινου χρώματος
 - ✓ Διακοπή της αντίδρασης με την προσθήκη 200μl NaCO₃ 1M
 - ✓ Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 410nm

Sodium Phosphate buffer (P buffer) 0,1M - pH 7.3:

Το pH διαλύματος Na₂HPO₄ 0,1M ρυθμίζεται στο 7.3 χρησιμοποιώντας διάλυμα NaH₂PO₄ 0,1M.

ONPG

Το O-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG) διαλύεται σε P buffer σε τελική συγκέντρωση 8mg/ml.

Mg²⁺ Buffer (Salt)	
KCl 3M	333 μl
MgCl ₂ 1M	100 μl
β-mercaptoethanol	352 μl
H ₂ O	215 μl

Κυτταρικά εκχυλίσματα

A. Λύση των κυττάρων με Co-IP Lysis Buffer

- ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού από το τριβλίο (π.χ. ενός p100)
- ✓ Προσθήκη 5ml κρύου 1x PBS
- ✓ Αφαίρεση του PBS
- ✓ Προσθήκη 1ml κρύου 1x PBS
- ✓ Ξύσιμο των κυττάρων από το τριβλίο
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 5000rpm, 4°C
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη κρύου Co-IP Lysis Buffer (συνήθως 250μl) στο οποίο πριν τη χρήση προστίθενται:

PMSF 10 μl / ml από 100 mM stock solution

Benzamide 1 μl / ml από 0,5 M stock solution

- ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας με πιπέτα
- ✓ Περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 13000rpm, 4°C
- ✓ Συλλογή του υπερκειμένου

Co-IP Lysis Buffer	
Tris-Cl pH7.5	20mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%

B. Λύση των κυττάρων με WCE Lysis Buffer

- ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού από το τριβλίο (π.χ. ενός p100)
- ✓ Προσθήκη 5ml κρύου 1x PBS

- ✓ Αφαίρεση του PBS
- ✓ Προσθήκη 1ml κρύου 1x PBS
- ✓ Ξύσιμο των κυττάρων από το τριβλίο
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 5000rpm, 4°C
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη κρύου WCE Buffer (συνήθως 250μl) στο οποίο πριν τη χρήση προστίθενται το DTT και οι αναστολείς πρωτεασών (PMSF και benzamidine) όπως αναφέρθηκε στο Co-IP Lysis Buffer
- ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας με πιπέτα
- ✓ 3 κύκλοι παγώματος (στους -80°C) – ξεπαγώματος (στον πάγο)
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 13000rpm, 4°C
- ✓ Συλλογή του υπερκειμένου

WCE Buffer	
Tris-HCl pH 7.4	20mM
KCl	400mM
Glycerol	10%
DTT	2mM

Μέτρηση ποσότητας πρωτεϊνών (μέθοδος Lawry)

Για τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια της Bio-Rad σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας. Για κάθε δείγμα ετοιμάζονται 2 αντιδράσεις:

- ✓ 190μl H₂O
- ✓ 10μl δείγμα / για το τυφλό 10μl από το διάλυμα λύσης
- ✓ 100μl reagent A' (reagent A' = 1ml reagent A + 20μl S)
- ✓ Προσθήκη 800μl reagent B και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Φωτομέτρηση στα 750nm

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται από τη σχέση : $y = \alpha + \beta x$, όπου $y = OD$ και $x = \mu g$ πρωτεΐνης. Τα α και β υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται από τη φωτομέτρηση γνωστών συγκεντρώσεων BSA.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Τα δείγματα των πρωτεϊνών μετά την προσθήκη 4x χρωστικής (Sample Buffer) και βρασμό στους 100°C υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η πηκτή πουακρυλαμίδης παρασκευάζεται στην ειδική συσκευή της Bio-Rad και αποτελείται από δύο τμήματα το κομμάτι συγκέντρωσης των

δειγμάτων (stacking gel) και το κομμάτι διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating ή running gel), του οποίου η πυκνότητα (8,5%, 10,5% ή 12,5%) εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το αντίστοιχο διάλυμα (1x TGS).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή είτε υποβάλλεται σε μεταφορά (transfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western ή σε χρώση με Coomassie.

Separating gel	8.5%	10.5%	12.5%	Stacking gel	
ddH ₂ O	4.6 ml	3.9 ml	3.2 ml	ddH ₂ O	3.6 ml
30% acrylamide	2.8 ml	3.5 ml	4.2 ml	30% acrylamide	900 μl
Separating buffer	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	Stacking buffer	1.5 ml
10% APS	160 μl	160 μl	160 μl	10% APS	60 μl
TEMED	8 μl	8 μl	8 μl	TEMED	6 μl
Όγκος	10 ml	10 ml	10 ml	Όγκος	6 ml

10x TGS		Separating buffer		Stacking buffer	
Tris	30.3 g	Tris	18.165 g 1.5M	Tris	6.05 g 0.5 M
Glycine	144.2 g	SDS	0.4 g 0.4% w/v	SDS	0.4 g 0.4% w/v
SDS	10 g	Όγκος	100 ml	Όγκος	100 ml
Όγκος	1lt	pH (με HCl)	8.8	pH	6.8

Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie

Για τη χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie η πηκτή πολυακρυλαμίδης επωάζεται για περίπου 20 λεπτά με το διάλυμα της χρωστικής Coomassie σε κινούμενη πλατφόρμα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν η περίσσεια χρωστική απομακρύνεται με επώαση με τα διαλύματα αποχρωματισμού fast και slow destaining.

	Fast destaining	Slow destaining
ddH ₂ O	400 ml	875 ml
Methanol	500 ml	75 ml
Acetic acid	100 ml	50 ml
Όγκος	1 litre	

Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ακολουθεί η μεταφορά τους (transfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην ειδική συσκευή της Bio-RAD με το αντίστοιχο διάλυμα (transfer buffer). Στη συνέχεια ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο πρώτο και δεύτερο αντίσωμα:

- ✓ Πλύση της μεμβράνης για 10 λεπτά με TBS-T 0,05% (1x TBS + 0,05% Tween 20)
- ✓ Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε 5% w/v γάλα
- ✓ Επώαση με το πρώτο αντίσωμα στους 4°C O/N

α-HNF-3β	1:500	σε 5% w/v γάλα σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃
α-myc	1:500	σε 5% w/v γάλα σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃
α-Sp1 (H225)	1:500	σε 5% w/v γάλα σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃
α-SREBP-1	1:500	σε 5% w/v γάλα σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃
α-AKT	1:500	σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃
α-actin	1:5000	σε TBS-T 0,05%, 0,02% NaN ₃

- ✓ Πλύση της μεμβράνης τρεις φορές για 10 λεπτά με TBS-T 0,05%
- ✓ Επώαση με 20-25 ml δεύτερου αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου

α-mouse, α-rabbit, α-goat IgG HRP 1:10000 σε 5% w/v γάλα σε TBS-T 0,05%

α-streptavidin-HRP 1:20000 σε TBS-T 0,1%

- ✓ 3 πλύσεις για 10 λεπτά με TBS-T 0,05%
- ✓ 1 πλύση για 5 λεπτά με TBS 1x
- ✓ Κάλυψη της μεμβράνης με το μίγμα του ECL και επώαση για 5 λεπτά στο σκοτάδι
- ✓ Έκθεση σε φιλμ και εμφάνιση

Transfer Buffer		10x TBS	
10x TGS	100 ml	NaCl	180 g
Methanol	200 ml	Tris	121.14 g
ddH ₂ O	700 ml	pH 7.3	(με HCl)
Όγκος	1 lt	Όγκος	2 lt

In vitro αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (GST-pull down assay)

Απομόνωση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης

- ✓ Μετασχηματισμός χημικών επιδεικτικών κυττάρων BL21 E.coli με το πλασμίδιο έκφρασης
- ✓ Μόλυνση με μία αποικία 20 ml θρεπτικού LB με αντιβιοτικό (αμπικιλίνη)
- ✓ Επώαση στους 37°C O/N
- ✓ Μεταφορά 10ml από την καλλιέργεια σε 200 ml θρεπτικό LB+Amp
- ✓ Επώαση στους 37°C, μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600nm (OD600) να είναι 0,6-0,8
- ✓ Προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 0,5-1mM) και επώαση στους 37°C για ~3-4 ώρες
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm, 30 λεπτά, 4°C
- ✓ Επαναδιάλυση πελέτας σε 10 ml κρύο 1xPBS
- ✓ Διαχωρισμός σε 2-3 ίσα μέρη
- ✓ Σπάσιμο των κυττάρων με 6-10 υπερήχους των 30sec με 30 sec κενό ενδιάμεσα για κάθε δείγμα
- ✓ Προσθήκη Triton X-100 (τελική συγκέντρωση 1%)
- ✓ Περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C
- ✓ Διαχωρισμός σε σωληνάκια των 1,5ml
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm, 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Αποθήκευση του υπερκείμενου (1°)
- ✓ Επαναδιάλυση πελετών σε 400μl Solubilization buffer
- ✓ Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- ✓ Προσθήκη Triton X-100 και CaCl₂ (τελικές συγκεντρώσεις 2% και 1mM αντίστοιχα)
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm, 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Αποθήκευση του υπερκείμενου (2°)

Solubilization buffer	
Triethenolamine (7,51M)	25mM
Sarcosyl	1,5% (w/v)
EDTA	1mM

Μικρές ποσότητες από το 1° και το 2° υπερκείμενο αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης προκειμένου να προσδιορισθεί σε ποιο υπερκείμενο εντοπίζεται η πρωτεΐνη.

- ✓ Εξισορρόπηση των σφαιριδίων γλουταθειόνης (glutathione sepharose beads) σε 1xPBS
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm, 5 λεπτά
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
 - ✓ Προσθήκη 10 όγκων 1xPBS
 - ✓ Ανάδευση
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm, 5 λεπτά
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
 - ✓ Προσθήκη ίσου όγκου 1xPBS
 - ✓ Προσθήκη των σφαιριδίων στο υπερκείμενο που εντοπίζεται η πρωτεΐνη
 - ✓ Περιστροφή O/N στους 4°C
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
 - ✓ Προσθήκη κρύου 1xPBS/1% Triton (10 φορές τον όγκο των beads)
 - ✓ Περιστροφή για 5 λεπτά στους 4°C
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
 - ✓ Επανάληψη των 4 παραπάνω σταδίων 2 φορές
 - ✓ Προσθήκη κρύου 1xPBS και μεταφορά των σφαιριδίων σε σωληνάκι 1,5ml
 - ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
 - ✓ Προσθήκη ίσου όγκου 1xPBS
- Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε πάνω στα σφαιρίδια αναλύεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και γίνεται χρώση με Coomassie.

Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών

- ✓ Μεταφορά σε σωληνάκι της απαραίτητης ποσότητας σφαιριδίων με βάση την εικόνα από τη χρώση με Coomassie
- ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
- ✓ Προσθήκη 1ml κρύου 2x Interaction Buffer
- ✓ Ανάδευση
- ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου
- ✓ Προσθήκη 200μl 2x Interaction buffer
- ✓ Προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος, που προέκυψε μετά από λύση των κυτάρων με WCE Lysis Buffer
- ✓ Προσθήκη H₂O μέχρι τα 400μl

- ✓ Περιστροφή O/N στους 4°C
- ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη 1ml Washing Buffer με 100mM ή 250mM KCl
- ✓ Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Επανάληψη του πλυσίματος 1-2 φορές
- ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη χρωστικής 4x και βράσιμο στους 100°C

Τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση και ανάλυση κατά Western.

2x Interaction buffer		Washing buffer	
Hepes pH 7.9	40mM	KCl	100mM/250mM
MgCl ₂	10mM	Hepes pH 7.9	20mM
NP40	0,4%	MgCl ₂	5mM
BSA	0,4%	NP40	0,2%
Glycerol	15%		

***In vivo* αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (Biotinylation assay)**

Έκφραση πρωτεϊνών σε HEK293T

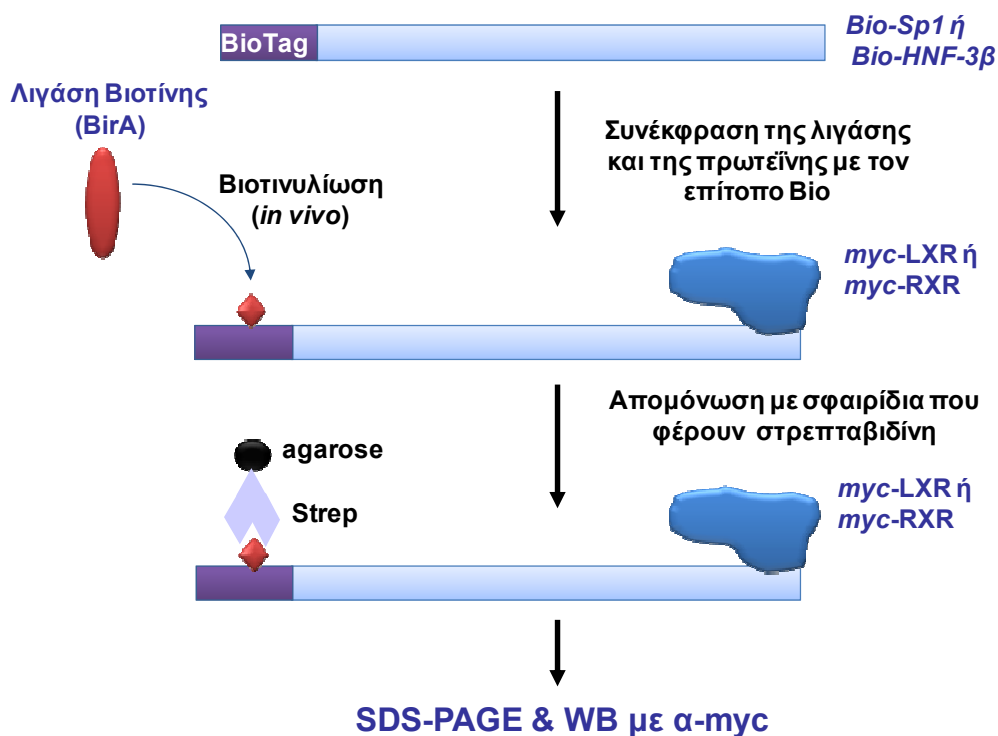
Κύτταρα HEK293T (10⁶ σε p100) διαμολύνονται με 7,5 μg Bio-Sp1 ή Bio-FOXA2 παρουσία ή απουσία 7,5 μg λιγάσης βιοτίνης BirA. Επιπλέον, τα κύτταρα διαμολύνονται με 7,5 μg *θmyc-LXRα* και 7,5 μg *θmyc-RXRα*. Τα κύτταρα λύνονται σε 250μl Co-IP Lysis Buffer, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα.

Επώαση με τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (streptavidin-agarose beads)

- ✓ Υπολογίζονται 15μl καθαρών σφαιριδίων ανά δείγμα
- ✓ Εξισορρόπηση σφαιριδίων
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 3 λεπτά
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
 - ✓ Προσθήκη 10 όγκων Co-IP Lysis Buffer
 - ✓ Ανάδευση
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 3 λεπτά
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκλειμένου
 - ✓ Προσθήκη ίσου όγκου Co-IP Lysis Buffer
- ✓ Το κυτταρικό εκχύλισμα προστίθεται στα εξισορροπημένα σφαιρίδια

- ✓ Περιστροφή για 3 ώρες, 4°C
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 3 λεπτά
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη 1ml Co-IP Lysis Buffer
- ✓ Περιστροφή για 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκλειμένου
- ✓ Επανάληψη της πλύσης ακόμη 2 φορές
- ✓ Προσθήκη χρωστικής 4x και βράσιμο στους 100°C

Τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση και ανάλυση κατά Western με το αντίσωμα α-myc και το α-Streptavidin-HRP.



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της *in vivo* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, όταν η μία πρωτεΐνη είναι βιοτινυλιωμένη.

Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affinity precipitation)

- ✓ Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 5 μl Dynabeads M-280
 - ✓ 1 πλύση με 500 μl διαλύματος 1x B&W
 - ✓ Προσθήκη 7 μl 2x B&W και 7 μl βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (0,5μM)
- Ως αρνητικό δείγμα τα σφαιρίδια επωάζονται μόνο με 14 μl διαλύματος 1x B&W
- ✓ Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Ετοιμασία βιοτινυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων (ds oligos)

Τα δίκλινα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια ετοιμάζονται ως εξής:

5μg από το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτιδίο

5μg από το συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτιδίο (χωρίς βιοτίνη)

2 μl NEB2 10x buffer

ddH₂O μέχρι τα 20μl

- ✓ Επώαση στους 92°C για 2 λεπτά
- ✓ Σταδιακή ψύξη μέχρι τους 20°C περίπου
- ✓ Προσθήκη ddH₂O για να είναι η τελική συγκέντρωση 5μM
- ✓ Αποθήκευση στους -20°C

Σε ορισμένες περιπτώσεις αντί για βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν τμήματα που ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας έναν από τους βιοτινυλιωμένους εκκινητές (forward). Το προϊόν της PCR απομονώθηκε από πηκτική αгарόζης και χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Η ποσότητα υπολογίστηκε βάσει το ότι για ένα τμήμα 600 βάσεων χρειάζονται 2μg στην αντίδραση.

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα DNAP.

Πίνακας 7: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο DNAP (μόνο οι forward). Περιλαμβάνονται και τα μη βιοτινυλωμένα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως ανταγωνιστές.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Περιοχή	Ιδιότητες
ABCA1-Foxa2-A-F-Bio	5'- Bio-AGGCCTTTGAAAGGAAACAAAAAGACAAAGACAAA - 3'	-535/-503	Περιλαμβάνει την αγρίου τύπου αλληλουχία της θέσης A (για τον FOXA2)
ABCA1-Foxa2-A-M1F-Bio	5' - Bio-AGGCCTTTGAAAGGACGCCCAAAAGACAAAGACAAA - 3'	-535/-503	Περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη στη θέση A (για τον FOXA2)
ABCA1-Foxa2-B-F-Bio	5' - Bio-TGAACTACATAAACACAGAGGCCGGGA - 3'	-118/-94	Περιλαμβάνει την αγρίου τύπου αλληλουχία της θέσης B (για τον FOXA2)
ABCA1-Foxa2-B-M1F-Bio	5' - Bio-TGAACTACATACGCCGAGGCCGGGA - 3'	-118/-94	Περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη στη θέση B (για τον FOXA2)
ABCA1-TATA-F-Bio	5' - Bio-CCGAAATCTATAAAAGGAAGTAAGT - 3'	-31/-9	Περιλαμβάνει την αγρίου τύπου αλληλουχία του στοιχείου TATA
ABCA1-TATA-M2F-Bio	5' - Bio-CCGAAATCGGTACCAGGAAGTAAGT - 3'	-31/-9	Περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη M2 στο TATA-box
ABCA1-TATA-M4F-Bio	5' - Bio-CCGAGCGTATAAACCTGACTAGT - 3'	-31/-9	Περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη M4 στην περιοχή του TATA-box
ABCA1-Bio-LXRE	5' - Bio-CACAGGCTTTGACCGATAGTAACCTCTGCGCTCGAATTCC - 3'	-71/-38	Περιλαμβάνει το LXRE (-62/-47)
ABCA1-Foxa2-A-F	5' - AGGCCTTTGAAAGGACGCCCAAAAGACAAAGACAAA - 3'	-535/-503	μη βιοτινυλωμένο ολιγονουκλεοτίδιο για τη θέση A
ABCA1-Foxa2-B-F	5' - TGAACCTACATAAACACAGAGGCCGGGA - 3'	-118/-94	μη βιοτινυλωμένο ολιγονουκλεοτίδιο για τη θέση B
ABCA1-TATAwt-35	5' - CAGCCGAATCTATAAAAGGAAGTAAGTCCCGGCAAGAAATTC - 3'	-34/-1	μη βιοτινυλωμένο ολιγονουκλεοτίδιο για το TATA-box
ABCG1-391wt-F-Bio	5' - Bio-CCCGTGCTGGCCCAAGCCCGGAGTTCGGG - 3'	-391/-361	Περιλαμβάνει το αλληλόμορφο -376C στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1
ABCG1-391mut-F-Bio	5' - Bio-CCCGTGCTGGCCCAAGTCCCGGAGTTCGGG - 3'	-391/-361	Περιλαμβάνει το αλληλόμορφο -376T στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1

Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)

- ✓ Τα κύτταρα τοποθετούνται σε p100 πιάτο και επωάζονται για 48 ώρες περίπου
 - ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού
 - ✓ 1 πλύση με 7ml θρεπτικού (DMEM)
 - ✓ Προσθήκη 9ml θρεπτικού
 - ✓ Προσθήκη 1ml formaldehyde (10%) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακίνηση
 - ✓ Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ή στους 37°C)
 - ✓ Προσθήκη 1ml γλυκίνης (1,375M) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακίνηση
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ 3 πλύσεις με 10 ml 1x PBS/0,5mM PMSF
 - ✓ Προσθήκη 7 ml 1x PBS/0,5% NP-40/0,5mM PMSF
 - ✓ Ξύσιμο των κυττάρων και μεταφορά σε falcons 15ml
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας σε 5ml Swelling buffer
 - ✓ Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά
 - ✓ Σπάσιμο των κυττάρων με το μηχάνημα "Dounce" (ταχύτητα 2,5-3), 20-30 φορές για κάθε δείγμα
- Έλεγχος των κυττάρων για να διαπιστωθεί αν έχουν σπάσει ικανοποιητικά και ελευθερώθηκαν οι πυρήνες:
- πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα αναμιγνύονται 5μl Trypan Blue (0,4% σε PBS) και 5μl από το δείγμα
 - παρατήρηση στο μικροσκόπιο: όσο περισσότερα κύτταρα έχουν βάψει μπλε τόσο πιο αποτελεσματική ήταν η διαδικασία
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας σε 2ml Sonication buffer
 - ✓ Σπάσιμο της χρωματίνης με 10-14 υπέρηχους (sonication) των 30 sec σε 50% ένταση (ανάμεσα στον κάθε κύκλο υπέρηχων μεσολαβεί διάστημα 5 λεπτών στον πάγο)
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 15 λεπτά, 4°C
 - ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου σε σωληνάκια των 1,5 ml
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 15 λεπτά, 4°C
 - ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου σε σωληνάκια των 1,5 ml

- ✓ 50μl από το κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται για έλεγχο ενώ η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύεται στους -80°C
- ✓ Στα 50μl προστίθενται 150μl H₂O και 10,5μl NaCl 4M
- ✓ Επώαση στους 65°C O/N

Καθαρισμός δείγματος ελέγχου:

- ✓ Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- ✓ Ανάμιξη (το μίγμα πρέπει να γίνει ομοιογενές)
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 5 λεπτά, RT
- ✓ Μεταφορά της επάνω φάσης
- ✓ Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο και 1μl γλυκογόνου (20μg/μl)
- ✓ Μεταφορά της επάνω φάσης
- ✓ Προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2^{1/2} όγκους απόλυτη αιθανόλη
- ✓ Ανάμιξη και επώαση στους -80°C για 30 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 500 μl 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Στέγνωμα της πελέτας και επαναδιάλυση σε 20μl H₂O
- ✓ Έλεγχος της ποιότητας του δείγματος σε πηκτική αγαρόζης 1%

Αν η χρωματίνη έχει σπάσει σε κομμάτια μικρότερα των 1000 βάσεων, ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Για το κάθε δείγμα αρχικά απαιτούνται:
20 μl καθαρά σφαιρίδια protein G για το μέρος στο οποίο δεν θα προστεθεί αντίσωμα (-ab),
20 μl για το μέρος στο οποίο θα προστεθεί το αντίσωμα, και
40 μl για το preclearing της χρωματίνης
- ✓ Προσθήκη 1,5ml Sonication Buffer
- ✓ Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Επανάληψη 2 φορές των 4 παραπάνω σταδίων
- ✓ Προσθήκη 494μl Sonication Buffer + 5μl BSA (100mg/ml) + 1μl λDNA (0,5μg/μl)
- ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- ✓ Μεταφορά από 150μl beads σε 2 σωληνάκια και αποθήκευση στους 4°C

- ✓ Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων beads (για preclearing) στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Ξεπάγωμα της χρωματίνης από τους -80°C
 - ✓ Προσθήκη στα σφαιρίδια 1500μl από τη χρωματίνη
 - ✓ Προσθήκη 15μl BSA (100mg/ml) και 3μl λ DNA (0,5μg/μl)
 - ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
 - ✓ Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι και μέτρηση του όγκου
 - ✓ Η χρωματίνη μοιράζεται εξίσου σε 2 νέα σωληνάκια, ενώ σε ένα τρίτο αποθηκεύεται στους -20°C το 1/10 του όγκου που μεταφέρθηκε σε κάθε σωληνάκι (input)
 - ✓ Στο πρώτο σωληνάκι δεν προστίθεται αντίσωμα (-ab) ενώ στο δεύτερο προστίθεται το αντίσωμα (20μl για α-Sp1, α-RXR και α-HNF-3β) (+ab)
 - ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
 - ✓ Φυγοκέντρηση των σφαιριδίων που ήταν αποθηκευμένα στους 4°C στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Προσθήκη των δειγμάτων (-ab, +ab) στα καθαρά σφαιρίδια
 - ✓ Περιστροφή στους 4°C O/N
 - ✓ 2 πλυσίματα με το Wash buffer A
- Το κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει 10 λεπτά περιστροφή στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
- ✓ 2 πλύσεις με 1ml Wash buffer B
 - ✓ 2 πλύσεις με 1ml Wash buffer C
 - ✓ 2 πλύσεις με 1ml TE buffer
 - ✓ Προσθήκη 150μl Elution buffer (φρέσκο)
 - ✓ Vortex
 - ✓ Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
 - ✓ Vortex
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 1 λεπτό, RT
 - ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου (150μl) σε νέο σωληνάκι
 - ✓ Προσθήκη 150μl Elution buffer
 - ✓ Vortex
 - ✓ Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
 - ✓ Vortex
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 1 λεπτό, RT

- ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου στο σωληνάκι του προηγούμενου υπερκειμένου (300μl τελικά)
 - ✓ Προσθήκη 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
 - ✓ Για το input προσθήκη Elution buffer μέχρι τα 300μl, 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
 - ✓ Ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση στους 65°C O/N
 - ✓ Προσθήκη 1μl RNAse A (10mg/ml, DNase-free)
 - ✓ Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
 - ✓ Προσθήκη 2μl EDTA (0,5M) και 2μl Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)
 - ✓ Επώαση στους 42°C για 2 ώρες
 - ✓ Προσθήκη 200μl H₂O
 - ✓ Προσθήκη 1/10 του όγκου (42μl) CH₃COONa 3M
 - ✓ Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
 - ✓ Ανάμιξη (το μίγμα πρέπει να γίνει ομοιογενές)
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 5 λεπτά, RT
 - ✓ Μεταφορά της επάνω φάσης
 - ✓ Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο και 1μl γλυκογόνου (20μg/ml)
 - ✓ Μεταφορά της επάνω φάσης
 - ✓ Προσθήκη 2^{1/2} όγκων απόλυτης αιθανόλης και 1μl γλυκογόνο (20 mg/ml)
 - ✓ Επώαση στους -20°C O/N
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 30 λεπτά, 4°C
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
 - ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου
 - ✓ Στέγνωμα της πελέτας και επαναδιάλυση του input σε 100μl 10mM Tris (pH 7,5) και των δειγμάτων σε 50μl 10mM Tris (pH 7,5).
- Τα δείγματα αναλύονται στη συνέχεια με PCR.

Sonication Buffer	Swelling Buffer
25mM Hepes pH 7,9	50mM Hepes pH 7,9
1,5mM MgCl ₂	140mM NaCl
10mM KCl	1mM EDTA
0,5% NP-40	1% Triton X-100
1mM DTT	0,1% Na-deoxycholate
0,5mM PMSF	0,1% SDS
2μg/ml aprotinin	0,5mM PMSF
	2μg/ml aprotinin

Wash Buffer A	Wash Buffer B	Wash Buffer C
50 mM Hepes pH 7,9	50 mM Hepes pH 7,9	20 mM Tris-Cl pH 8
140 mM NaCl	500 mM NaCl	1 mM EDTA
1mM EDTA	1mM EDTA	250 mM LiCl
1% Triton X-100	1% Triton X-100	0,5% NP-40
0,1% Na-deoxycholate	0,1% Na-deoxycholate	0,5% Na-deoxycholate
0,1% SDS	0,1% SDS	0,5mM PMSF
0,5 mM PMSF	0,5 mM PMSF	2μg/ml aprotinin
2μg/ml aprotinin	2μg/ml aprotinin	

TE	Elution Buffer
10mM Tris-Cl pH 8	50mM Tris-Cl pH 8
1mM EDTA	1mM EDTA
	1% SDS
	50mM NaHCO ₃
	χωρίς αναστολείς

Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA έγινε με τη χρήση του Trizol της Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Π.χ. για κύτταρα που καλλιεργούνται σε πιάτο p60

- ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού
- ✓ Προσθήκη 1ml 1x PBS (κρύο) και απομάκρυνση
- ✓ Προσθήκη 1ml TRIZOL
- ✓ Ομογενοποίηση των κυττάρων με πιπέτα και μεταφορά σε σωληνάκια 2ml
- ✓ Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Προσθήκη 200 μl CHCl₃
- ✓ Ανακίνηση για ~10 δευτερόλεπτα (vortex)
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C
- ✓ Μεταφορά της υδατικής φάσης (~500 μl) σε σωληνάκι 1,5ml
- ✓ Προσθήκη 0,5ml ισοπροπανόλης και ανακίνηση
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C, αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Προσθήκη 1ml 75% Et-OH
- ✓ Σύντομη ανακίνηση (vortex)
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C, αφαίρεση του υπερκλειμένου
- ✓ Στέγνωμα της πελέτας στον αέρα
- ✓ Επαναδιάλυση σε 30-50 μl H₂O

Υπολογισμός ποσότητας

5 μl RNA σε 1ml H₂O

[OD 260nm] x 40 x (200/1000) = μg/μl

Απομόνωση πρωτεϊνών σε συνδυασμό με απομόνωση RNA

Μετά τη μεταφορά της υδατικής φάση (~500μl) για να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση RNA στο υπόλοιπο:

- ✓ Προσθήκη 300 μl Et-OH 100%, ανακίνηση
- ✓ Φυγοκέντρηση: 2000g, 5 λεπτά, 4°C
- ✓ Μεταφορά μέρους (500 μl) από το υπερκείμενο σε σωληνάκι 2ml
- ✓ Προσθήκη 1,5ml ισοπροπανόλης, ανακίνηση
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000g, 10 λεπτά, 4°C, αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Όσο το δυνατόν καλύτερη διάλυση της πελέτας σε 2ml υδροχλωρικής γουανιδίνης 0,3M (0,29g/10ml 95% Et-OH)
 - * Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
 - * Φυγοκέντρηση: 7500g, 5 min, 4°C
- ✓ Επανάληψη του πλυσίματος 2 φορές
- ✓ Προσθήκη 2ml 75% Et-OH και ανακίνηση (vortex)
- ✓ Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Φυγοκέντρηση: 7500g, 5 min, 4°C
- ✓ Στέγνωμα της πελέτας στον αέρα
- ✓ Επαναδιάλυση σε 100 μl 1% SDS
 - * Για να διαλυθεί η πελέτα μπορεί να χρειαστεί επώαση στους 50°C
- ✓ Φυγοκέντρηση: 10000g, 1 λεπτό, θερμοκρασία δωματίου

Το υπερκείμενο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη μέθοδο Lowry και να χρησιμοποιηθεί σε Western Blotting.

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription)

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Invitrogen για τη χρήση του ενζύμου SuperScript Rnase H-reverse transcriptase.

- ✓ Ανάμιξη:
 - * 10 μl RNA (100ng/μl)_ 1μg συνολικά
 - * 3 μl Random Primers (100ng/μl)

- * 5 μ l dNTPs (2mM)
- * 15 μ l H₂O

- ✓ 5 λεπτά στους 65°C
- ✓ Σύντομη επώαση στον πάγο
- ✓ Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Προσθήκη
 - * 10 μ l 5x first strand buffer
 - * 5 μ l DTT 0,1M
 - * 1 μ l RNase OUT
- ✓ Ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- ✓ Προσθήκη 1 μ l SuperScript Rnase H-reverse transcriptase
- ✓ Ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- ✓ 50 λεπτά στους 42°C
- ✓ 15 λεπτά στους 70°C (απενεργοποίηση)
- * Όλες οι επωάσεις γίνονται σε μηχανήμα PCR
- * Τελικός όγκος αντίδρασης 50 μ l
- * Το cDNA που παράγεται από την αντίδραση αποθηκεύεται στους -20°C
- * Το cDNA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των επιπέδων των μεταγράφων των διαφόρων γονιδίων με τους εκκινητές του πίνακα 8.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Σκοπός
ABCA1-F	Forward 5' - GAAGCCACAAAAACATTGCTGCAT - 3'	ανίχνευση συνολικών μεταγράφων του γονιδίου ABCA1
ABCA1-R	Reverse 5' - CCTCATACCAGTTGAGAGACTTGAT - 3'	
ABCA1 1F	Forward 5' - ATTGCGAGCGAGAGTGAGTG - 3'	ανίχνευση μεταγράφων από το εξόνιο 1 του γονιδίου ABCA1
ABCA1 2R	Reverse 5' - AAGTGAGGTTCTCCACAGCAGCAAC - 3'	
hFoxa2-F	Forward 5' – GAGCCGTCGACTGGAGCAGCTAC - 3'	ανίχνευση μεταγράφων του ανθρώπινου γονιδίου Foxa2
hFoxa2-R	Reverse 5' – GGCTCAGGCTGGGACTCAAGTGCG - 3'	
GAPDH-5'	Forward 5' – ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου GAPDH για κανονικοποίηση
GAPDH-3'	Reverse 5' – TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3'	

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων των γονιδίων ABCA1, Foxa2 και GAPDH.

Αποσιώπηση της πρωτεϊνικής έκφρασης με siRNA

Τα κύτταρα (HEK293T ή HepG2) διαμολύνονται με scrambled siRNA (5'-CAGTCGCGTTTGGCGACTGG-3') ογ με siRNA ενάντια στην πρωτεΐνη Foxa2 (5'-CAGCAGAGCCCCAACAAGA-3') σε συγκέντρωση 50-200 pmol/6-well σύμφωνα με τις οδηγίες για τη Lipofectamine 2000.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Προετοιμασία κυττάρων (σε τριβλία 6-well)

- ✓ Η καλυπτρίδα αποστειρώνεται σε 100% Et-OH και φλόγα και τοποθετείται στο πηγαδάκι
- ✓ Προσθήκη 500 μl / πηγαδάκι διαλύματος ζελατίνης 0,1%
- ✓ Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- ✓ Αφαίρεση του διαλύματος (aspiration)
- ✓ Πλύσιμο με 1ml DMEM 2 φορές
- ✓ Προσθήκη 1ml θρεπτικού (DMEM με FBS)
- ✓ Προσθήκη ~200.000 κυττάρων / πηγαδάκι (HepG2)

ακολουθεί ο επιθυμητός χειρισμός των κυττάρων και την ημέρα συλλογής τους ακολουθεί η εξής διαδικασία:

- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/well PBS+/-

όλες οι πλύσεις γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου στην περιστρεφόμενη πλατφόρμα

Μονιμοποίηση με π-φορμαλδεΐδη

- ✓ Προσθήκη 1ml/ πηγαδάκι 3% π- φορμαλδεΐδη (σε PBS+/-)
- ✓ Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+/-
- ✓ Προσθήκη 1ml/ πηγαδάκι διαλύματος 0,5% Triton-X 100 σε Buffer 1
- ✓ Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+/-
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+/-/1,5% FBS

πριν την προσθήκη των αντισωμάτων γίνεται πολύ καλή αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τα πηγαδάκια

Επώαση με το πρώτο αντίσωμα

- ✓ Προσθήκη 50 μl/ πηγαδάκι αντισώματος σε αραιώση
1:50 για το α-HNF-3β
1:500 για το α-adenovirus

- ✓ Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C χωρίς ανακίνηση
- ✓ 3 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/well PBS+//1,5% FBS

Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα

- ✓ Προσθήκη 50 μl/ πηγαδάκι αντισώματος σε αραιώση 1:800 (ALEXA-Fluor) (σε PBS+//1,5% FBS)
- ✓ Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι χωρίς ανακίνηση
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+//1,5% FBS
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+//

Χρώση με DAPI

- ✓ Η χρωστική DAPI αραιώνεται 1:250 σε PBS+// και προστίθενται 50μl/ πηγαδάκι
- ✓ Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση
- ✓ 2 πλύσεις από 3 λεπτά με 1,5ml/ πηγαδάκι PBS+//
- ✓ Η καλυπτρίδα τοποθετείται με την πλευρά των κυττάρων προς τα κάτω πάνω σε αντικειμενοφόρο με 15-20 μl διαλύματος γλυκερόλης/PBS (1:1)
- ✓ Η καλυπτρίδα στερεώνεται με βερνίκι νυχιών
- ✓ Παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού

PBS+//		PBS+//FBS		10x Buffer 1	
1xPBS		1xPBS		NaCl	137mM
CaCl ₂	0,9mM	CaCl ₂	0,9mM	KCl	5mM
MgCl ₂	0,5mM	MgCl ₂	0,5mM	Na ₂ HPO ₄	1,1mM
		FBS	1,5%	KH ₂ PO ₄	0,4mM
				Glucose	5,5mM
				NaHCO ₃	4mM
				MgCl ₂	2mM
				EDTA	2mM
				EGTA	20mM
				MES	20mM
					pH 6-6,5

Παραγωγή αδενοϊών και μόλυνση κυττάρων

Για την παραγωγή των αδενοϊών Ad-GFP, Ad-6myc-SREBP-1a, Ad-6myc-SREBP-1c, Ad-6myc-SREBP-2 και Ad-rFoxa2 ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Κατασκευή ανασυνδυσμένου DNA

- ✓ Το γονίδιο κλωνοποιείται αρχικά στο φορέα pAd-Track
 - ✓ Το πλασμίδιο υποβάλλεται σε πέψη με το ένζυμο *PmeI*
 - ✓ Απομόνωση του DNA από πηκτική αγαρόζη
 - ✓ Το κομμένο DNA χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli* BJ5183-AD1 τα οποία είναι ήδη μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pAdEasy
 - ✓ Όλη η ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων από το μετασχηματισμό απλώνεται σε πιάτο καναμυκίνης
 - ✓ Απομονώνεται το DNA ορισμένων αποικιών σε μικρή κλίμακα
 - ✓ Η επιλογή των θετικών κλώνων γίνεται με πέψη με το ένζυμο *PacI*
- Η χαμηλή ζώνη που προκύπτει από την πέψη μπορεί να είναι 3kb ή 4,5kb ανάλογα με τον ανασυνδυασμό. Και οι δύο περιπτώσεις είναι σωστές.
- ✓ Ένας από τους θετικούς κλώνους επιλέγεται και μετασχηματίζεται στα DH10β τα οποία δεν έχουν ικανότητα ανασυνδυασμού
 - ✓ Όλη η ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων από το μετασχηματισμό απλώνεται σε πιάτο καναμυκίνης
 - ✓ Μία αποικία βακτηρίων επιλέγεται και ακολουθεί απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα

Διαμόλυνση κυττάρων 911 με το ανασυνδυσμένο DNA

- ✓ Ορισμένη ποσότητα από το ανασυνδυσμένο DNA υποβάλλεται σε πέψη με το ένζυμο *PacI*
 - ✓ Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη
 - ✓ Επαναδιάλυση της πελέτας του DNA σε H₂O
 - ✓ ~ 4,5 μg από το κομμένο DNA χρησιμοποιούνται για τη διαμόλυνση κυττάρων 911 με Lipofectamine:
- 1,5x10⁶ κύτταρα 911 τοποθετούνται σε τριβλίο p100 με DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% P/S
- 4,5 μg DNA αραιώνονται σε τελικό 50 μl με H₂O
- ετοιμάζονται 2 σωληνάκια:
- A: 50 μl DNA + 450 μl Optimem
- B: 20 μl Lipofectamine + 480 μl Optimem
- ✓ Το περιεχόμενο του A προστίθεται στο B
 - ✓ Ανάμιξη με πιπέτα και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
 - ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού από το τριβλίο και αντικατάσταση με DMEM εμπλουτισμένο με 2% Heat Inactivated Horse Serum (HS) χωρίς αντιβιοτικό

- ✓ Το μίγμα προστίθεται στα κύτταρα μετά το τέλος των 20 λεπτών και επωάζονται O/N
- ✓ Αντικατάσταση του θρεπτικού με φρέσκο DMEM με 2% HS, 1% P/S
- ✓ 48 ώρες αργότερα επιβεβαιώνεται η έκφραση του ιού στο μικροσκόπιο φθορισμού
- ✓ Τα κύτταρα επωάζονται μέχρι να λυθούν, μετά από 14 ημέρες περίπου

Πολλαπλασιασμός του ιού

- ✓ Τα λυμμένα κύτταρα από το τριβλίο p100 συλλέγονται και χρησιμοποιούνται για τη μόλυνση κυττάρων 911 σε φλάσκα T175 με DMEM με 2% HS, 1% P/S
- ✓ Τα κύτταρα λύνονται μετά από 2 ημέρες περίπου και μέρος αυτών χρησιμοποιείται για τη μόλυνση 4-5 φλασκών T175 με κύτταρα 911 σε DMEM με 2% HS, 1% P/S
- ✓ Τα κύτταρα συλλέγονται πριν λυθούν περίπου 1-2 ημέρες μετά τη μόλυνση
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 1000rpm, 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Αφαίρεση του θρεπτικού και επαναδιάλυση σε 1ml θρεπτικού
- ✓ Τοποθέτηση στους -80°C
- ✓ Ξεπάγωμα στους 37 °C, vortex
- ✓ Επανάληψη παγώματος-ξεπαγώματος 2 φορές
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 3500rpm, 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Το υπερκείμενο μοιράζεται σε σωληνάκια και αποθηκεύεται στους -80°C

Υπολογισμός συγκέντρωσης του ιού

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ιών έγινε με τη μέτρηση φθορίζοντων κυττάρων (FFA, Fluorescence Forming Assay).

- ✓ Επικάλυψη τριβλίων 35mm με 1 ml κολλαγόνο (25mg/ml)
- ✓ Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Αφαίρεση του κολλαγόνου και στέγνωμα
- ✓ Ο ιός αραιώνεται σε θρεπτικό μέσο διαδοχικά από 10^2 μέχρι 10^7 σε τελικό όγκο 1,2 ml
- ✓ 1ml από τις αραιώσεις 10^5 , 10^6 , 10^7 προστίθεται αντίστοιχα σε 3 τριβλία με επικάλυψη κολλαγόνου
- ✓ Επώαση για δύο ώρες στους 37°C
- ✓ Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και προσθήκη 2 ml φρέσκου θρεπτικού
- ✓ Επώαση για 48 ώρες στους 37°C
- ✓ Αφαίρεση θρεπτικού μέσου
- ✓ 1 πλύση με 1x PBS
- ✓ Στέγνωμα των τριβλίων για 15-20 λεπτά
- ✓ Προσθήκη 1 ml 3% π- φορμαλδεΐδη

- ✓ Επώαση για 5 λεπτά
- ✓ 1 πλύση με 1x PBS
- ✓ 1 πλύση με PBS-Tween 0,05%
- ✓ Προσθήκη 1 ml 1x PBS και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (για τους ιούς Ad-GFP, Ad-FOXA2 οι οποίοι εκφράζουν GFP)

Για τον ιό της Akt (Ad-myrAkt) μετά την πλύση με PBS-Tween 0,05% ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Προσθήκη 650 µl α-adenovirus (σε αραίωση 1:500)
- ✓ Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ 2 πλύσεις με 1x PBS
- ✓ 1 πλύση με PBS-Tween 0,05%
- ✓ Προσθήκη 50 µl α-mouse-FITC
- ✓ Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C
- ✓ 1 πλύση με 1x PBS
- ✓ Προσθήκη 1 ml 1x PBS και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

Υπολογισμός τίτλου:

π.χ. Αν στο τριβλίο με την αραίωση 10^6 μετρηθούν 8 πράσινα κύτταρα / $0,04\text{cm}^2$ (μικρό τετραγωνάκι) ο τίτλος του ιού είναι $1,6 \times 10^9$ FFU/ ml (8 πράσινα κύτταρα X 200). Συνολική επιφάνεια τριβλίου $0,04\text{cm}^2 \times 200 = 8\text{cm}^2$

Μόλυνση κυττάρων

Στα πειράματα όπου έγινε χρήση των αδενοϊών στα κύτταρα HepG2 το θρεπτικό μία ώρα πριν τη μόλυνση αντικαταστάθηκε με DMEM με 2% HS, 1% P/S. Οι αδενοϊοί προστέθηκαν στα κύτταρα και ακολούθησε επώαση για 3-4 ώρες. Κατόπιν το θρεπτικό αντικαταστάθηκε και πάλι με το επιθυμητό για το συγκεκριμένο πείραμα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 ώρες αργότερα.

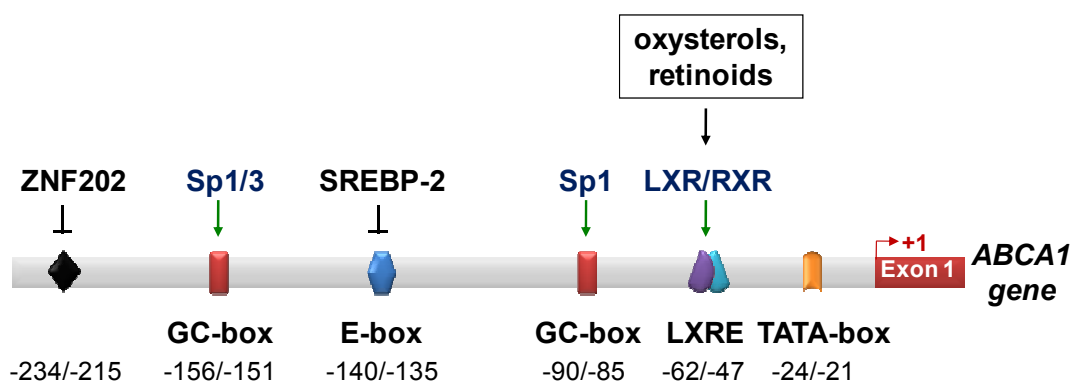
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΚΑΙ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Μέρος Ι

**Ο Ρόλος του Παράγοντα Sp1 στη Ρύθμιση
της Έκφρασης του Γονιδίου ABCA1 από
Οξυστερόλες και Ρετινοϊκό Οξύ**

Η μιθραμυκίνη A εμποδίζει την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή

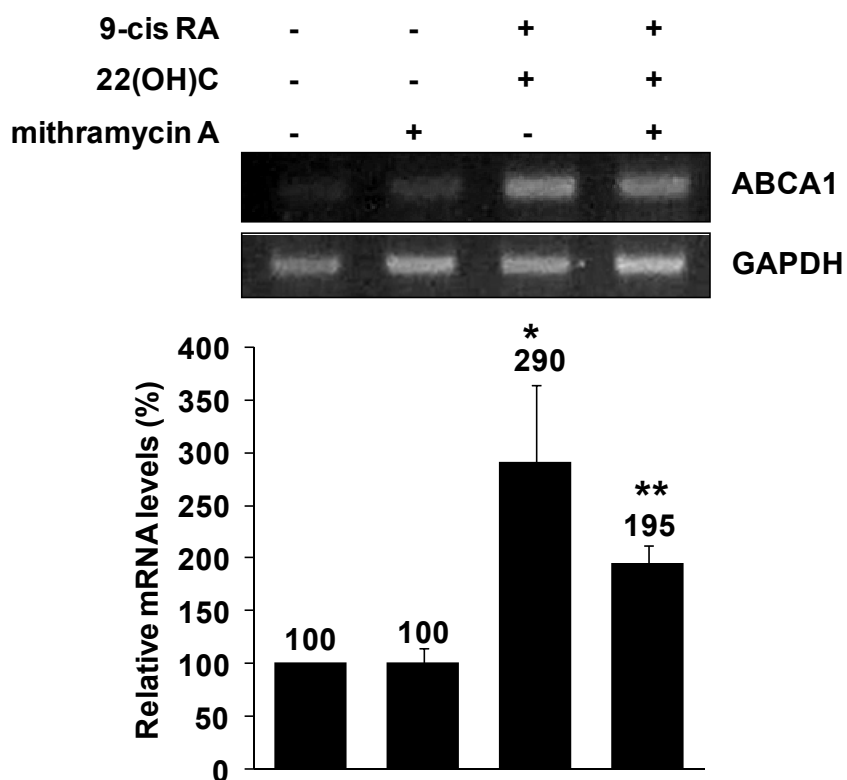
Η κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 περιέχει ένα στοιχείο LXRE (LXR responsive element) στη θέση -62/-47 στο οποίο μπορούν να προσδένονται τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα και να μεσολαβούν στην ενεργοποίηση του υποκινητή από οξυστερόλες και ρετινοειδή (εικόνα 30). Το LXRE περιβάλλεται από δύο GC στοιχεία στις θέσεις -156/-151 και -90/-85, τα οποία αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1 και Sp3.



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση των στοιχείων του DNA και των παραγόντων που ρυθμίζουν την ενεργότητα της κοντινής περιοχής του ABCA1.

Για να διερευνήσουμε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στην επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από το μονοπάτι των LXRα/RXRα, χρησιμοποιήσαμε το χημειοθεραπευτικό φάρμακο μιθραμυκίνη A (mithramycin A). Το φάρμακο αυτό έχει δείχθει ότι αναστέλει στο σύνολο της την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Sp1 και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως εργαλείο για να μελετηθούν διεργασίες της μεταγραφής που εξαρτώνται από τους παράγοντες Sp. Η επίδραση με τη μιθραμυκίνη A στα κύτταρα HEK293T για 24 ώρες δεν επηρέασε τα βασικά επίπεδα mRNA του ABCA1 (εικόνα 31, 1^η σειρά, 2^η θέση). Αντίθετα, η επίδραση με 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ, τους φυσικούς συνδέτες των πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR, αντίστοιχα, οδήγησε σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 κατά 2.9 φορές (εικόνα 31, 1^η σειρά, 3^η θέση). Η επίδραση με μιθραμυκίνη A εμποδισε την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τους συνδέτες (22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ) κατά 35%

περίπου (εικόνα 31, 1^η σειρά, 4^η θέση). Στη 2^η σειρά της εικόνας 31 φαίνεται ότι η μιθραμυκίνη A δεν επηρέασε το γονίδιο ελέγχου GAPDH υποδεικνύοντας ότι η μιθραμυκίνη A δεν έχει αρνητική δράση στο σύνολο της γονιδιακής μεταγραφής. Τα ευρήματα αυτά φανερώουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 απαιτείται για την επαγόμενη αλλά όχι για τη βασική μεταγραφή του γονιδίου ABCA1.

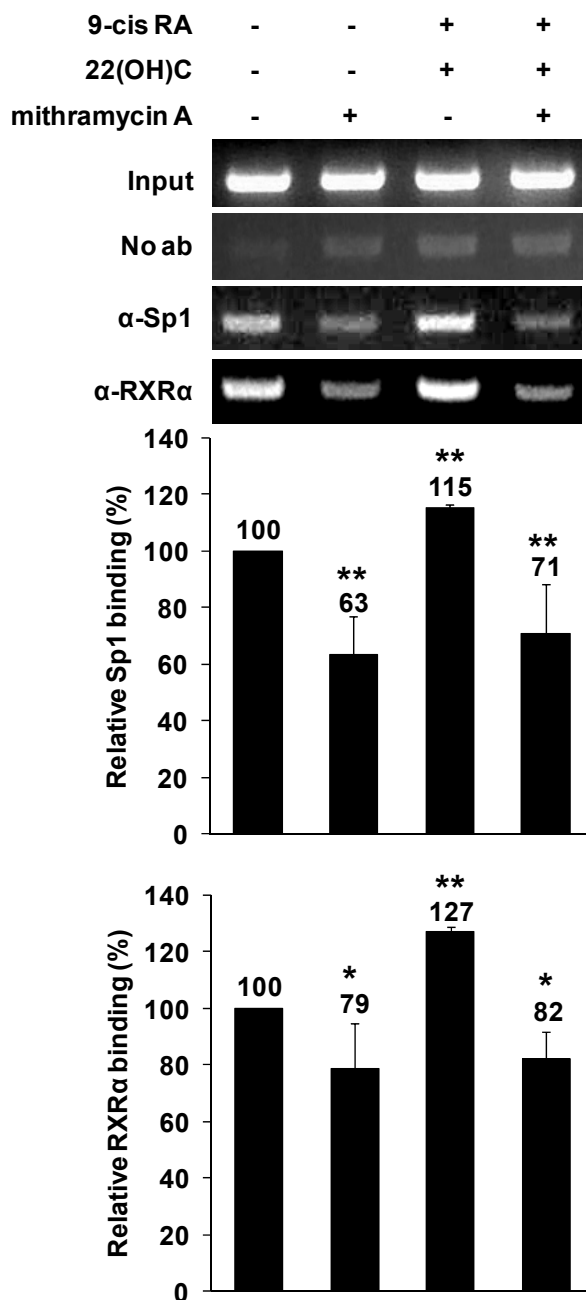


Εικόνα 31: Η μιθραμυκίνη A εμπόδισε την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Κύτταρα HEK293T επωάστηκαν με 22-(R)-υδροξυστερόλη [22(OH)C] και 9-cis-ρετινοϊκό οξύ (10^{-6} M) για 24 ώρες απουσία ή παρουσία μιθραμυκίνης A (0,2μM). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR) και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 προσδιορίστηκαν με PCR για τα συνολικά μετάγραφα του γονιδίου. Προσδιορίστηκαν επίσης και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ελέγχου GAPDH. Οι τιμές από τρία ανεξάρτητα πειράματα κανονικοποιήθηκαν και εμφανίζονται ως ιστόγραμμα στο κάτω μέρος. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

Η μιθραμυκίνη A εμποδίζει τη στρατολόγηση του Sp1 και του RXRα στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1

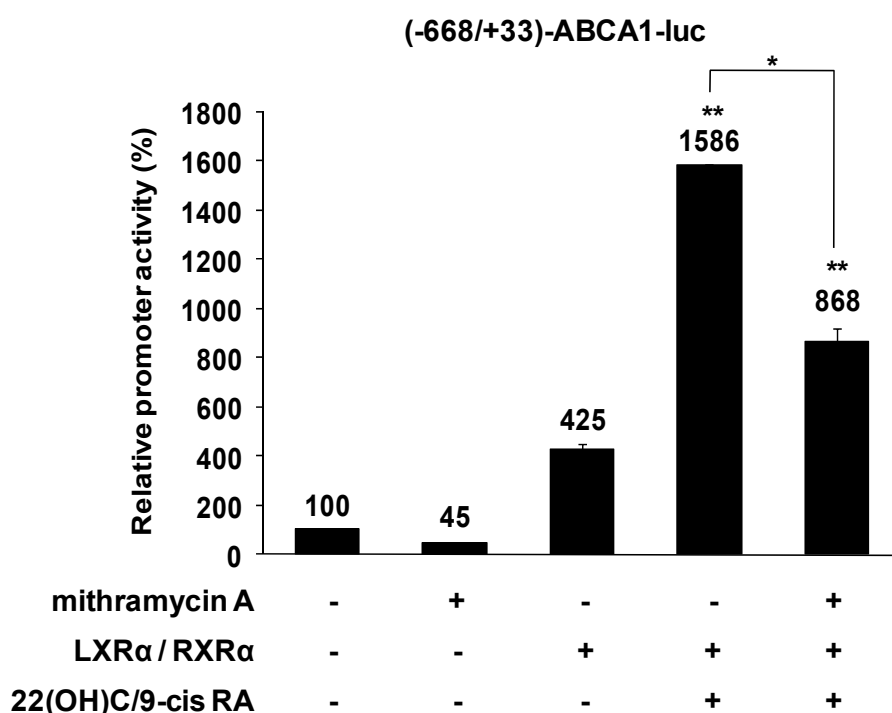
Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης εξετάστηκε η επίδραση της μιθραμυκίνης A στη στρατολόγηση των πυρηνικών

υποδοχέων και του Sp1 στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 *in vivo*. Για το σκοπό αυτό η χρωματίνη από κύτταρα HEK293T κατακρημνίστηκε με τη βοήθεια αντισωμάτων για RXRα και Sp1 και αναλύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για την κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (-204/+205). Παρατηρήσαμε ότι και οι δύο παράγοντες προσδένονται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1 κάτω από βασικές συνθήκες στα κύτταρα HEK293T (εικόνα 32, 3^η και 4^η σειρά, 1^η θέση). Παρουσία της मिθραμικύνης A, όπως φαίνεται στην εικόνα 32, η πρόσδεση του Sp1 στον υποκινητή του ABCA1 δε χάνεται εντελώς (αναστέλλεται κατά 36,7%, τρίτη σειρά, δεύτερη θέση). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι (α) η πρόσδεση του Sp1 στον υποκινητή του ABCA1 μπορεί να είναι άμεση αλλά και έμμεση (μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή) και (β) το ποσοστό του Sp1 που παραμένει στον υποκινητή μπορεί να επαρκεί για τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 (εικόνα 31). Παρατηρήσαμε ωστόσο, ότι η मिθραμικύνη A ανέστειλε τη στρατολόγηση του RXRα στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1 κατά 21,3% (εικόνα 32, 4^η σειρά, 2^η θέση). Η επώαση των κυττάρων με 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ ενίσχυσε την πρόσδεση τόσο του πυρηνικού υποδοχέα RXRα όσο και του Sp1 κατά 1,27 και 1,15 φορές, αντίστοιχα (εικόνα 32, 3^η και 4^η σειρά, 3^η θέση). Η παρουσία της मिθραμικύνης A εμπόδισε την επαγόμενη από τους συνδέτες στρατολόγηση των RXRα και Sp1 στον υποκινητή κατά 35,5% και 38,4%, αντίστοιχα (εικόνα 32, 3^η και 4^η σειρά, 4^η θέση).



Εικόνα 32: Η μιθραμυκίνη Α εμπόδισε την πρόσδεση του Sp1 και του RXRα στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HEK293T επώαστηκαν με 22-(*R*)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ (10^{-6} M) για 24 ώρες απουσία ή παρουσία μιθραμυκίνης Α (0,2μM) και υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με αντισώματα για Sp1 και RXRα ή χωρίς αντίσωμα (δείγμα ελέγχου). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR με εκκινητές για την κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (-204/+205). Στο επάνω μέρος της εικόνας φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα, ενώ στο κάτω μέρος οι τιμές από δύο ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

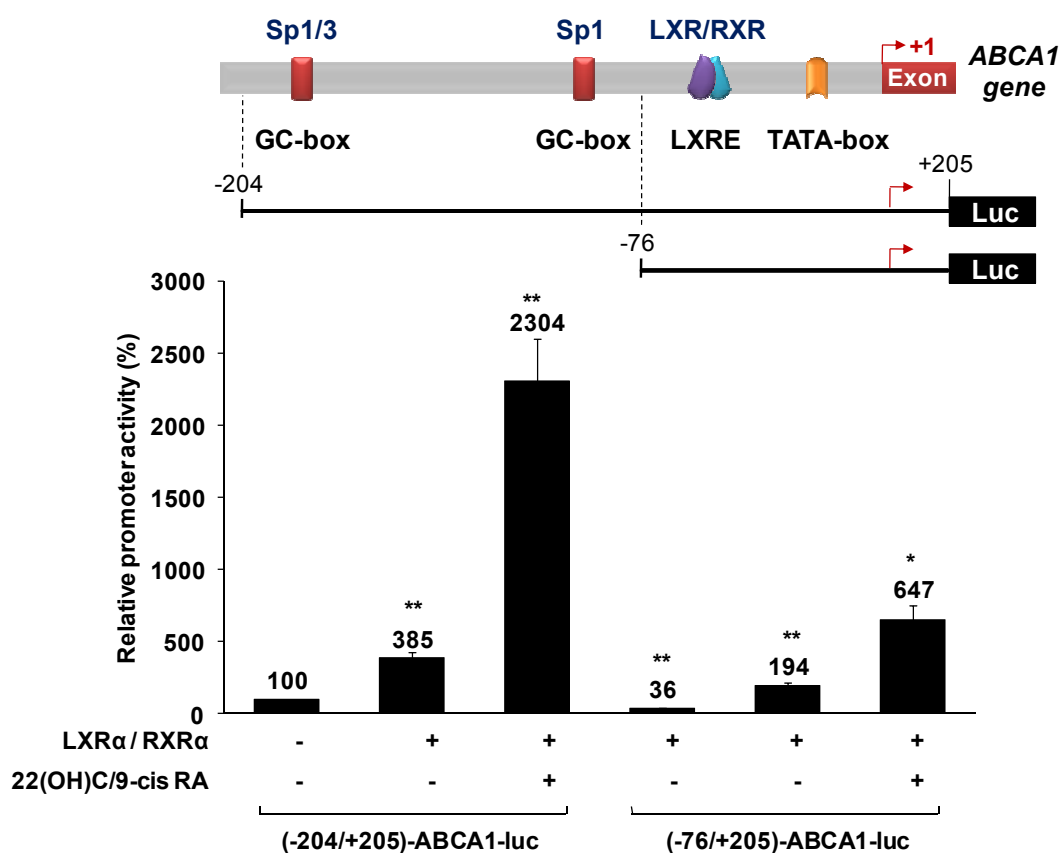
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μείωση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 από τη μιθραμικίνη A είναι μέσω επίδρασης του φαρμάκου στη μεταγραφή του γονιδίου, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στην κυτταρική σειρά HEK293T. Για τις παροδικές διαμολύνσεις χρησιμοποιήσαμε ένα πλασμίδιο στο οποίο είχαμε κλωνοποιήσει την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -668 και +33 μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 33, το τμήμα -668/+33 ενεργοποιείται πολύ ισχυρά από την υπερέκφραση των υποδοχέων LXRα και RXRα παρουσία των συνδετών τους (16 φορές), ενώ η παρουσία της μιθραμικίνης A αναστέλλει αυτή την ενεργοποίηση κατά 50% περίπου σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εικόνας 31.



Εικόνα 33: Η μιθραμικίνη A εμπόδισε την ενεργοποίηση του γονιδίου ABCA1 από τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR/RXR και τους συνδέτες τους. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+33)-ABCA1-luc (50ng) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης, 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) ή μιθραμικίνης A (0,2μM) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

Στη συνέχεια δείξαμε ότι τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους (22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος, αντίστοιχα) ενεργοποίησαν ισχυρά ένα μικρό τμήμα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 που περιλαμβάνει τόσο τα στοιχεία πρόσδεσης των Sp1/Sp3 (GC-boxes) όσο και το LXRE (ABCA1 -204/+205) (Εικόνα 34). Απαλοιφή των δύο μοτίβων πρόσδεσης των

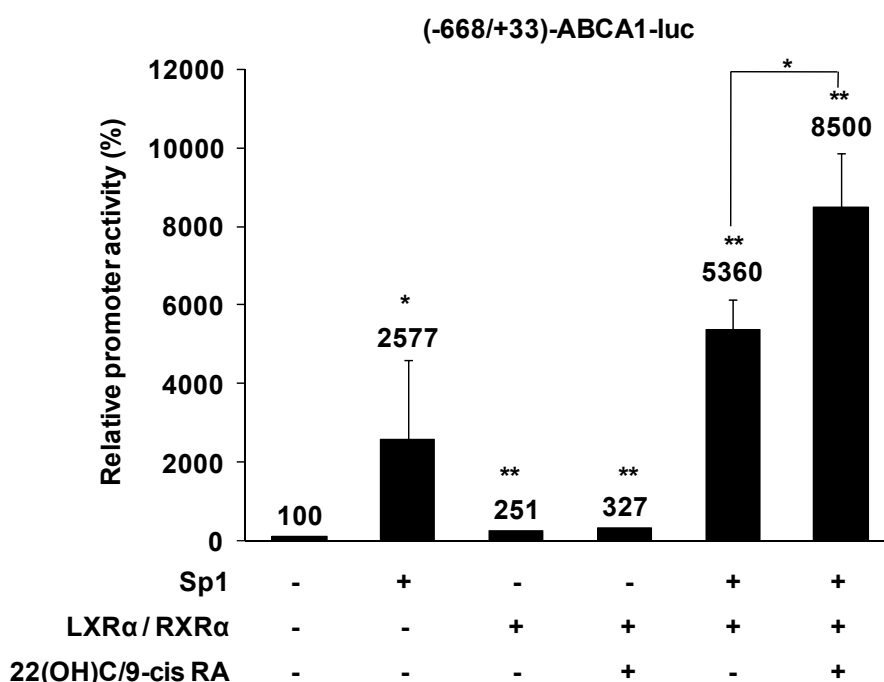
Sp1/Sp3 (ABCA1 -76/+205) δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενεργοποίηση του υποκινητή από τους υποδοχείς LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους (23 φορές έναντι 18). Ωστόσο, η απαλοιφή των θέσεων πρόσδεσης των Sp1/Sp3 μείωσε τη συνολική ενεργότητα του υποκινητή κατά 72% (2300% έναντι 650% ενεργοποίηση σε σχέση με την ενεργότητα του -204/+205 τμήματος σε συνθήκες χωρίς επαγωγή, την οποία αυθαίρετα θεωρούμε 100%). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τη συμμετοχή των μεταγραφικών παραγόντων Sp στο μηχανισμό της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου ABCA1.



Εικόνα 34: Η απαλοιφή των θέσεων Sp1 μείωσε την επαγωγή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-204/+205)-ABCA1-luc και (-76/+205)-ABCA1-luc (50ng το καθένα) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

Η βέλτιστη επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή απαιτεί το μεταγραφικό παράγοντα Sp1

Προκειμένου να διερευνήσουμε την αναγκαιότητα του Sp1 στη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή, χρησιμοποιήσαμε τα εμβρυϊκά κύτταρα Δροσόφιλας S2 τα οποία δε διαθέτουν ενδογενές Sp1 ή σχετικούς παράγοντες. Το κυτταρικό αυτό σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες μεταγραφικών μηχανισμών που βασίζονται στον παράγοντα Sp1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 35, η υπερέκφραση του Sp1 στα κύτταρα S2 οδήγησε σε ισχυρή ενεργοποίηση του τμήματος -668/+33 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (25,8 φορές), επιβεβαιώνοντας το ρόλο αυτού του παράγοντα ως ισχυρού ρυθμιστή της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1. Αντίθετα, παρατηρήσαμε μια σχετικά μικρή ενεργοποίηση του υποκινητή από την υπερέκφραση των LXRα/RXRα τόσο απουσία όσο παρουσία των συνδετών τους (2-3 φορές). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταυτόχρονη έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων και του Sp1 οδήγησε σε συνεργατική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (53,6 φορές), η οποία ενισχύθηκε περαιτέρω από την προσθήκη των συνδετών τους (85 φορές), υποδηλώνοντας τη λειτουργική συνεργατικότητα ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες πάνω στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1.

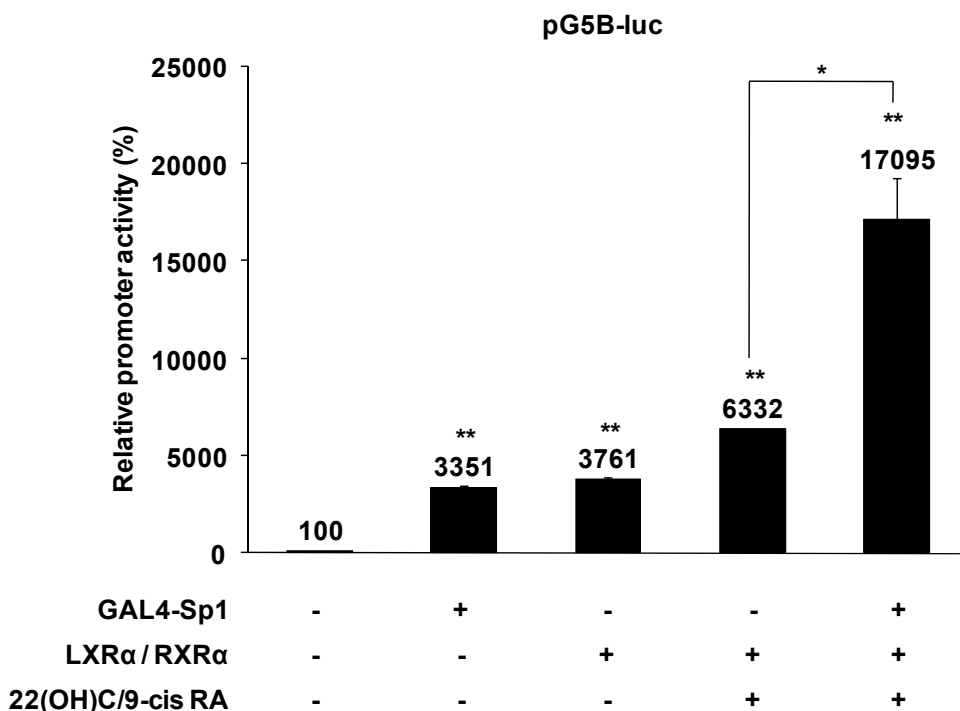


Εικόνα 35: Η βέλτιστη επαγωγή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή απαιτεί τον παράγοντα Sp1. Κύτταρα Schneider's S2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+33)-ABCA1-luc (1μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τον Sp1 και τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

Τα ευρήματα των εικόνων 34 και 35 υποδηλώνουν ότι η βέλτιστη ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή απαιτεί επιπρόσθετα του στοιχείου πρόσδεσης LXRE, την παρουσία των θέσεων πρόσδεσης Sp1 στις θέσεις -90/-85 και -156/-151 καθώς και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των ετεροδιμερών LXRα/RXRα.

Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXRα και RXRα

Με το σύστημα ενεργοποίησης GAL4 μπορέσαμε και δείξαμε τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των ετεροδιμερών LXRα/RXRα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα HEK293T χρησιμοποιώντας τον παράγοντα Sp1 σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ισχυρού ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 και ένα τεχνητό υποκινητή αποτελούμενο από πέντε επαναλήψεις της θέσης πρόσδεσης του GAL4 (pG5B-luc). Χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα, μπορέσαμε να δείξουμε ότι παρουσία των συνδετών τους, τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα ενίσχυσαν την μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-Sp1 πέντε φορές (εικόνα 36). Καθώς ο τεχνητός υποκινητής G5B δεν περιέχει θέσεις πρόσδεσης για LXR/RXR, θεωρούμε ότι, σε αυτό το σύστημα, οι δύο πυρηνικοί υποδοχείς δρουν ως υπερ-ενεργοποιητές (super-activators) του Sp1 (εικόνα 36).

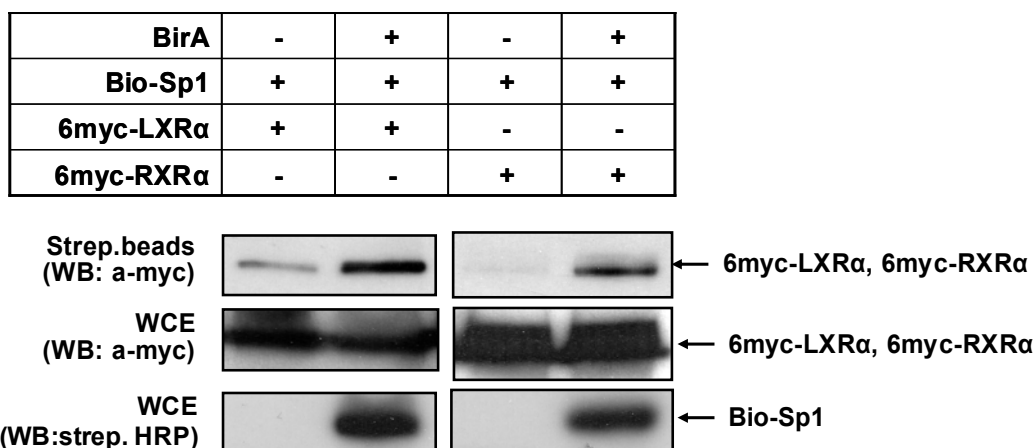


Εικόνα 36: Τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους ενίσχυσαν τη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-Sp1. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο pG5B-luc (1μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τον GAL4-Sp1 και τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$ και **, $p < 0,001$.

Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXRα και RXRα

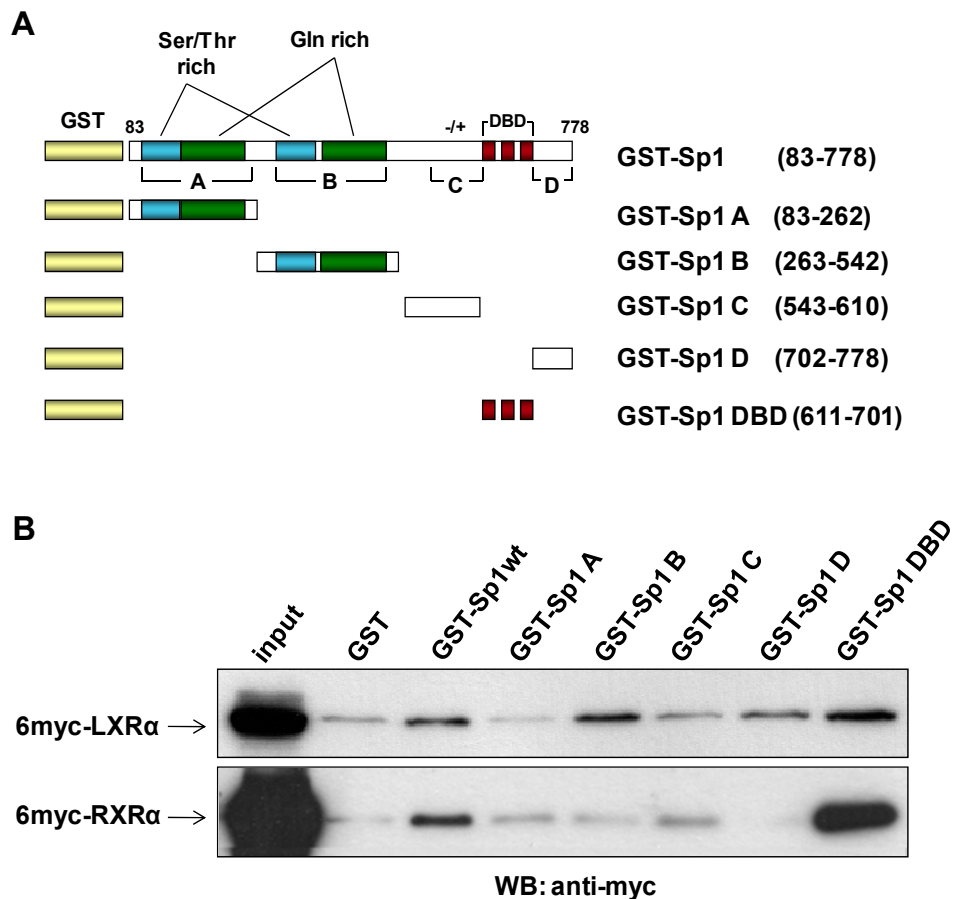
Για να διερευνήσουμε πιθανές φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα, χρησιμοποιήσαμε *in vivo* και *in vitro* μεθόδους. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε μία μέθοδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που βασίζεται στη βιοτινυλίωση της μιας πρωτεΐνης *in vivo* (στην περίπτωση μας του Sp1) για να δείξουμε ότι ο Sp1 αλληλεπιδρά ειδικά με τους LXRα/RXRα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα HEK293T με φορείς έκφρασης για 6myc-LXRα ή 6myc-RXRα μαζί με φορέα έκφρασης για Sp1, ο οποίος φέρει τον επίτοπο Bio στο αμινοτελικό άκρο, απουσία και παρουσία της λιγάσης της βιοτίνης BirA. Το εκχύλισμα των κυττάρων επωάστηκε με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης-αγαρόζης (streptavidin-agarose beads) και οι πρωτεΐνες που είχαν προσδεθεί αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc. Όπως φαίνεται στην εικόνα 37, επάνω σειρά, ο βιοτινυλιωμένος Sp1 αλληλεπιδρά ισχυρά

και ειδικά τόσο με τον 6myc-LXRα όσο και με τον 6myc-RXRα *in vivo*. Τα επίπεδα έκφρασης των 6myc-LXRα και 6myc-RXRα στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα φαίνονται στη μεσαία σειρά. Στην τελευταία σειρά φαίνεται η αποτελεσματικότητα της BirA να βιοτινυλιώνει τον Sp1.

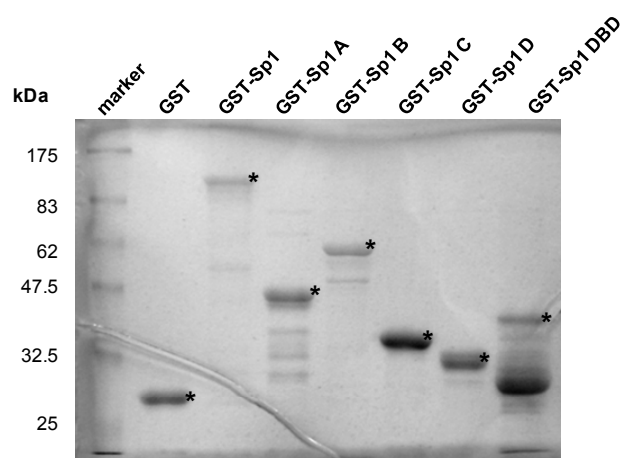


Εικόνα 37: Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα *in vivo*. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τους φορείς έκφρασης Bio-Sp1, 6myc-LXRα, 6myc-RXRα και BirA (7,5μg ο καθένας). Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα βέλη στη δεξιά μεριά δείχνουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες στο Western Blot. WCE, whole cell extract; WB, Western blotting; strep. beads, streptavidin–agarose beads; strep. HRP, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase.

Για να χαρακτηρίσουμε την περιοχή(-ές) του Sp1 η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους δύο πυρηνικούς υποδοχείς, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες GST-pull down. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST (glutathione S-transferase) που περιλαμβάνουν ολόκληρη την περιοχή του Sp1 ή τις ξεχωριστές περιοχές (A, B, C, D και DBD) (εικόνα 38A). Εκφράσαμε τις πρωτεΐνες αυτές σε *E.coli* (εικόνα 39) και εξετάσαμε την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς LXRα και RXRα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο πλήρους μήκους LXRα αλληλεπιδρά με τις περιοχές B και DBD του Sp1 (εικόνα 38B, πάνω σειρά) ενώ ο πλήρους μήκους RXRα αλληλεπιδρά ισχυρά μόνο με την περιοχή DBD του Sp1 (εικόνα 38B, κάτω σειρά).



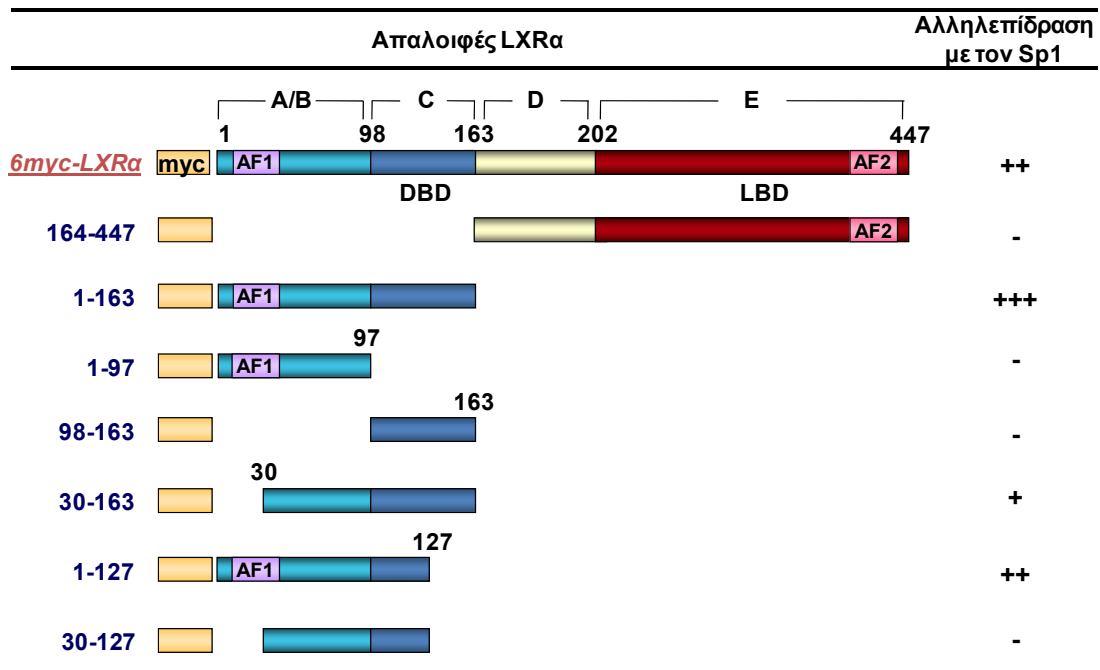
Εικόνα 38: Χαρακτηρισμός των περιοχών του Sp1 που μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση με τους LXRα και RXRα *in vitro*. (A) Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων απαλοιφών του Sp1 σε σύντηξη με GST, που χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες φυσικών αλληλεπιδράσεων. (B) Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τους φορείς έκφρασης για 6myc-LXRα και 6myc-RXRα και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης στα οποία είχαν προσδεθεί η GST ή οι διάφορες απαλοιφές του GST-Sp1. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπίδρασαν ανιχνεύθηκαν με Western Blot με το αντίσωμα α-myc.



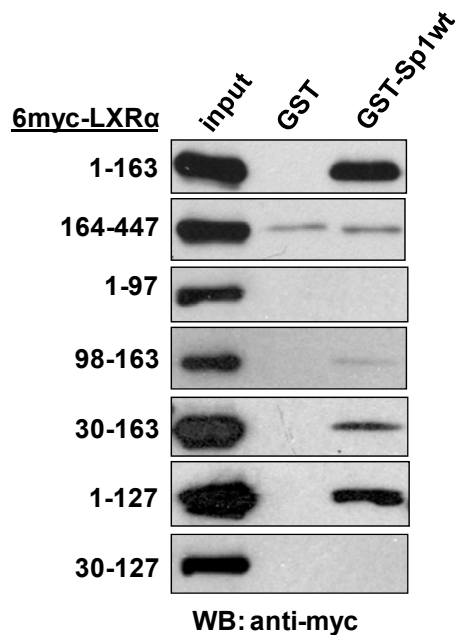
Εικόνα 39: Έκφραση σε *E.coli* των διάφορων απαλοιφών του Sp1 σε σύντηξη με GST που παρουσιάζονται στην εικόνα 38A.

Για να προσδιορίσουμε την περιοχή (-ές) του LXRα που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τον Sp1, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες GST-pull down χρησιμοποιώντας διάφορες απαλοιφές του LXRα που έφεραν τον επίτοπο myc (εικόνα 40). Όλες αυτές οι απαλοιφές του LXRα υπερεκφράστηκαν στα κύτταρα HEK293T, και τα εκχυλίσματα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν σε αλληλεπίδραση με GST ή με GST-Sp1 πάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 41, ο πλήρους μήκους Sp1 αλληλεπίδρασε ισχυρά με την αμινοτελική περιοχή του LXRα (1-163), η οποία περιλαμβάνει την περιοχή AF-1 (Activation Function 1) και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (περιοχές A/B και C, αντίστοιχα). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του Sp1 και του LXRα 164-447, που περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης (hinge) και την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (περιοχές D και E, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, δείξαμε ότι η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του LXRα και του Sp1 χάθηκε όταν η περιοχή 1-163 του LXRα κοβόταν είτε καρβοξυτελικά (LXRα 1-97) ή αμινοτελικά (LXRα 98-163). Απαλοιφή της περιοχής AF-1 (LXRα 30-163) μείωσε σημαντικά την αλληλεπίδραση με τον Sp1, ενώ η απαλοιφή της περιοχής 128-163, η οποία περιλαμβάνει το δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (LXRα 1-127), είχε μικρή μόνο επίδραση στην αλληλεπίδραση με τον Sp1. Η αλληλεπίδραση με τον Sp1 χανόταν όταν και οι δύο περιοχές 1-29 και 128-163 απαλοίφθηκαν (LXRα 30-127).

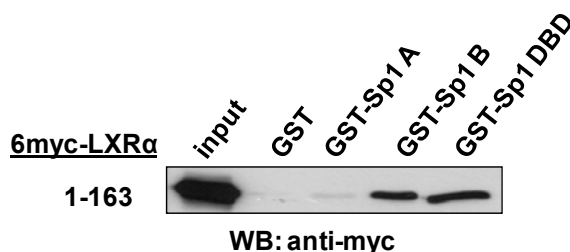


Εικόνα 40: Περιοχές του υποδοχέα LXRα που μεσολαβούν στη φυσική αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 *in vitro*. Σχηματική αναπαράσταση του αγρίου τύπου LXRα και των απαλοιφών του που φέρουν τον επίτοπο myc και χρησιμοποιήθηκαν στις αλληλεπιδράσεις της εικόνας 41. Στο δεξιό μέρος της εικόνας φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης συμβολίζεται με – και + (η ισχυρότερη αλληλεπίδραση συμβολίζεται με +++). AF1, AF2, activation function 1 και 2, αντίστοιχα· DBD, DNA binding domain· LBD, ligand binding domain.



Εικόνα 41: Φυσικές αλληλεπιδράσεις των απαλοιφών του υποδοχέα LXRα με τον Sp1. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τους φορείς έκφρασης οι οποίοι αναγράφονται στα αριστερά (20μg ο καθένας) και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης στα οποία είχαν προσδεθεί η GST ή η GST-Sp1. Η πρωτεΐνη LXRα που αλληλεπίδρασε ανιχνεύθηκε με Western Blot χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-myc.

Κατόπιν, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες GST-pull down (Εικόνα 42), επιβεβαιώσαμε τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής 1-163 του LXRα και των περιοχών B και DBD του Sp1. Η περιοχή A χρησίμευσε ως αρνητικό δείγμα για την αλληλεπίδραση με τον Sp1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας 38. Η περίληψη των ευρημάτων απεικονίζεται στην εικόνα 40 (δεξιά).



Εικόνα 42: Φυσική αλληλεπίδραση της περιοχής 1-163 του LXRα με τις περιοχές B και DBD του Sp1. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τον φορέα έκφρασης 6myc-LXRα (1-163) (20μg) και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης στα οποία είχαν προσδεθεί η GST ή η GST-Sp1. Η πρωτεΐνη LXRα που αλληλεπίδρασε ανιχνεύθηκε με Western Blot χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-myc.

Συζήτηση

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και πυρηνικών υποδοχέων για την ενεργοποίηση γονιδίων

Η ικανότητα των πυρηνικών υποδοχέων να λειτουργούν ως υπερ-ενεργοποιητές σε υποκινητές που δεν περιέχουν στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Σε μια από αυτές τις μελέτες, οι Suzuki et al. έδειξαν ότι το ρετινοϊκό οξύ επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ουροκινάσης, από το οποίο απουσιάζει ένα κανονικό στοιχείο απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (RARE), στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ότι αυτή η επαγωγή απαιτεί την παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε GC στην οποία προσδένεται ο Sp1 (298). Ένα παρόμοιο εύρημα αναφέρθηκε από τους Husmann et al. στην περίπτωση του γονιδίου της ιντερλευκίνης 1β (299). Οι Huang et al. και οι Cheng et al. έδειξαν ότι η απόκριση του γονιδίου p27^{Kip1} στη βιταμίνη D3 μεσολαβείται από φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποδοχέα της βιταμίνης D3 (VDR) και του Sp1 που προσδένεται σε ένα στοιχείο πλούσιο σε GC στον υποκινητή του γονιδίου p27^{Kip1} (300, 301). Σε ένα διαφορετικό σύστημα, οι φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις

μεταξύ των υποδοχέων των οιστρογόνων και του Sp1 βρέθηκαν να μεσολαβούν στην επαγωγή αρκετών υποκινητών πλούσιων σε GC από τα οιστρογόνα σε καρκινικά κύτταρα μαστού (302-307). Έχουν προταθεί δύο μοντέλα τα οποία θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Το ένα μοντέλο, το οποίο υποστηρίζεται από τις μελέτες αλληλεπίδρασης του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος και του υποδοχέα των οιστρογόνων με τον Sp1, προτείνει ότι οι αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών υποδοχέων και του Sp1 σταθεροποιούν την πρόσδεση του Sp1 στην αντίστοιχη θέση του στους υποκινητές-στόχους (298-301, 308, 309). Το δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι ο Sp1 χρησιμεύει ως απλό αγκυροβολείο για τη στρατολόγηση των πυρηνικών υποδοχέων σε υποκινητές από τους οποίους απουσιάζουν ορμονικά στοιχεία απόκρισης (HREs) (300, 301). Όλες αυτές οι μελέτες εισάγουν μια καινούργια αντίληψη στη δράση των πυρηνικών υποδοχέων, σύμφωνα με την οποία οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων τα οποία δεν διαθέτουν κανονικά ορμονικά στοιχεία απόκρισης μέσω φυσικών και λειτουργικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στους υποκινητές όπως ο Sp1.

Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και πυρηνικών υποδοχέων

Απευθείας αποδείξεις για φυσικές αλληλεπιδράσεις *in vitro* και *in vivo* μεταξύ του Sp1 και πυρηνικών υποδοχέων καθώς και για τις περιοχές των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν είναι πολύ περιορισμένες. Οι Huussman et al. έδειξαν με δοκιμασίες *in vitro* pull-down ότι η καρβοξυτελική περιοχή του Sp1 ανάμεσα στα αμινοξέα 622-788, η οποία περιλαμβάνει τις περιοχές DBD και D μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα VDR (vitamin D receptor) (299). Σε μια άλλη μελέτη από τους Suzuki et al., παρουσιάστηκαν *in vivo* φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του RAR (retinoic acid receptor) και του Sp1 με συν-ανοσοκατακρήμνιση, αλλά οι υπεύθυνες περιοχές δεν χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω (298). Τελικά, οι Porter et al. έδειξαν απευθείας φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ER (υποδοχέα των οιστρογόνων) και του Sp1 *in vitro* και *in vivo* (307). Έδειξαν επίσης ότι, όμοια με την αλληλεπίδραση VDR/Sp1, η αλληλεπίδραση ER/Sp1 μεσολαβείται από την καρβοξυτελική περιοχή του Sp1 (622-788), η οποία περιλαμβάνει τις περιοχές DBD και D (307).

Φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1

Στην παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Sp1 και του LXR απαιτούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή ενεργοποίησης B του Sp1, ενώ η αλληλεπίδραση με τον RXR απαιτεί μόνο την περιοχή DBD του Sp1 (εικόνα 38). Η ανάμιξη της περιοχής πρόσδεσης στο DNA του Sp1 σε όλες τις αλληλεπιδράσεις με τους πυρηνικούς υποδοχείς παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η ανάμιξη αυτής της περιοχής μπορεί να ευθύνεται για την παρατηρούμενη ρύθμιση των ιδιοτήτων αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, ως προς την πρόσδεση στο DNA, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με άλλους πυρηνικούς παράγοντες. Μπορεί επίσης να ευθύνεται για την ενισχυμένη πρόσδεση του Sp1 στον υποκινητή του ABCA1 κάτω από συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής από τους συνδέτες (εικόνα 32 και μοντέλο εικόνας 43). Με παρόμοιο τρόπο, η αλληλεπίδραση του Sp1 με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του LXR (εικόνες 40-42) μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του πυρηνικού υποδοχέα που μπορεί να οδηγήσει στη σταθεροποίηση του συμπλόκου πρωτεϊνών-DNA RXR/LXR/LXRE στους υποκινητές-στόχους, αλλά αυτή η υπόθεση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

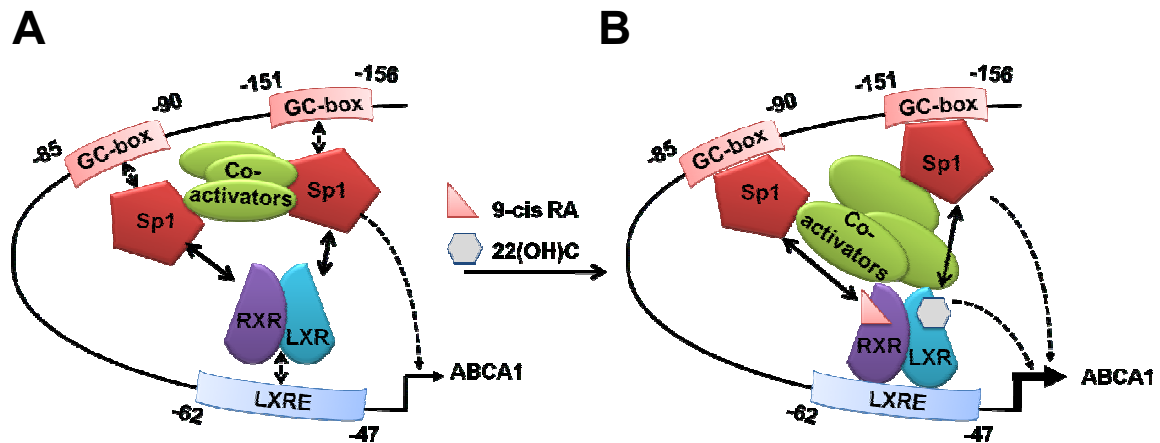
Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ένα μηχανισμό μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου ABCA1, ο οποίος βασίζεται στις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων LXR και RXR και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο, το οποίο παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 43, απουσία των συνδετών, τα ετεροδιμερή LXR/RXR προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 αλλά δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή λόγω της απουσίας στρατολόγησης συνενεργοποιητών (310, 311) (εικόνα 43A). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο Sp1 επίσης προσδένεται στον υποκινητή του ABCA1 και συμβάλλει στη βασική έκφραση του γονιδίου. Η χορήγηση των δύο συνδετών επάγει την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τους συνενεργοποιητές τους όπως είναι ο CBP/p300, οι οποίοι είναι επίσης και συνενεργοποιητές του Sp1 (198, 312). Ως αποτέλεσμα, οι συνδέτες θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη δημιουργία ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου αποτελούμενο από τους Sp1 και τους LXR/RXR και τους συνενεργοποιητές τους και τη σταθεροποίηση αυτού του συμπλόκου στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 όπως υποδηλώνεται από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης της εικόνας 32. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 ενισχύεται λόγω της

συντονισμένης δράσης του Sp1 και των δύο πυρηνικών υποδοχέων πάνω στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (εικόνα 43B).

Το μοντέλο αυτό προβλέπει ότι μεταλλαγές είτε στο LXRE είτε στις θέσεις πρόσδεσης του Sp1 θα μπορούσαν εξίσου να μειώσουν την απόκριση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Υπέρ αυτού του μοντέλου είναι τα αποτελέσματα του Langman et al. (103), τα οποία έδειξαν ότι μεταλλαγές είτε στο LXRE ή στο στοιχείο πρόσδεσης του Sp1 στη θέση -90/-85 (αλλά όχι του στοιχείου πρόσδεσης του Sp1 στη θέση -156/-151) μειώνουν την επαγωγή του υποκινητή του ABCA1 από το ρετινοϊκό οξύ και τις οξυστερόλες στα κύτταρα HepG2.

Θέσεις πρόσδεσης για LXR/RXR και Sp1 σε γονίδια που μετέχουν στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι συνδυασμοί από θέσεις LXREs και θέσεις πρόσδεσης για Sp1 βρίσκονται επίσης σε άλλα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα, ο κοντινός υποκινητής του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI (scavenger receptor BI), το οποίο κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της HDL, περιέχει αρκετά στοιχεία πλούσια σε GC τα οποία έχουν δειχθεί ότι είναι σημαντικά για τη βασική του ενεργότητα (313, 314). Ο ίδιος υποκινητής περιέχει ένα στοιχείο LXRE στο οποίο προσδένονται τα ετεροδιμερή LXR/RXR και ρυθμίζουν την επαγωγή αυτού του γονιδίου από οξυστερόλες (315). Παρόμοια, ένας συνδυασμός από LXREs και θέσεων Sp1 έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί στον υποκινητή του γονιδίου της CETP (cholesterol ester transfer protein) (316, 317). Κατά αυτόν τον τρόπο, ο Sp1 ή άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας του Sp1, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως γενικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού των λιπιδίων επηρεάζοντας την προστασία από ή την παθογένεση της αθηροσκλήρωσης.



Εικόνα 43: Προτεινόμενο μοντέλο του ρόλου του Sp1 στη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Απουσία των συνδετών (22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος), ο Sp1 και τα ετεροδιμερή LXR/RXR προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 αλλά δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή λόγω της απουσίας στρατολόγησης συνενεργοποιητών (A). Η χορήγηση των δύο συνδετών προκαλεί τη σταθεροποίηση της πρόσδεσης του Sp1 και των ετεροδιμερών LXR/RXR στον κοντινό υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και επάγει τη μεταγραφή πιθανόν με το να ενισχύει τη δημιουργία ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου αποτελούμενο από τον Sp1, τους LXR/RXR και τους συνενεργοποιητές τους (B).

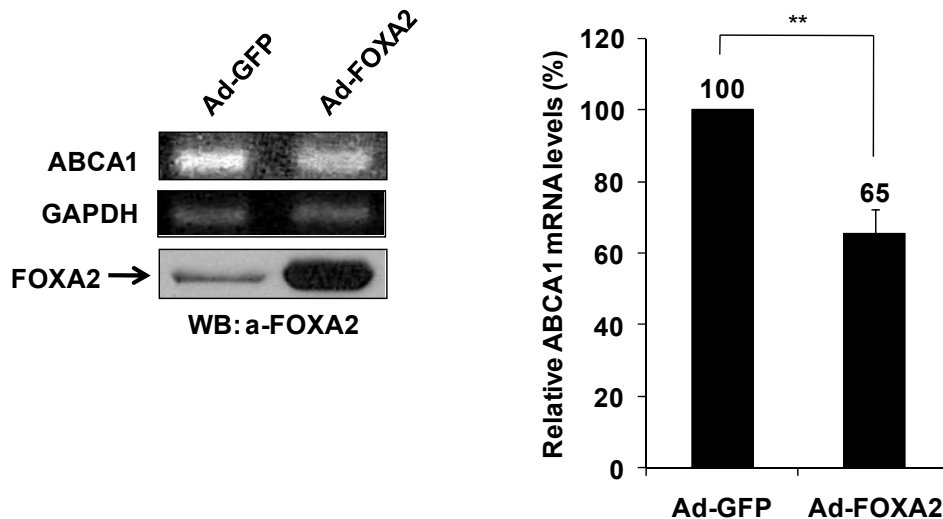
Μέρος II

**Ο Μεταγραφικός Παράγοντας FOXA2/HNF-3β
Αναστέλλει τη Μεταγραφή του Γονιδίου ABCA1
στο Ήπαρ Εμποδίζοντας τη Σηματοδότηση
Μέσω των RXRα / LXRα**

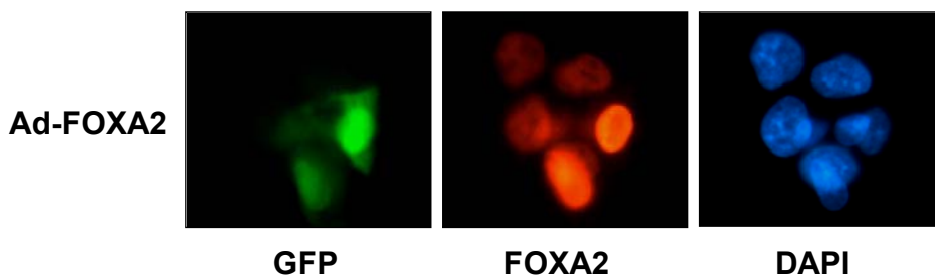
Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 παίζει αρνητικό ρόλο στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα

Θελήσαμε να μελετήσουμε το ρόλο του FOXA2/Hepatocyte Nuclear Factor 3β (HNF-3β), ενός από τους κυριότερους μεταγραφικούς παράγοντες στο ήπαρ, στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1. Αρχικά, δημιουργήσαμε έναν ανασυνδυασμένο αδενοϊό ο οποίος εκφράζει τον FOXA2 (Ad-FOXA2) και τον χρησιμοποιήσαμε για να μολύνουμε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοβλαστώματος HepG2. Στο δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο αδενοϊός ο οποίος εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Ad-GFP). Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 στα μολυσμένα κύτταρα HepG2 ποσοτικοποιήθηκαν 24 ώρες μετά τη μόλυνση με αντίδραση PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε βάσει των επιπέδων mRNA του γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase). Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα της εικόνας 44, η υπερέκφραση του FOXA2 στα κύτταρα HepG2 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ABCA1 κατά 35%.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η πρωτεΐνη FOXA2 που παράγεται από τον αδενοϊό Ad-FOXA2 δεν διαφέρει από την ενδογενή FOXA2, μολύναμε κύτταρα HepG2 με τον αδενοϊό Ad-FOXA2 και ανιχνεύσαμε την πρωτεΐνη FOXA2 με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2. Στην εικόνα 45 τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό διακρίνονται από αυτά που δεν έχουν μολυνθεί βάσει της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP που εκφράζεται από τον ίδιο αδενοϊό που εκφράζει και την πρωτεΐνη FOXA2. Με κόκκινο ανιχνεύθηκε τόσο η ενδογενής πρωτεΐνη FOXA2 όσο και αυτή που παράχθηκε από τον αδενοϊό Ad-FOXA2 η εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα, όμοια με την ενδογενή. Στα κύτταρα που είχαν μολυνθεί από τον αδενοϊό Ad-FOXA2 παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης FOXA2 είναι πολύ μεγαλύτερα (Εικόνα 44 αριστερά και εικόνα 45).

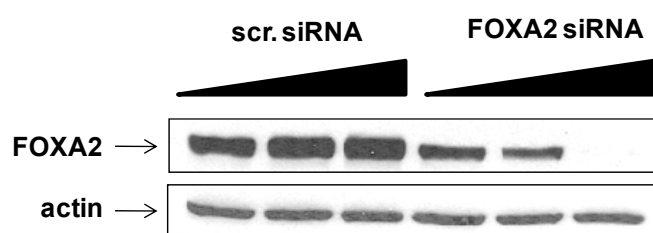


Εικόνα 44: Η υπερέκφραση του FOXA2 με τη χρήση του αδενοϊού Ad-FOXA2 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-GFP ή τον αδενοϊό Ad-FOXA2 για 3 ώρες με MOI (multiplicity of infection) 40. Το RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα 24 ώρες μετά και υποβλήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR). Στην αριστερή πλευρά φαίνονται τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 και του GAPDH που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση. Οι κανονικοποιημένες τιμές παρουσιάζονται στη δεξιά πλευρά ως ιστόγραμμα. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. Κάτω από τις εικόνες RT-PCR φαίνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης FOXA2 όπως ανιχνεύθηκαν με Western Blot με το αντίσωμα α-FOXA2. **, $p < 0.001$.



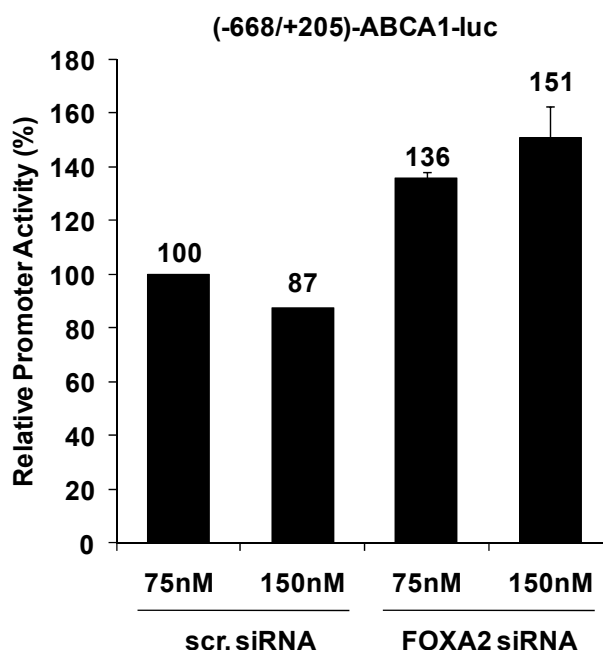
Εικόνα 45: Η πρωτεΐνη FOXA2 που παράχθηκε από τον αδενοϊό Ad-FOXA2 εντοπίστηκε στον πυρήνα. Τα κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-FOXA2 για 3 ώρες (MOI: 40) και 24 ώρες αργότερα ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης FOXA2 ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2 και το α-goat IgG-ALEXA 555 ως δευτερεύον αντίσωμα. Οι πυρήνες ανιχνεύθηκαν με χρώση DAPI.

Για να επαληθεύσουμε τον ανασταλτικό ρόλο του παράγοντα FOXA2 στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1, χρησιμοποιήσαμε siRNA για να επιτύχουμε την αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου FOXA2 στα κύτταρα HepG2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 46, το siRNA που στοχεύει τον FOXA2 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ το siRNA ελέγχου (scrambled) δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση του FOXA2.



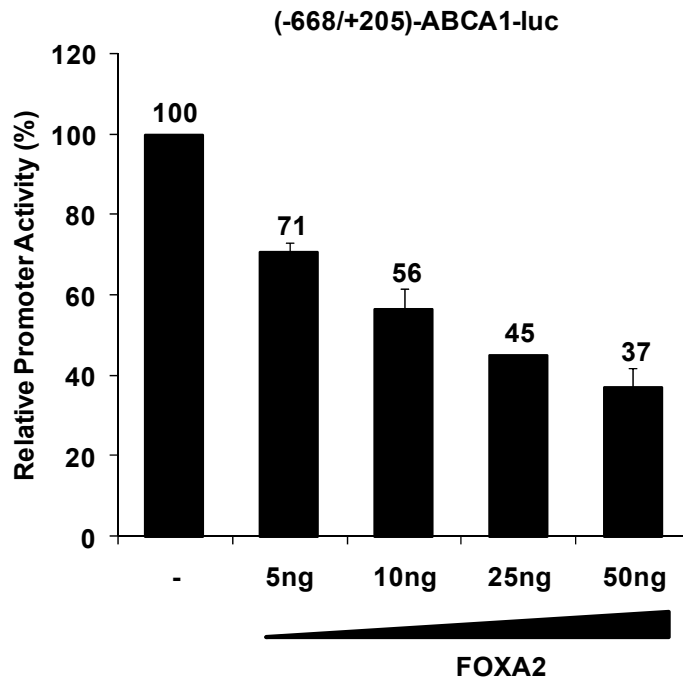
Εικόνα 46: Αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης FOXA2 με τη χρήση si-RNA. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2 (1μg) μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (33, 100, 166nM) από το siRNA ελέγχου (scrambled) ή από το FOXA2 siRNA. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης προσδιορίστηκε με Western Blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ακτίνης ανιχνεύθηκαν για λόγους κανονικοποίησης της ποσότητας των πρωτεϊνών ανάμεσα στα δείγματα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν ο FOXA2 καταστέλει την έκφραση του γονιδίου ABCA1 μέσω ρύθμισης της ενεργότητας του υποκινητή, κλωνοποιήσαμε αρχικά την κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1 από το -668 ως το +205 (σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής πάνω από το εξόνιο 1) σε ένα φορέα που φέρει το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 47, η αποσιώπηση της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου FOXA2 οδήγησε σε μια αύξηση περίπου 2 φορές στην ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1 (στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται 150nM FOXA2 siRNA).



Εικόνα 47: Η αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου FOXA2 με siRNA οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc (250ng) μαζί με 75 και 150nM από το siRNA ελέγχου (scrambled) ή από το FOXA2 siRNA. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Κατόπιν, πραγματοποιώντας πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με τον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (-668/+205) παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης FOXA2 οδήγησαν σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της ενεργότητας του υποκινητή (εικόνα 48), συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της εικόνας 44. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και 5ng από το φορέα έκφρασης για FOXA2 αρκούν για να καταστείλουν την ενεργότητα του υποκινητή κατά 30%.



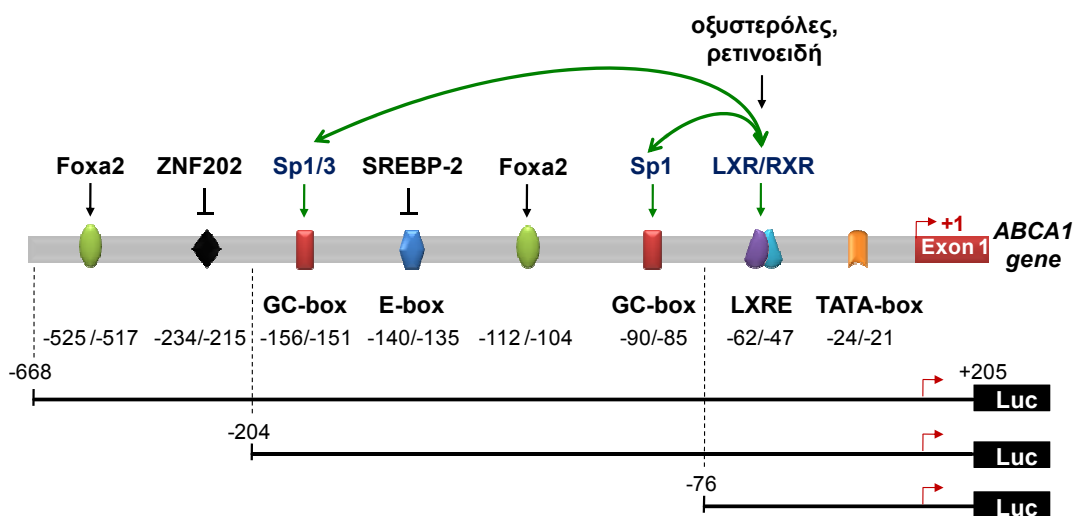
Εικόνα 48: Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 ελάττωσε την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc (250ng) μαζί με φορέα έκφρασης για τον FOXA2 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5-50ng). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Περιληπτικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 44 ως 45 υποδεικνύουν ότι ο ηπατο-ειδικός παράγοντας FOXA2 παίζει αρνητικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα.

Εύρεση πιθανών θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα FOXA2 στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1

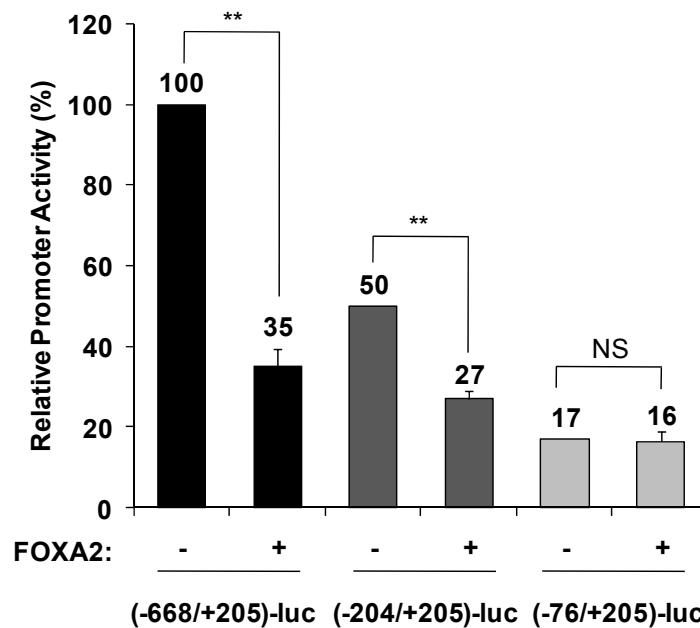
Η έρευνα με τη βοήθεια ενός προγράμματος εύρεσης πιθανών θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (www.genomatix.de) αποκάλυψε την ύπαρξη δύο πιθανών σημείων πρόσδεσης για τον παράγοντα FOXA2 στις θέσεις -525/-517 και -112/-104 (εικόνα 49) οι οποίες εμφανίζουν ομολογία με τη ομόφωνη αλληλουχία 5'-T(G/A)TTT(A/G)(C/T)T-3' (257). Οι πιθανές αυτές θέσεις πρόσδεσης περιβάλλονται από: ένα καλά χαρακτηρισμένο στοιχείο απόκρισης στις οξυστερόλες στο οποίο προσδένονται ετεροδιμερή LXRα/RXRα (LXRE) στη θέση -62/-47 (40, 79, 133, 318), δύο θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 στις θέσεις -90/-85 και -156/-151 (319) που έχουν δειχθεί ότι ρυθμίζουν την απόκριση του υποκινητή ABCA1 στις οξυστερόλες με θετικό τρόπο, μία θέση πρόσδεσης (E-box) για την πρωτεΐνη SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2) στη θέση -140/-135 που έχει δειχθεί να καταστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1

(101) και μία θέση πρόσδεσης για τον καταστολέα της μεταγραφής ZNF202 (Zinc Finger protein) στη θέση -234/-213 (106) (εικόνα 49).



Εικόνα 49: Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών στοιχείων και παραγόντων που δρουν στον υποκινητή του ανθρώπινου ABCA1. Οι νέες πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα FOXA2 βρίσκονται στις περιοχές -525/-517 και -112/-104. Τα μεγάλα βέλη τονίζουν τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 και τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα που έχουν δείχθει ότι είναι απαραίτητες για τη βέλτιστη ενεργοποίηση του υποκινητή από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται τα τμήματα του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης.

Προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος των δύο πιθανών θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 στην καταστολή του υποκινητή του ABCA1, κατασκευάστηκαν δύο απαλοιφές του υποκινητή. Από την πρώτη απαλοιφή απουσιάζει το πιθανό στοιχείο πρόσδεσης στη θέση -525/-517, ενώ από τη δεύτερη απουσιάζουν και τα δύο πιθανά στοιχεία πρόσδεσης (εικόνα 49). Όπως φαίνεται στην εικόνα 50, η έκφραση του FOXA2 κατέστειλε τη βασική ενεργότητα των τμημάτων -668/+205 και -204/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 σε βαθμό που είναι στατιστικά σημαντικός. Αντίθετα, ο FOXA2 δεν μπόρεσε να καταστείλει την ενεργότητα του τμήματος -76/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από το οποίο απουσιάζουν και οι δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον FOXA2.

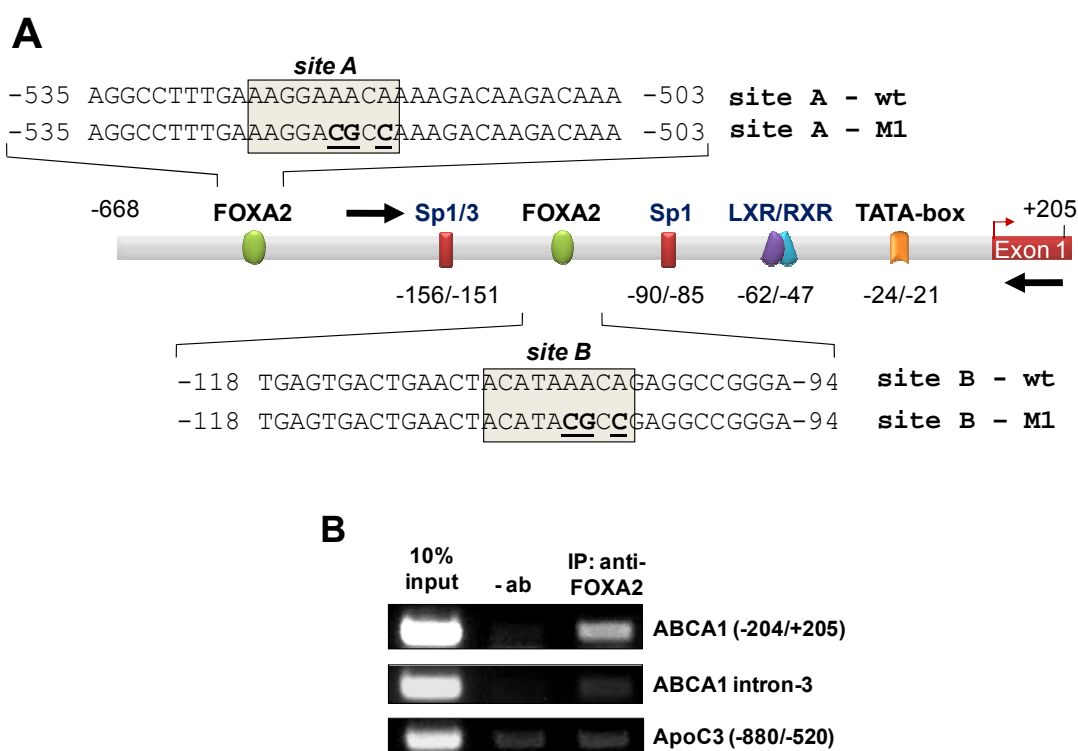


Εικόνα 50: Η απαλοιφή των πιθανών θέσεων πρόσδεσης FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 οδήγησε σε απώλεια της καταστολής από τον παράγοντα FOXA2. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-668/+205)-ABCA1-luc, (-204/+205)-ABCA1-luc και (-76/+205)-ABCA1-luc (250ng το καθένα) μαζί με φορέα έκφρασης για τον FOXA2 (50ng). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. **, $p < 0.001$. NS, μη σημαντικό.

Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 *in vitro* και *in vivo*

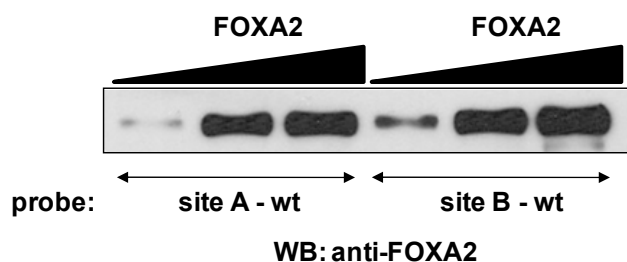
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την πρόσδεση του FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 χρησιμοποιήσαμε μια σειρά από τεχνικές αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με DNA. Καταρχήν, εξετάσαμε τη στρατολόγηση του ενδογενούς FOXA2 που εκφράζεται στα κύτταρα HepG2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP). Τα σύμπλοκα χρωματίνης-FOXA2 ανοσοκατακρήμίστηκαν από εκχυλίσματα κυττάρων HepG2 που είχαν υποστεί μονιμοποίηση και θρυμματισμό της χρωματίνης με υπερήχους. Η ανάλυση των τμημάτων DNA που ανακτήθηκαν από την ανοσοκατακρήμιση έγινε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που ενισχύουν είτε την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 στο εξόνιο 1 (εικόνα 51A) όπου εντοπίζονται οι δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης FOXA2, ή σε μία άλλη περιοχή του γονιδίου στο τρίτο ιντρόνιο.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 51B, η πρωτεΐνη FOXA2 βρέθηκε να στρατολογείται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή όχι όμως και στην απομακρυσμένη περιοχή του τρίτου ιντρονίου, επιβεβαιώνοντας έτσι την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε εκκινητές που ενισχύουν την περιοχή του ενισχυτή του γονιδίου της APOC3 (apolipoprotein C-III) του ανθρώπου (περιοχή -880/-520) και δε βρήκαμε καμία σύνδεση του FOXA2 με την περιοχή αυτή (Εικόνα 51B). Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με μία πρόσφατη μελέτη στην οποία το γονίδιο ABCA1 αναγνωρίστηκε ως πιθανός στόχος του FOXA2 με ανάλυση με μικροσυστοιχίες (microarrays) της χρωματίνης που ανοσοκατακρημνίστηκε από το ήπαρ ποντικών (ChIP-on-chip) (320).



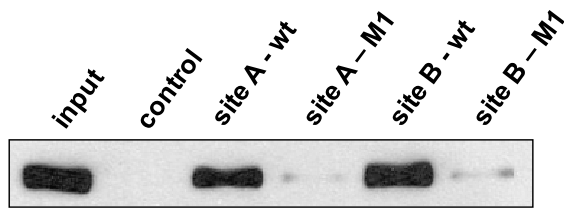
Εικόνα 51: Ο FOXA2 προσδέθηκε στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 *in vivo*. (A) Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 του ανθρώπου όπου μέσα σε πλαίσιο φαίνεται η αλληλουχία των δύο πιθανών θέσεων πρόσδεσης του FOXA2 (θέση A και θέση B). (B) Ο FOXA2 στρατολογείται στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το αντίσωμα α-FOXA2 ή χωρίς αντίσωμα (αρνητικό δείγμα, -ab). Η χρωματίνη ελέγχθηκε με PCR με εκκινητές για την περιοχή -204/+205 (μαύρα τόξα στην πάνω εικόνα) του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, για μια περιοχή του τρίτου ιντρονίου του γονιδίου ABCA1 ή για τον ενισχυτή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης C3 (-880/-520). IP, immunoprecipitation.

Για την επιβεβαίωση της πρόσδεσης του FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 *in vitro* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affinity precipitation-Υλικά και Μέθοδοι σελ.90). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν βιοτινυλιωμένα δίκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές -535/-503 και -118/-94 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (Εικόνα 51A). Το πρώτο ολιγονουκλεοτίδιο περιλαμβάνει την πιθανή θέση πρόσδεσης FOXA2 που βρίσκεται ανοδικά (θέση A) ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει την άλλη πιθανή θέση FOXA2 (θέση B). Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά επωάστηκαν αρχικά με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και κατόπιν με εκχυλίσματα από κύτταρα HEK293T τα οποία είχαν υποστεί παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 52, ο FOXA2 προσδέθηκε και στις δύο θέσεις με παρόμοια συγγένεια και με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.



Εικόνα 52: Ο FOXA2 προσδέθηκε στις θέσεις A και B με παρόμοια συγγένεια. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές -535/-503 (θέση A) και -118/-94 (θέση B) του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting με το αντίσωμα α-FOXA2. DNAP, DNA affinity precipitation· probe, βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο.

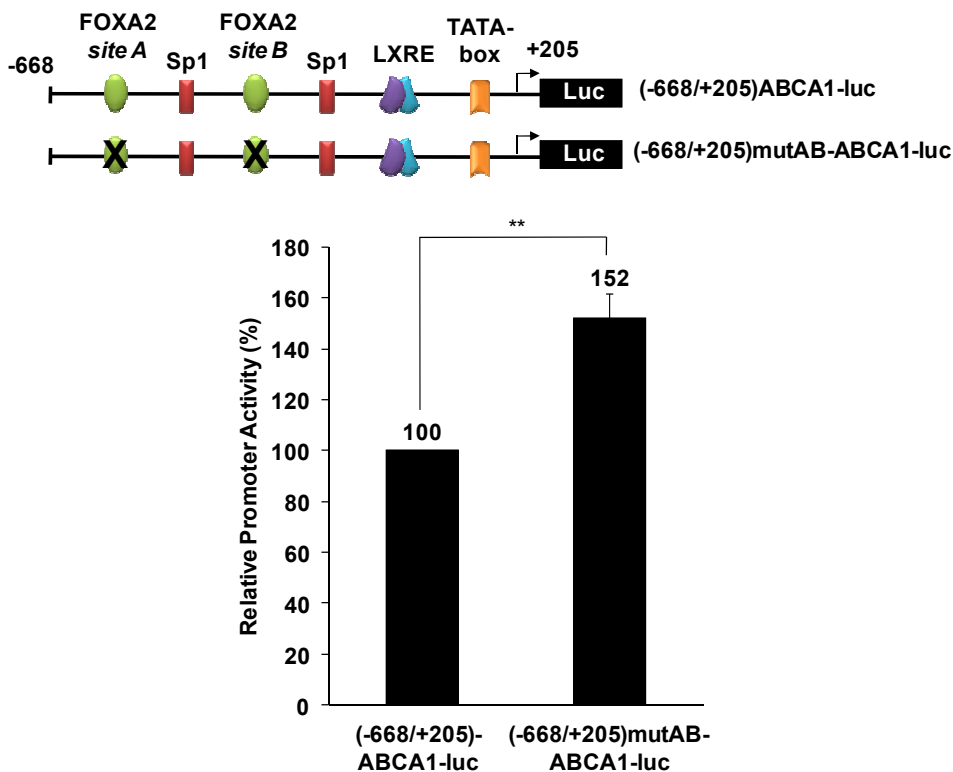
Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι θέσεις A και B είναι πραγματικές θέσεις πρόσδεσης του FOXA2, εισάγαμε μεταλλαγές οι οποίες αναμενόταν να οδηγήσουν σε απώλεια της πρόσδεσης καθώς η νέα αλληλουχία διεφέρε σημαντικά από την ομόφωνη αλληλουχία αναγνώρισης από τον FOXA2 που είναι 5'-T(G/A)TTT(A/G)(C/T)T-3' (257). Τα μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια, θέση A-M1 και θέση B-M1, φαίνονται στην εικόνα 51A (οι μεταλλαγές είναι με έντονη γραφή και υπογραμμισμένες). Όπως φαίνεται στην εικόνα 53, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DNAP όπως και προηγουμένως, οι μεταλλαγές αυτές πράγματι οδηγούν σε απώλεια της αλληλεπίδρασης του FOXA2 με τις θέσεις A και B.



WB: anti-FOXA2

Εικόνα 53: Μεταλλαγές στις θέσεις A και B είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια της πρόσδεσης του FOXA2. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένες περιοχές -535/-503 (θέση A-wt, -M1) και -118/-94 (θέση B-wt, -M1). Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2. DNAP, DNA affinity precipitation· probe, βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο.

Πολύ σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η εισαγωγή αυτών των μεταλλαγών στο τμήμα του υποκινητή -668/+205 [(-668/+205)mutAB-ABCA1-luc], είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 1,5 φορά σε σχέση με τον αγρίου τύπου υποκινητή (εικόνα 54).



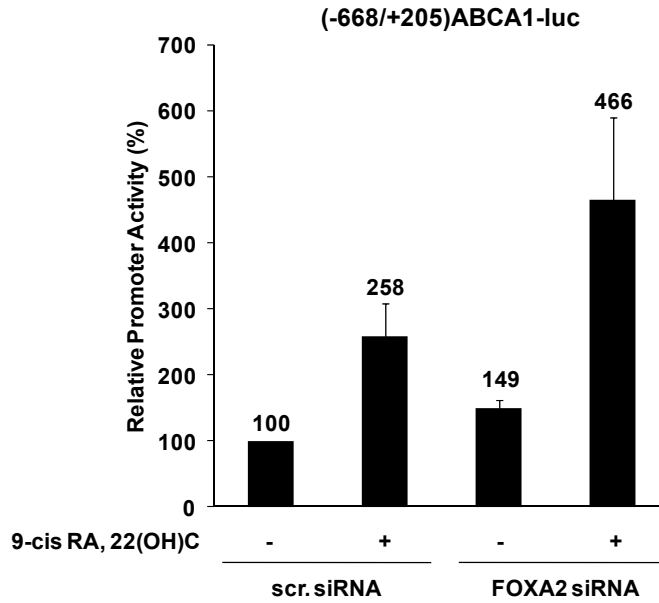
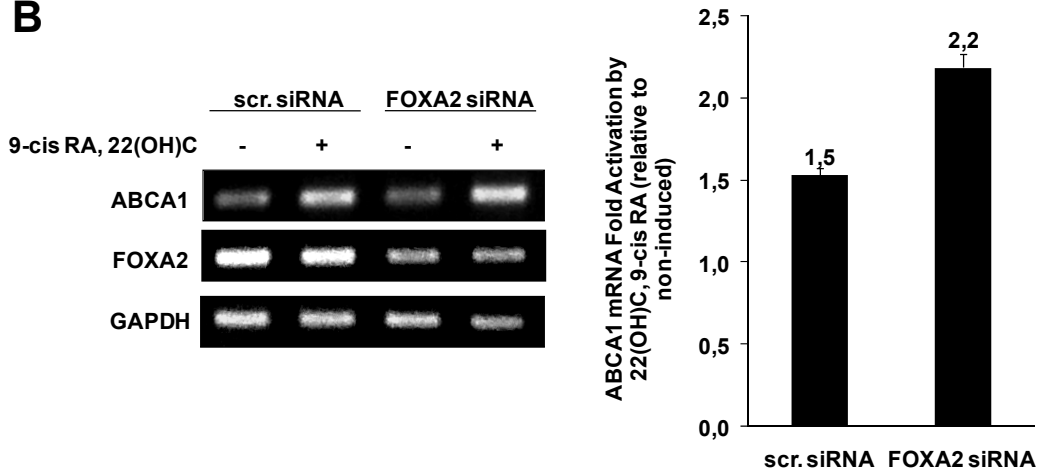
Εικόνα 54: Η μεταλλαγή των θέσεων πρόσδεσης FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-668/+205)ABCA1-luc και (-668/+205)mutAB-ABCA1-luc (250ng το καθένα). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. **, $p < 0.001$.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 51 ως 54, αναδεικνύουν την ύπαρξη δύο νέων θέσεων πρόσδεσης FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και τον ανασταλτικό ρόλο των θέσεων αυτών στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXA2 εμποδίζει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή

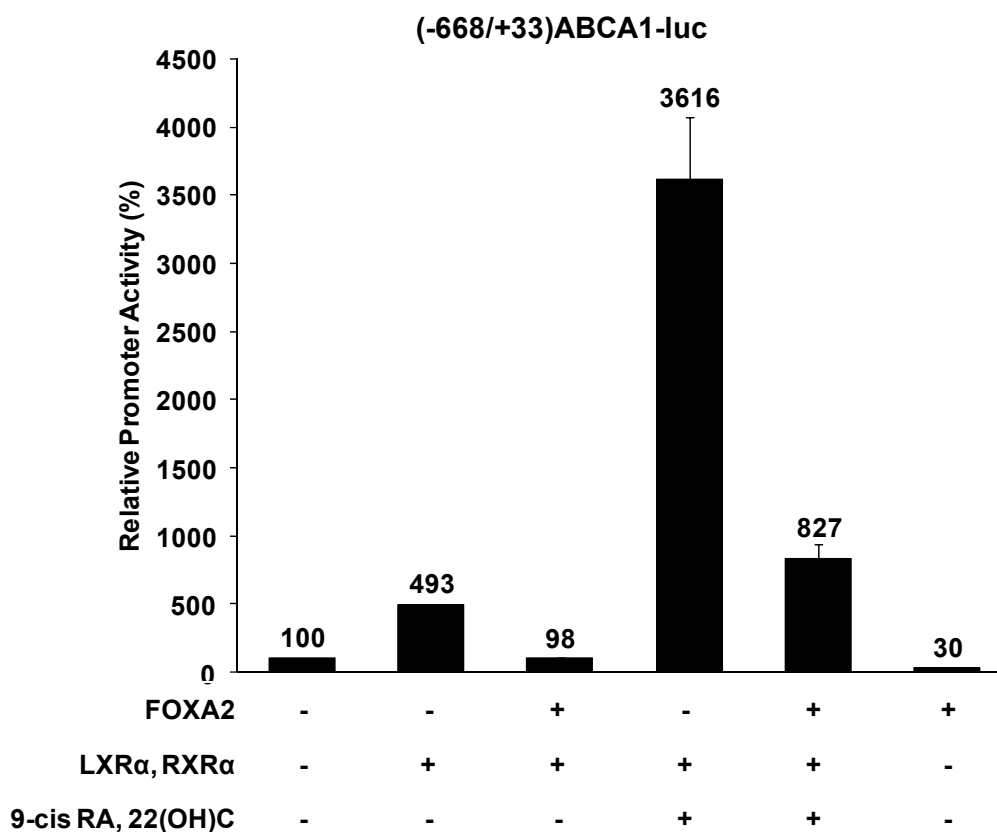
Είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα ορισμένων υδροξυλιωμένων μορφών της χοληστερόλης (οξυστερόλες) επάγουν ισχυρά τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 ενεργοποιώντας τον πυρηνικό υποδοχέα LXRA ο οποίος προσδένεται στο LXRE στοιχείο του υποκινητή του ABCA1 ως ετροδιμερές με τον πυρηνικό υποδοχέα RXRα (εικόνα 49) (40, 79, 133, 318). Η εγγύτητα του LXRE στις θέσεις πρόσδεσης FOXA2 οδήγησε στη διερεύνηση πιθανής συνεργασίας ή ανταγωνισμού μεταξύ του FOXA2 και των πυρηνικών υποδοχέων που καταλαμβάνουν το LXRE σε απόκριση στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+205)ABCA1-luc και ενεργοποίηση με 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ (συνδέτες για τον LXR και τον RXR, αντίστοιχα) για 24 ώρες, παρουσία siRNA που στοχεύει τον FOXA2 ή siRNA ελέγχου (scrambled). Όπως φαίνεται στην εικόνα 55A, η προσθήκη των δύο συνδετών αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή κατά 2,6 φορές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποσιώπηση της έκφρασης του ενδογενούς FOXA2 ενίσχυσε τόσο τα βασικά επίπεδα μεταγραφής όσο και την επαγόμενη από τους συνδέτες μεταγραφή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (1,5 φορές και 1,8 φορές αντίστοιχα).

Παρόμοια θετική επίδραση του siRNA που στοχεύει τον FOXA2 παρατηρήσαμε στα επίπεδα του ενδογενούς ABCA1 όταν επιδράσαμε με τους συνδέτες 22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ και ανιχνεύσαμε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 55B, παρουσία του siRNA ελέγχου (scrambled) η επαγωγή του ABCA1 από τους συνδέτες ήταν 1,5 φορές ενώ παρουσία του FOXA2 siRNA η επαγωγή ήταν 2,2 φορές συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της εικόνας 55A.

A**B**

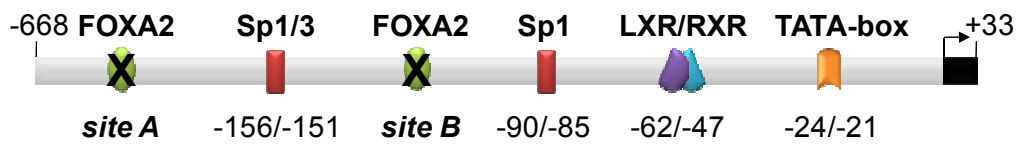
Εικόνα 55: Η αποσιώπηση της έκφρασης του FOXA2 ενίσχυσε την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. (A) Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+205)-ABCA1-luc (250ng) μαζί με 200nM siRNA ελέγχου (scrambled) ή FOXA2 siRNA παρουσία ή απουσία 22(OH)C και 9-cis RA (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. (B) Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με 200nM siRNA ελέγχου (scrambled) ή FOXA2 siRNA παρουσία ή απουσία 22(OH)C και 9-cis RA (10^{-6} M) για 24 ώρες. Το RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα και υποβλήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR). Στην αριστερή πλευρά φαίνονται τα επίπεδα mRNA του ABCA1, του FOXA2 και του GAPDH που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση. Οι κανονικοποιημένες τιμές για το mRNA του γονιδίου ABCA1 φαίνονται στη δεξιά πλευρά ως ιστόγραμμα.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης του FOXA2 στην επαγωγή του υποκινητή γονιδίου ABCA1 από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+33)ABCA1-luc μαζί με φορείς έκφρασης για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα και RXRα (σε ίσες συγκεντρώσεις προκειμένου να επιτευχθεί ετεροδιμερισμός) παρουσία ή απουσία ενός φορέα έκφρασης για FOXA2. Η χορήγηση των συνδετών, 22-(*R*)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ, για 24 ώρες ενεργοποίησε τους υποδοχείς LXRα/RXRα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 56, τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα ενεργοποίησαν τον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 κατά 5 φορές απουσία των συνδετών τους και κατά 36 φορές παρουσία των συνδετών τους. Ωστόσο, η ταυτόχρονη έκφραση του FOXA2 εμπόδισε την επαγωγή από τους LXRα/RXRα κατά 4 φορές υποδηλώνοντας ότι ο FOXA2 διαδραματίζει αρνητικό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή.

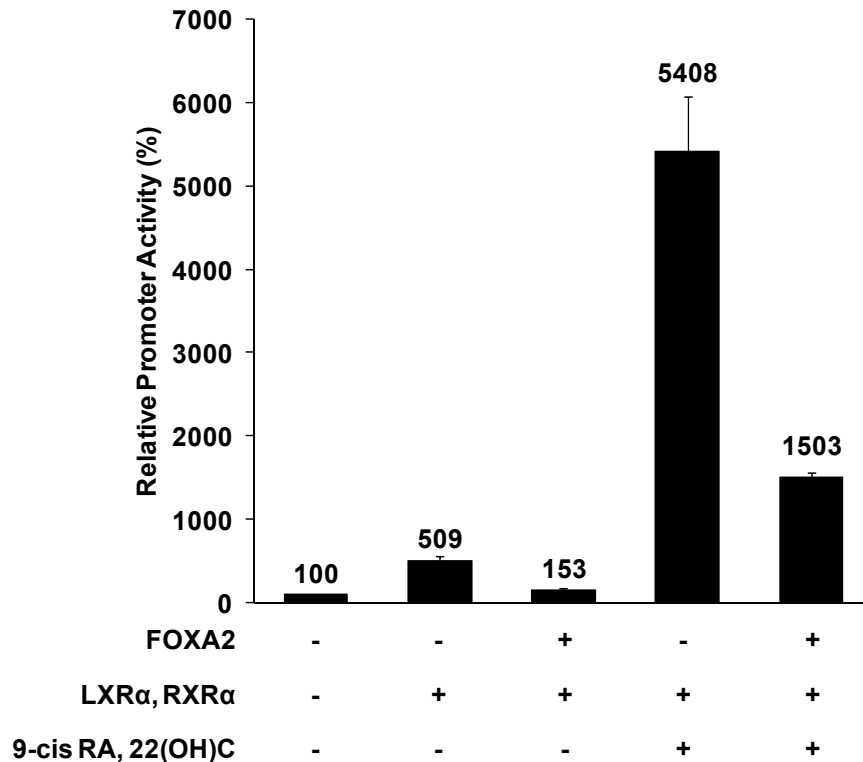


Εικόνα 56: Ο FOXA2 εμπόδισε την επαγωγή του υποκινητή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+33)-ABCA1-luc (250ng) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) ή για τον FOXA2 (50ng) παρουσία ή απουσία 22-(*R*)-υδροξυστερόλης και 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Για να διερευνήσουμε το κατά πόσο είναι αναγκαία η πρόσδεση του FOXA2 στις θέσεις A και B του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 για να επιτευχθεί η μεταγραφική καταστολή, επαναλάβουμε το πείραμα της εικόνας 56 χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά το πλασμίδιο (-668/+33)mutAB-ABCA1-luc το οποίο φέρει τη διπλή μεταλλαγή των θέσεων A και B (εικόνα 57). Όπως φαίνεται στην εικόνα 57, ο μεταλλαγμένος υποκινητής ενεργοποιήθηκε πολύ ισχυρά από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους (54 φορές). Η ενεργοποίηση αυτή ήταν 1,5 φορές πιο ισχυρή σε σχέση με την αντίστοιχη του αγρίου τύπου υποκινητή ABCA1 (εικόνα 56) υποδηλώνοντας ότι κάποια άλλα μέλη της οικογένειας των forkhead winged-helix πρωτεϊνών εκτός του FOXA2, που εκφράζονται ενδογενώς στα κύτταρα HEK293T, μπορούν να προσδένονται στις θέσεις A και B εμποδίζοντας τη σηματοδότηση από τους LXRα/RXRα. Ωστόσο, η υπερέκφραση του FOXA2 εξακολουθούσε να αναστέλει αν και σε μικρότερο τη σηματοδότηση από τους LXRα/RXRα στο μεταλλαγμένο υποκινητή (3,6 φορές σε σχέση με τις 4,3 φορές του αγρίου τύπου υποκινητή) υποδηλώνοντας την ύπαρξη και άλλων ρυθμιστικών στοιχείων στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1 που μεσολαβούν στην καταστολή της ενεργότητάς του από τον FOXA2.



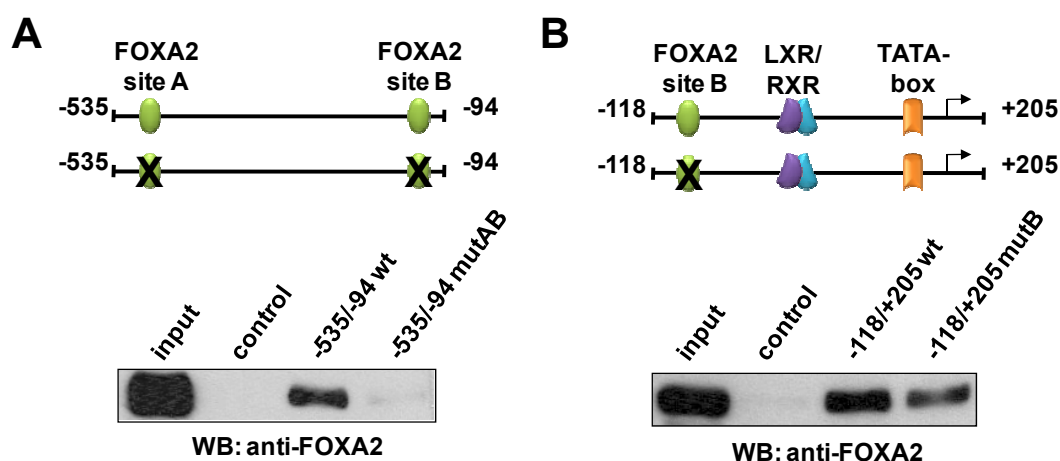
(-668/+33)mutAB-ABCA1-luc



Εικόνα 57: Μεταλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης A και B δεν οδήγησαν σε απώλεια της καταστολής του υποκινητή ABCA1 από τον FOXA2. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται το τμήμα του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε και το οποίο φέρει μεταλλαγμένες τις θέσεις A και B. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-668/+33)mutAB-ABCA1-luc (250ng) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) ή για τον FOXA2 (50ng) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

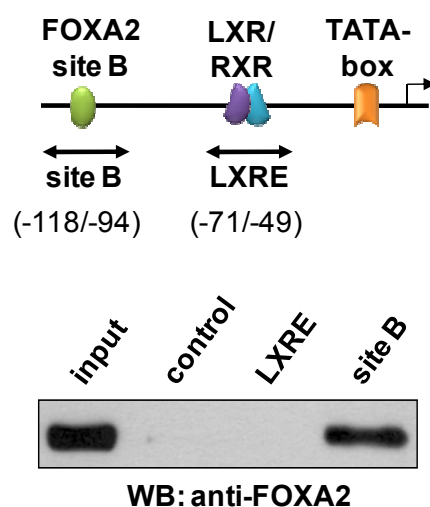
Ο FOXA2 προσδέεται στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1

Προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη επιπλέον θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα FOXA2 στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1, πραγματοποιήσαμε μία σειρά από πειράματα DNAP χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένα τμήματα PCR που αντιστοιχούν σε διαφορετικές και αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές του τμήματος -535 ως +205 υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 58A, ο FOXA2 προσδέθηκε με μεγάλη συγγένεια στο τμήμα -535/-94 ενώ η πρόσδεση αυτή χάθηκε όταν μεταλλάχθηκαν ταυτόχρονα οι θέσεις A και B. Το πείραμα αυτό απέκλεισε την ύπαρξη κάποιων επιπρόσθετων θέσεων πρόσδεσης του FOXA2 στην περιοχή -535/-94. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το βιοτινυλιωμένο τμήμα που αντιστοιχεί στην περιοχή -118/+205, η οποία περιέχει μόνο τη θέση B. Όπως φαίνεται στην εικόνα 58B, ο FOXA2 προσδέθηκε με μεγάλη συγγένεια στο τμήμα αυτό και οι μεταλλαγές στη θέση B αν και μείωσαν δεν εξαφάνισαν την πρόσδεση του FOXA2 υποδηλώνοντας την ύπαρξη επιπλέον θέσης πρόσδεσης για FOXA2 στην περιοχή αυτή.



Εικόνα 58: Ο FOXA2 προσδέεται σε ακόμη μία τουλάχιστον θέση στην περιοχή -118 ως +205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν: (A) στην αγρίου τύπου ή στη μεταλλαγμένη στις θέσεις A και B (mutAB) περιοχή -535/-94 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1, (B) στην αγρίου τύπου ή τη μεταλλαγμένη στη θέση B περιοχή -118/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2. DNAP, DNA affinity precipitation· probe, βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο.

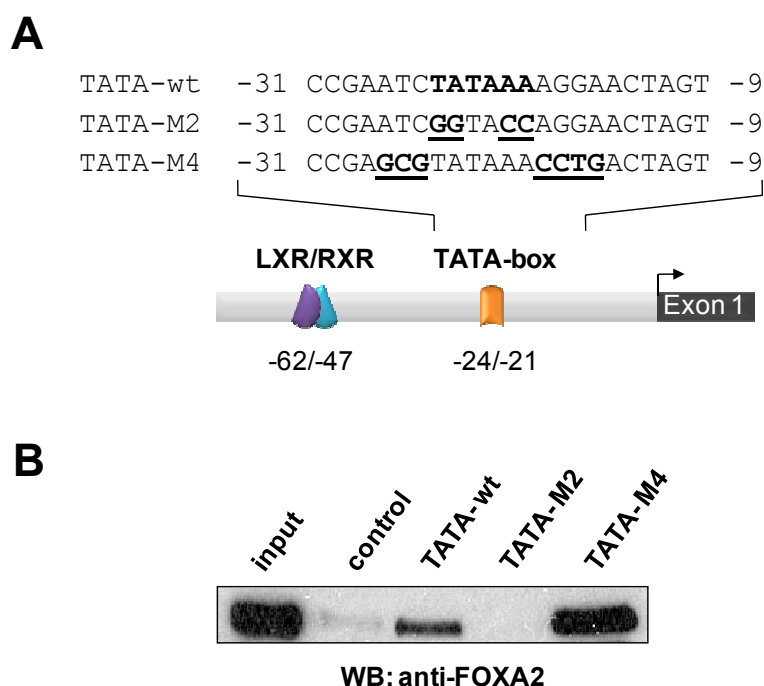
Η περιοχή -118/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 εκτός από τη θέση πρόσδεσης FOXA2 (θέση B), περιλαμβάνει το LXRE και το TATA-box (εικόνα 58B). Για το λόγο αυτό εξετάσαμε την πιθανότητα ο FOXA2 να χρησιμοποιεί είτε το ένα ή και τα δύο αυτά στοιχεία προκειμένου να επιτευχθεί η καταστολή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 59, ο FOXA2 δεν μπόρεσε να προσδεθεί σε ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο περιλαμβάνει το LXRE του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (περιοχή -71/-49). Το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που περιλαμβάνει τη θέση B (εικόνα 51 και 52) χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου για την πρόσδεση του FOXA2.



Εικόνα 59: Ο FOXA2 δεν προσδέεται στο στοιχείο LXRE του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στη θέση B (-118/-94) και στη θέση LXRE (-71/-49) του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOX A2. DNAP, DNA affinity precipitation-probe, βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο FOXA2 προσδέεται, αν και με λιγότερη συγγένεια, σε ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που περιλαμβάνει το TATA-box και περιοχές ανοδικά και καθοδικά αυτού (-31/-9) (εικόνα 60A και 60B). Όπως φαίνεται στην εικόνα 60B, μεταλλαγές που καταστρέφουν τον πυρήνα 5' TATAA 3' της αλληλουχίας του TATA-box (TATA-M2, εικ.60A) οδήγησαν σε απώλεια της πρόσδεσης του FOXA2 (εικόνα 60B), ενώ μεταλλαγές που αφήνουν άθικτο τον

πυρήνα 5' TATAA 3' αλλά καταστρέφουν την αλληλουχία που το περιβάλλει (TATA-M4, εικ.60A) δεν επηρέασαν την πρόσδεση του FOXA2 (εικόνα 60B).



Εικόνα 60: Ο FOXA2 προσδέθηκε στο στοιχείο TATA του υποκινητή ABCA1. (A) Σχηματική αναπαράσταση των βιοτινυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στην αγρίου τύπου ή τη μεταλλαγμένη (-M2, -M4) περιοχή -31/-9 του υποκινητή του ABCA1 η οποία περιλαμβάνει το TATA-box. Οι μεταλλαγές σημειώνονται με έντονη γραφή και υπογράμμιση. (B) Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που φαίνονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2.

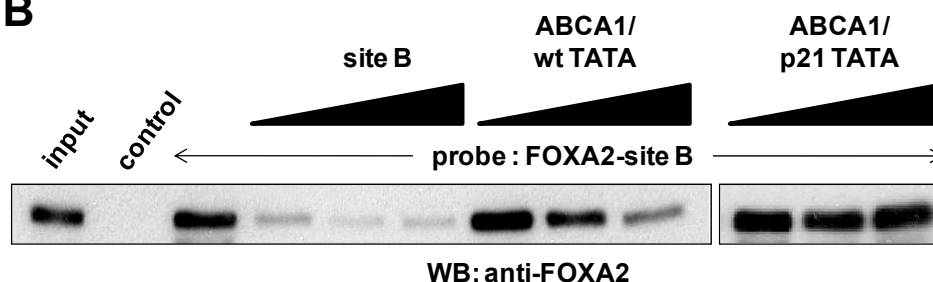
Με πειράματα DNAP ανταγωνισμού της πρόσδεσης επιβεβαιώσαμε ότι ο FOXA2 προσδέεται ειδικά στο TATA-box αλλά με μικρή συγγένεια. Όπως φαίνεται στην εικόνα 61B, ο FOXA2 προσδέθηκε στο βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο της θέσης B (τρίτη θέση), όπως έχει ήδη δειχθεί, και αυτή η πρόσδεση ανταγωνίστηκε ισχυρά από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μη βιοτινυλιωμένου ολιγονουκλεοτίδιου της θέσης B (θέσεις 4-6). Αντίθετα, ο ανταγωνισμός από το μη βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο -34/-1 (ABCA1/wtTATA, εικ.61A) δεν ήταν αποτελεσματικός παρά μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις (εικ.61B, θέση 9). Επίσης σημαντικό είναι το ότι την πρόσδεση του FOXA2 στη θέση B δεν μπόρεσε να την ανταγωνιστεί ένα μη

βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής -34/-1 του ABCA1, στο οποίο το TATA-box είχε μεταλλαχθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μοιάζει σε αυτό του ανθρώπινου γονιδίου του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1} (ABCA1/p21TATA, εικ.61A), ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (εικ.61B, θέσεις 9-12) επιβεβαιώνοντας έτσι την ειδικότητα του FOXA2 για το στοιχείο TATA του

A



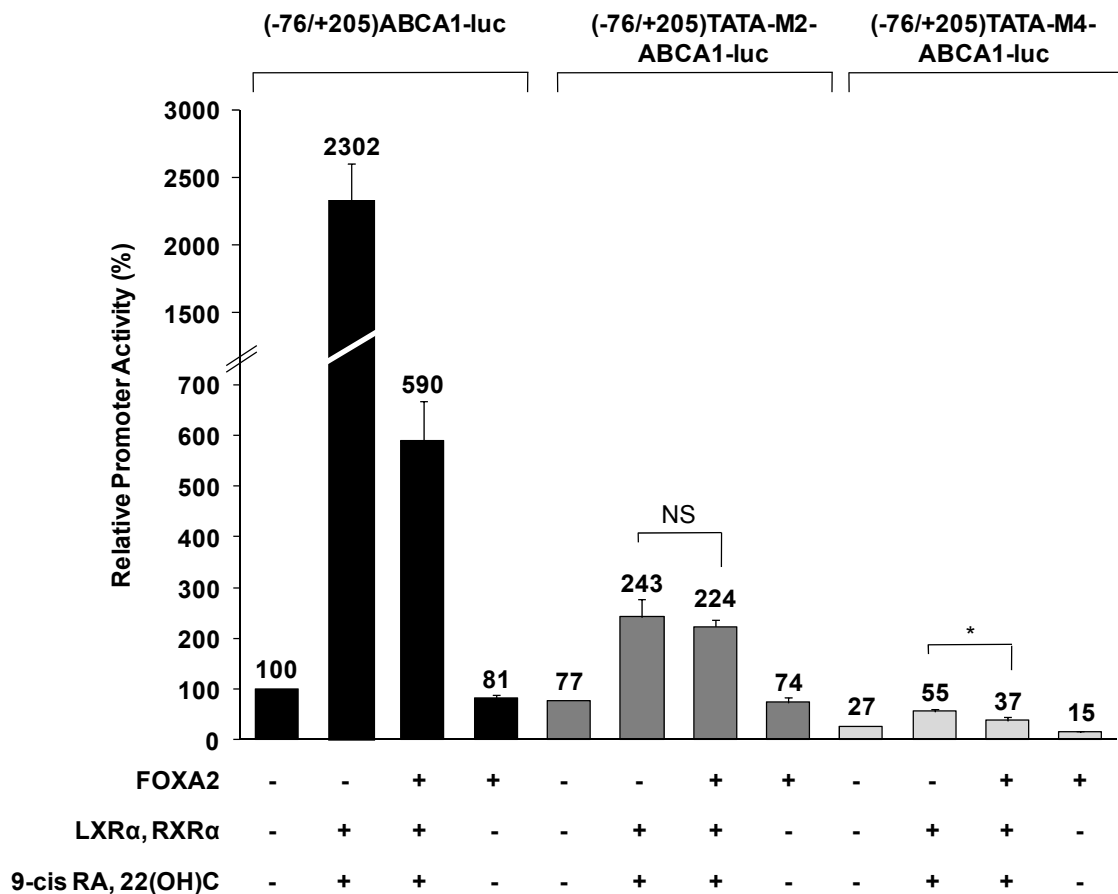
B



ABCA1.

Εικόνα 61: Ο FOXA2 προσδέθηκε στο στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 με μικρή συγγένεια. (A) Σχηματική αναπαράσταση των μη βιοτινυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στην αγρίου τύπου (ABCA1/wtTATA) ή τη μεταλλαγμένη (ABCA1/p21TATA) περιοχή -34/-1 του υποκινητή του ABCA1 η οποία περιλαμβάνει το TATA-box και χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσδεσης στο B. Οι μεταλλαγές σημειώνονται με έντονη γραφή και υπογράμμιση. (B) Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με φορέα έκφρασης για FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP με το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη θέση B (-122/-90). Η πρόσδεση στη θέση B ανταγωνίστηκε από αυξανόμενες συγκεντρώσεις (1x, 2x, 3x) από μη βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στη θέση B (-122/-90), την περιοχή -34/-1 με το αγρίου τύπου TATA-box (ABCA1/wtTATA) ή την περιοχή -34/-1 με το μεταλλαγμένο TATA-box (ABCA1/p21TATA), όπως φαίνονται στο A. Η πρωτεΐνη FOXA2 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2.

Προκειμένου να εξετάσουμε περαιτέρω το ρόλο του TATA-box στην καταστολή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από τον FOXA2, εισάγαμε τις μεταλλαγές TATA-M2 και TATA-M4, όπως περιγράφονται στην εικόνα 60A, στο πλασμίδιο (-76/+205) ABCA1-luc και πραγματοποιήσαμε πειράματα διαμόλυνσης στα κύτταρα HEK293T. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε αυτό το τμήμα για τη μεταλαξίγνεση είναι για να αποφευχθεί η παρεμβολή από τις θέσεις πρόσδεσης του FOXA2, A και B, οι οποίες βρίσκονται ανοδικά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 62, το τμήμα -76/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ενεργοποιήθηκε ισχυρά από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους (23 φορές) και αυτή η ενεργοποίηση μειώθηκε 6 φορές από τον FOXA2. Αντίθετα, το τμήμα (-76/+205)TATA-M2 που φέρει τις μεταλλαγές στον πυρήνα της αλληλουχίας του TATA-box ενεργοποιήθηκε μόλις 3,2 φορές από τους LXRα/RXRα και τους συνδέτες τους, αλλά ο FOXA2 δεν ήταν σε θέση να καταστείλει αυτή την ενεργοποίηση. Το τμήμα (-76/+205)TATA-M4 που φέρει τις μεταλλαγές εκατέρωθεν του TATA-box παρουσίασε πολύ χαμηλά βασικά επίπεδα μεταγραφής, ενεργοποιήθηκε μόλις 2 φορές από τους LXRα/RXRα και τους συνδέτες τους, αλλά ο FOXA2 κατέστειλε αυτή την ενεργοποίηση κατά περίπου 50%.

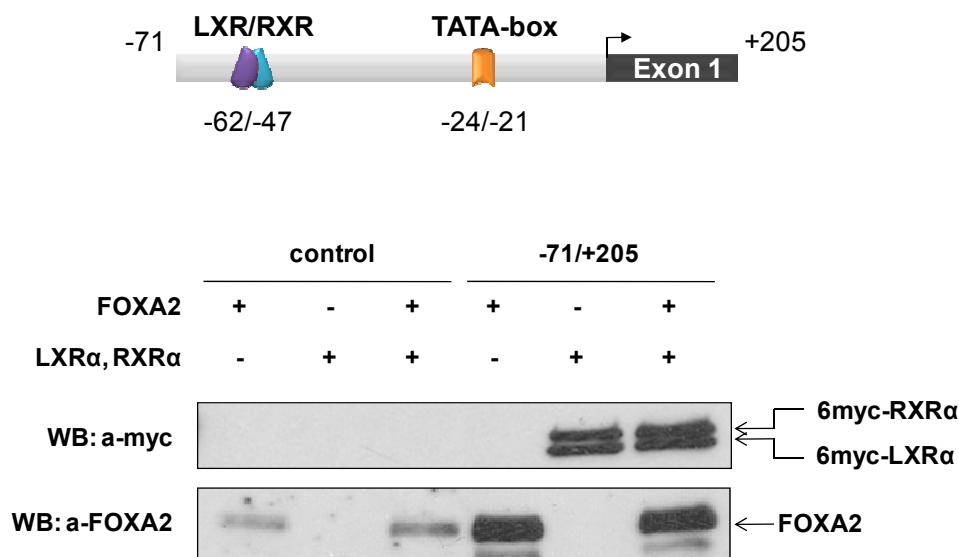


Εικόνα 62: Μεταλλαγές στο TATA-box του υποκινητή του ABCA1 οδήγησαν σε απώλεια της καταστολής από τον FOXA2. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-76/+205)-ABCA1-luc, (-76/+205)TATA-M2-ABCA1-luc ή (-76/+205)TATA-M4-ABCA1-luc (250ng το καθένα) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) ή για τον FOXA2 (50ng) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10⁻⁶M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. *, p<0.05. NS, μη σημαντικό.

Περίληπτικά, τα ευρήματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 58-62 ταυτοποιούν το στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ως μία καινούρια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα FOXA2 η οποία ρυθμίζει αρνητικά την επαγωγή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή.

Η πρόσδεση του FOXA2 στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 δεν επηρεάζει την πρόσδεση των LXRα/RXRα στο LXRE

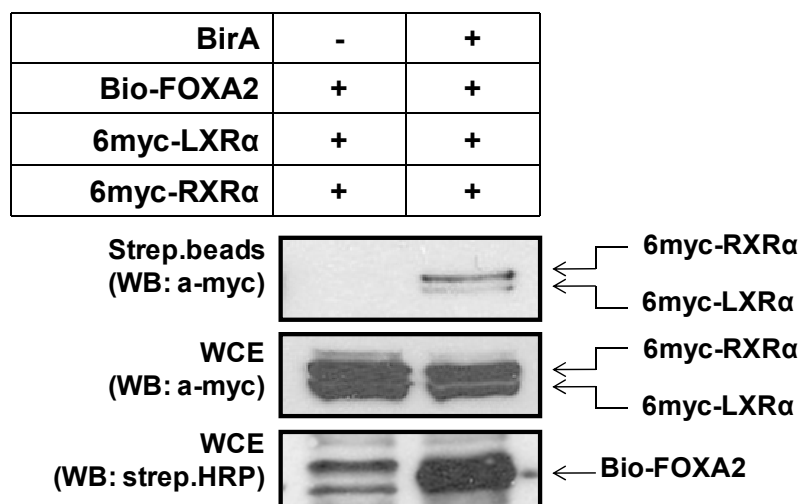
Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό δράσης του FOXA2 στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ελέγξαμε αν η πρόσδεση του FOXA2 στο στοιχείο αυτό αναστέλει την πρόσδεση των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα στη θέση LXRE που εντοπίζεται στην κοντινή περιοχή. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε DNAP με βιοτινυλιωμένο τμήμα PCR που αντιστοιχεί στην περιοχή -71/+205 που περιλαμβάνει τόσο το LXRE όσο και το TATA-box. Όπως φαίνεται στην εικόνα 63, το ετεροδιμερές LXRα/RXRα προσδέθηκε εξίσου αποτελεσματικά στο LXRE είτε απουσία ή παρουσία του FOXA2 του οποίου η πρόσδεση φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας 63 και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία των LXRα/RXRα στην ίδια περιοχή.



Εικόνα 63: Τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα προσδέθηκαν ταυτόχρονα με τον FOXA2 στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1. (A) Σχηματική αναπαράσταση του βιοτινυλιωμένου τμήματος PCR που αντιστοιχεί στην περιοχή -71/+205 του υποκινητή του ABCA1 η οποία περιλαμβάνει το LXRE και το TATA-box και χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα DNAP στο B. (B) Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με φορείς έκφρασης για τους 6myc-LXRα, 6myc-RXRα ή με ένα φορέα έκφρασης για τον FOXA2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP με το βιοτινυλιωμένο τμήμα PCR που φαίνεται στο επάνω μέρος της εικόνας. Η πρόσδεση των LXRα/RXRα ανιχνεύθηκε με Western blotting με το αντίσωμα α-myc (επάνω μέρος) ενώ η πρόσδεση της πρωτεΐνης FOXA2 ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2 (κάτω μέρος).

Ο FOXA2 αλληλεπιδρά φυσικά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα

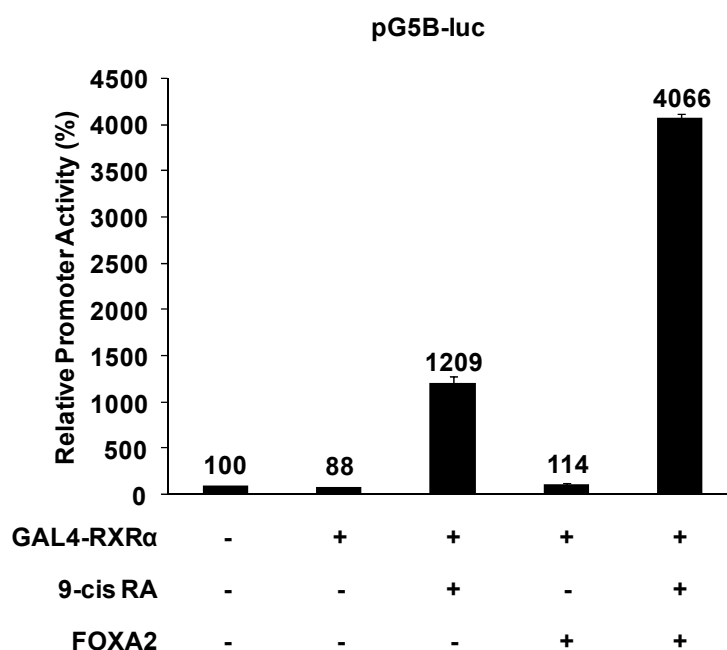
Από τη στιγμή που η πρόσδεση του FOXA2 δεν επηρεάζει την πρόσδεση των πυρηνικών υποδοχέων στον υποκινητή του ABCA1 εξετάσαμε το ενδεχόμενο ο FOXA2 να αλληλεπιδρά με τους LXRα/RXRα και να τους εμποδίζει να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που βασίζεται στη βιοτινυλίωση της μιας πρωτεΐνης *in vivo* (στη συγκεκριμένη περίπτωση του FOXA2). Πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα HEK293T με φορείς έκφρασης για 6myc-LXRα ή 6myc-RXRα μαζί με ένα φορέα έκφρασης για FOXA2, ο οποίος φέρει τον επίτοπο Bio στο αμινοτελικό άκρο, απουσία και παρουσία της λιγάσης της βιοτίνης BirA. Το εκχύλισμα των κυττάρων επωάστηκε με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης-αγαρόζης (streptavidin-agarose beads) και οι πρωτεΐνες που είχαν προσδεθεί αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc. Όπως φαίνεται στην εικόνα 64, πάνω σειρά, ο βιοτινυλιωμένος FOXA2 αλληλεπίδρασε με τις πρωτεΐνες των ετεροδιμερών LXRα/RXRα *in vivo*. Τα επίπεδα έκφρασης των 6myc-LXRα και 6myc-RXRα στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα φαίνονται στη μεσαία σειρά. Στην τελευταία σειρά φαίνεται η αποτελεσματικότητα της BirA να βιοτινυλιώνει τον FOXA2.



Εικόνα 64: Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXA2 και των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα *in vivo*. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμολύνηση με τους φορείς έκφρασης Bio-FOXA2 (7,5μg), 6myc-LXRα, 6myc-RXRα (10μg ο καθένας) και BirA (7,5μg). Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα βέλη στη δεξιά μεριά δείχνουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες στο Western Blot. WCE, whole cell extract; WB, Western blotting; strep. beads, streptavidin–agarose beads; strep. HRP, straptavidin-conjugated horseradish peroxidase.

Ο FOXA2 μπορεί να δράσει ως συνενεργοποιητής της σηματοδότησης από τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα

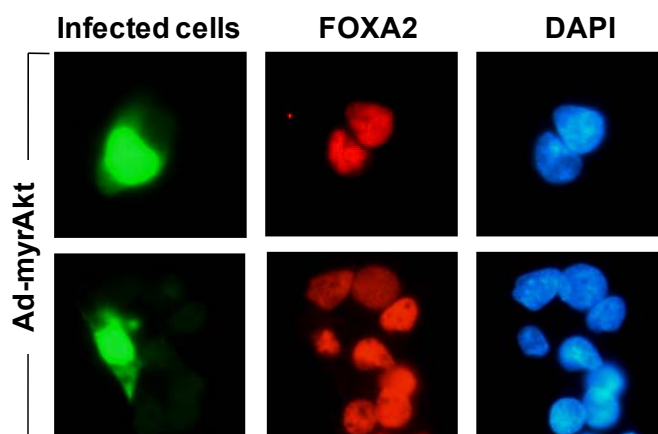
Εφόσον δείξαμε ότι ο FOXA2 είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα, θελήσαμε στη συνέχεια να εξετάσουμε αν αυτή η αλληλεπίδραση μειώνει την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το σύστημα ενεργοποίησης GAL4 και πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα HEK293T χρησιμοποιώντας τον υποδοχέα RXRα σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ισχυρού ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 και ένα τεχνητό υποκινητή αποτελούμενο από πέντε επαναλήψεις της θέσης πρόσδεσης του GAL4 (pG5B-luc). Όπως φαίνεται στην εικόνα 65, η πρωτεΐνη GAL4-RXRα ενεργοποίησε ισχυρά τη μεταγραφή παρουσία του συνδέτη 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος, ενώ η έκφραση του FOXA2 δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργοποίηση του τεχνητού υποκινητή. Ωστόσο, όταν ο FOXA2 εκφράστηκε παρουσία του GAL4-RXRα και του συνδέτη του παρατηρήσαμε συνεργατική ενεργοποίηση της μεταγραφής, υποδηλώνοντας ότι σε ένα πλαίσιο διαφορετικό από αυτό του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ο FOXA2 μπορεί να δράσει ως ενεργοποιητής και όχι ως καταστολέας της μεταγραφής από τους LXRα/RXRα.



Εικόνα 65: Ο FOXA2 μπορεί να δράσει ως συνενεργοποιητής του πυρηνικού υποδοχέα RXRα. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc (1μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τον GAL4-RXRα (0,5μg) και τον FOXA2 παρουσία ή απουσία 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

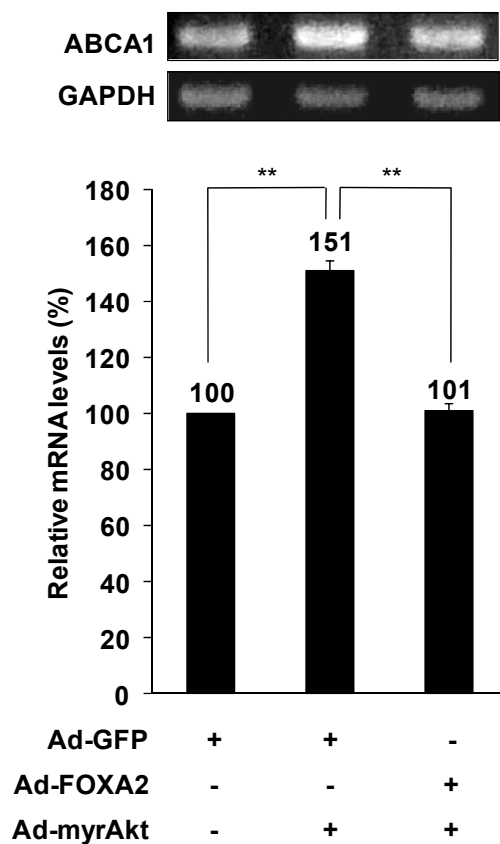
Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt/PKB δεν επιδρά στην κατασταλτική δράση του FOXA2 πάνω στους LXRα/RXRα

Όπως έχει δειχθεί πρόσφατα, η Akt/PKB, που δρα καθοδικά της PI3 κινάσης, μπορεί να φωσφορυλιώνει τον FOXA2 στη θρεονίνη 156 και να εμποδίζει τη δράση του συγκρατώντας τον στο κυτταρόπλασμα (268). Θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση της φωσφορυλίωσης του FOXA2 από την Akt/PKB στην έκφραση του γονιδίου ABCA1 κάτω από βασικές ή επαγόμενες συνθήκες. Αρχικά παρατηρήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του FOXA2 στα κύτταρα HepG2 τα οποία είχαμε μολύνει με έναν αδενοϊό ο οποίος εκφράζει μια συνεχώς ενεργή μορφή (myristoylated) της κινάσης Akt (321). Τα κύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον αδενοϊό της myrAkt (εικόνα 66, φωτογραφίες στα αριστερά) διακρίθηκαν από τα μη μολυσμένα κύτταρα με τη βοήθεια ενός αντισώματος που αναγνωρίζει πρωτεΐνες του αδενοϊού. Όπως φαίνεται στις μεσαίες φωτογραφίες της εικόνας 66, ο FOXA2 εντοπίστηκε στον πυρήνα τόσο των κυττάρων που εκφράζαν τη myrAkt όσο και των κυττάρων που δεν είχαν μολυνθεί από τον αδενοϊό.



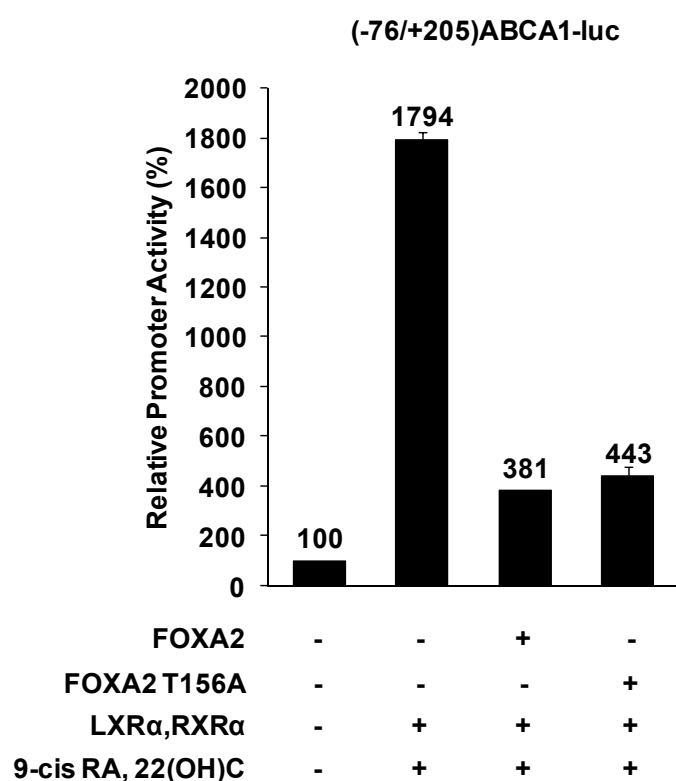
Εικόνα 66: Η κινάση Akt δεν επηρέασε τον πυρηνικό εντοπισμό του FOXA2. Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-myrAkt για 3 ώρες (MOI: 40) και 24 ώρες αργότερα ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης FOXA2 ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-FOXA2 και με το α-goat IgG-ALEXA 555 ως δευτερεύον αντίσωμα. Τα κύτταρα που είχαν μολυνθεί από τον αδενοϊό Ad-myrAkt ταυτοποιήθηκαν με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-adenovirus και το α-mouse IgG-ALEXA 488 ως δευτερεύον αντίσωμα. Οι πυρήνες ανιχνεύθηκαν με χρώση DAPI.

Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης της Akt στα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 στα κύτταρα HepG2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 67, η υπερέκφραση της myrAkt αύξησε κατά 1,5 φορές τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1. Όταν μολύναμε τα κύτταρα με το συνδυασμό των αδενοϊών myrAkt και FOXA2 παρατηρήσαμε ότι η αύξηση στα επίπεδα mRNA του ABCA1 λόγω της Akt χάθηκε και η μεταγραφή του ABCA1 ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτή στα κύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον αδενοϊό ελέγχου που εκφράζει τη GFP. Η παρατήρηση αυτή φανερώνει ότι η δράση της Akt δεν αναστέλλει το κατασταλτικό αποτέλεσμα του FOXA2 στη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1.



Εικόνα 67: Ο FOXA2 ανταγωνίστηκε την κινάση Akt για την έκφραση του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς Ad-GFP, Ad-FOXA2 ή Ad-myrAkt για 3 ώρες με MOI 40. Το RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα 24 ώρες μετά και υποβλήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR). Στο επάνω μέρος φαίνονται τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 και του GAPDH που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση. Οι κανονικοποιημένες τιμές φαίνονται στο κάτω μέρος ως ιστόγραμμα. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. **, $p < 0.001$.

Προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο της φωσφορυλίωσης του FOXA2 στη θρεονίνη 156, κατασκευάμε μια μεταλλαγμένη μορφή του FOXA2, η οποία δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την Akt στη θρεονίνη 156 (FOXA2 T156A). Όπως φαίνεται στην εικόνα 68, σε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HEK293T η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη μπορούσε να καταστείλει την επαγωγή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από τους LXRα/RXRα και τους συνδέτες τους (22-(R)-υδροξυστερόλη και 9-*cis*-ρετινοϊκό οξύ) στον ίδιο βαθμό με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.



Εικόνα 68: Η μεταλλαγμένη μορφή του FOXA2 (T156A) εμπόδισε εξίσου αποτελεσματικά την επαγωγή του υποκινητή του ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-76/+205)-ABCA1-luc (250ng) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας), τον αγρίου τύπου FOXA2 ή τη μεταλλαγμένη μορφή, που δεν φωσφορυλιώνεται από την Akt (FOXA2 T156A) (50ng), παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος (10⁻⁶M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Η ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 από παράγοντες της οικογένειας των forkhead winged-helix πρωτεϊνών

Η λειτουργία του μεταφορέα ABCA1 στο ήπαρ είναι να διευκολύνει την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων στη φτωχή σε λιπίδια απολιποπρωτεΐνη A-I (APOA-I) στο πλάσμα, προωθώντας με τον τρόπο αυτό τη βιογένεση της HDL (322-324). Μεταλλαγές στο γονίδιο του ABCA1 οδηγούν στην ασθένεια Tangier η οποία χαρακτηρίζεται από σχεδόν ολοκληρωτική απουσία της HDL στην κυκλοφορία και από τη συσσώρευση εστέρων της χοληστερόλης σε πολλούς ιστούς (52-55). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του ABCA1 στο ήπαρ και στα μακροφάγα αυξάνει τα επίπεδα HDL στο πλάσμα και την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα ενώ μειώνει την αθηροσκλήρωση που επάγεται από τη διατροφή (325). Η κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση του ABCA1 στο ήπαρ μπορεί να ανοίξει το δρόμο σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές για τη διόρθωση των χαμηλών επιπέδων HDL σε άτομα με λιπιδικές διαταραχές. Επομένως, ουσίες που επάγουν την έκφραση του γονιδίου ABCA1 στο ήπαρ προβλέπεται ότι θα έχουν θεραπευτική αξία σε ασθενείς με σύνδρομο χαμηλής HDL. Παρόμοια θεραπευτική δυναμική προβλέπεται να έχουν ουσίες που θα εμποδίζουν μόρια τα οποία αναστέλουν τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1.

Η πρωτεΐνη FOXA2 είναι μέλος της οικογένειας των HNF-3 (hepatocyte nuclear factor 3)/forkhead μεταγραφικών παραγόντων στην οποία περιλαμβάνονται επίσης οι FOXA1 και FOXA3 (259). Όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες forkhead μοιράζονται μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA από την οποία πήραν και το όνομά τους (winged-helix) εξαιτίας της ομοιότητάς της με το σχήμα της πεταλούδας (326). Αναλογιζόμενοι τον υψηλό βαθμό ομοιότητας στην αλληλουχία και στη δομή των πρωτεϊνών forkhead, ειδικά στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (περισσότερο από 90% ομολογία), όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες forkhead αναμένεται ότι θα προσδένονται στο DNA με παρόμοιο τρόπο. Ωστόσο, οι αλληλουχίες που περιβάλλουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA καθώς και αμινοξέα που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της έλικας που αναγνωρίζει τη θέση-στόχο στο DNA μπορούν να επηρεάσουν την ειδικότητα της πρόσδεσης στο DNA (255, 327). Η παρουσία των δύο θέσεων πρόσδεσης στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα με την ομόφωνη αλληλουχία (consensus), υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες forkhead θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ρόλο στη ρύθμιση του ABCA1 και στην επαγωγή του ABCA1 από

τους LXRα/RXRα στα ηπατικά κύτταρα, τα μακροφάγα ή άλλους κυτταρικούς τύπους. Η υπόθεση αυτή απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 βρίσκονται πολλαπλά αρνητικά στοιχεία ρύθμισης της μεταγραφής

Οι δύο θέσεις πρόσδεσης για FOXA2 (θέσεις A και B) εντοπίζονται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCA1 η οποία περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης και για άλλους καταστολείς της μεταγραφικής ενεργότητας (εικόνα 49). Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας ZNF202 με τη δομή SCAN προσδένεται σε ένα μοτίβο G_nT στον υποκινητή του ABCA1 το οποίο εντοπίζεται ανάμεσα στις θέσεις πρόσδεσης FOXA2 (περιοχή -234/-215) και, όμοια με τον FOXA2, καταστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή του ABCA1 με δόσοεξεργτώμενο τρόπο (106). Επίσης όμοια με τον FOXA2, υψηλά επίπεδα ZNF202 στο κύτταρο εμποδίζουν την επαγωγή του υποκινητή του ABCA1 από τους LXRα/RXRα σε απόκριση στις οξυστερόλες (106). Δίπλα στη θέση A του FOXA2 υπάρχει ένα στοιχείο E-box που έχει δειχθεί προηγουμένως να απαιτείται για την πρόσδεση των Upstream Stimulatory Factors 1 και 2 (USF1/2) και της Fra2 στα μακροφάγα (103, 105). Το ίδιο E-box χρησιμεύει επίσης για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-2 (Sterol Regulatory Binding Protein 2), ενός κύριου ρυθμιστή του μεταβολισμού της χοληστερόλης, ο οποίος καταστέλλει τη μεταγραφή του ABCA1 σε απόκριση στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης (101). Η φυσιολογική σημασία αυτής της συγκεντρωμένης παρουσίας αρνητικών ρυθμιστικών στοιχείων στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 δίπλα σε ένα θετικό στοιχείο απόκρισης στους LXRα/RXRα (LXRE) είναι προς το παρόν άγνωστη. Μια ελκυστική ερμηνεία είναι ότι οι αρνητικοί αυτοί παράγοντες μπορούν να λειτουργούν ως ρυθμιστές της ενεργότητας του υποκινητή του ABCA1 που ελέγχουν την ισχυρή επίδραση των οξυστερολών και των άλλων συνδετών πάνω στη μεταγραφή του ABCA1 στο ήπαρ, τα μακροφάγα ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Μηχανισμός καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον FOXA2

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο FOXA2 καταστέλλει τόσο τη βασική (εικόνα 44) όσο και την επαγόμενη από οξυστερόλες (εικόνα 47) έκφραση του γονιδίου ABCA1 στα ηπατικά κύτταρα δεν είναι ξεκάθαρος αλλά τα ακόλουθα σενάρια μπορούν να εξεταστούν:

(α) Ο *FOXA2* καταστέλλει τη βασική ενεργότητα του υποκινητή του *ABCA1* μέσω πρόσδεσης στις θέσεις *A* και *B* και επακόλουθη στρατολόγηση συγκαταστολέων.

Παρόλο που αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει έναν αρνητικό ρόλο του *FOXA2* στην μεταγραφή, άλλα μέλη της οικογένειας των forkhead έχουν δειχθεί προηγουμένως να καταστέλουν τη μεταγραφή γονιδίων. Για παράδειγμα, ο *FOXK1* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Sin3b (scaffold protein), η οποία είναι συστατικό ενός συμπλόκου συγκαταστολέων το οποίο επίσης περιλαμβάνει HDACs (απακετυλάσες ιστονών) και/ή παράγοντες αναδόμησης νουκλεοσωμάτων και κατευθύνει την αντιστροφή της ανοιχτής δομής της χρωματίνης καταστέλλοντας έτσι γονίδια που βρίσκονται στη συνέχεια του μονοπατιού (328). Ο *FOXN3* αλληλεπιδρά με τον SKIP (Ski-interacting protein), μια πρωτεΐνη προσαρμογέα που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με σύμπλοκα καταστολέων που περιλαμβάνουν τη Sin3b και τις HDACs (329). Επιπρόσθετα, ο *FOXM1c* μπορεί να δρα είτε ως ενεργοποιητής ή ως καταστολέας της μεταγραφής και η κεντρική περιοχή ενεργοποίησης/καταστολής έχει δειχθεί να είναι σημαντική στο διπλό αυτό μηχανισμό ρύθμισης (330). Προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν άλλα μέλη της οικογένειας των forkhead, όπως ο *FOXA2*, θα μπορούσαν να λειτουργήσουν με τον παραπάνω τρόπο. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες TLE (transducin-like enhancer of split proteins) οι οποίες είναι συγκαταστολείς της μεταγραφής, συνδέονται απευθείας με τον *FOXA2* και αναστέλλουν την ικανότητα του να ενεργοποιεί τη μεταγραφή σε κύτταρα θηλαστικών (331).

(β) Η πρόσδεση του *FOXA2* στις θέσεις *A*, *B* και στο *TATA-box* αναστέλλει την πρόσδεση των ετεροδιμερών *LXRα/RXRα* στο στοιχείο *LXRE* εμποδίζοντας την επαγωγή του γονιδίου σε απόκριση στις οξυστερόλες.

Για να διερευνήσουμε αυτή την υπόθεση, πραγματοποιήσαμε πειράματα κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affinity precipitation) *in vitro* και δείξαμε ότι η πρόσδεση των *LXRα/RXRα* δεν επηρεάστηκε από την εκτοπική έκφραση του *FOXA2* και αντίστροφα (εικόνα 63). Αυτό το πείραμα έδειξε ότι η πρόσδεση των ετεροδιμερών *LXRα/RXRα* και του *FOXA2* στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του *ABCA1* μπορεί να λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα.

(γ) Ο FOXA2 αλληλεπιδρά φυσικά με τους πυρηνικούς υποδοχείς LXRα/RXRα εμποδίζοντας την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή.

Ορισμένα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών forkhead έχουν δείξει να αλληλεπιδρούν φυσικά με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες FOXO αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) (332), τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RAR) (333) και μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν τη δράση τους. Τόσο ο FOXH1 όσο και οι FOXA1 και FOXA2 έχουν δείξει ότι προσδένονται και ρυθμίζουν τον υποδοχέα των ανδρογόνων (334, 335). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ένας μηχανισμός σύγκλισης της σηματοδότησης μεταξύ πρωτεϊνών forkhead και του υποδοχέα α των οιστρογόνων (ERα) (336). Ο υποδοχέας PXR (pregnane X receptor) έχει αναφερθεί να αλληλεπιδρά φυσικά με τον FOXA2 και να καταστέλει τη μεσολαβούμενη από τον FOXA2 ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της παλμιτοϋλτρανσφεράσης της καρνιτίνης 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A) και της 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικής-CoA-συνθάσης 2 (3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA-synthase 2) που εμπλέκονται στη β-οξειδωση και στην κετογένεση αντίστοιχα στο ήπαρ κατά τη φάση της νηστείας (337). Μια αμοιβαία ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ του FOXO1 και του PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor γ) έχει αναφερθεί (338). Ενδιαφέρον για τη μελέτη μας παρουσιάζει το εύρημα ότι ο FOXO1 καταστέλει ισχυρά την μεταγραφή του SREBP-1c από τους LXR/RXR στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (339). Ωστόσο, άμεσες φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FOXO1 και των πυρηνικών υποδοχέων δεν αναφέρθηκαν στη μελέτη αυτή και οι ερευνητές υπέθεσαν ότι ο FOXO1 δρα ως μεταγραφικός συγκαταστολέας της σηματοδότησης από LXR (339).

Για πρώτη φορά εδώ δείχνουμε ότι ο FOXA2 αλληλεπιδρά φυσικά και με τους δύο πυρηνικούς υποδοχείς RXRα και LXRα *in vivo* (εικόνα 64). Ωστόσο, σε αντίθεση με τον FOXO1, ο FOXA2 δεν είναι μεταγραφικός συγκαταστολέας αλλά συνενεργοποιητής της σηματοδότησης από LXRα/RXRα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 65, ο FOXA2 ενίσχυσε ισχυρά την ενεργότητα του GAL4-RXRα παρουσία του συνδέτη του, 9-*cis* RA, υποδηλώνοντας ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. στο κατάλληλο πλαίσιο υποκινητή) ο FOXA2 και οι LXRα/RXRα θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή με συνεργατικό τρόπο.

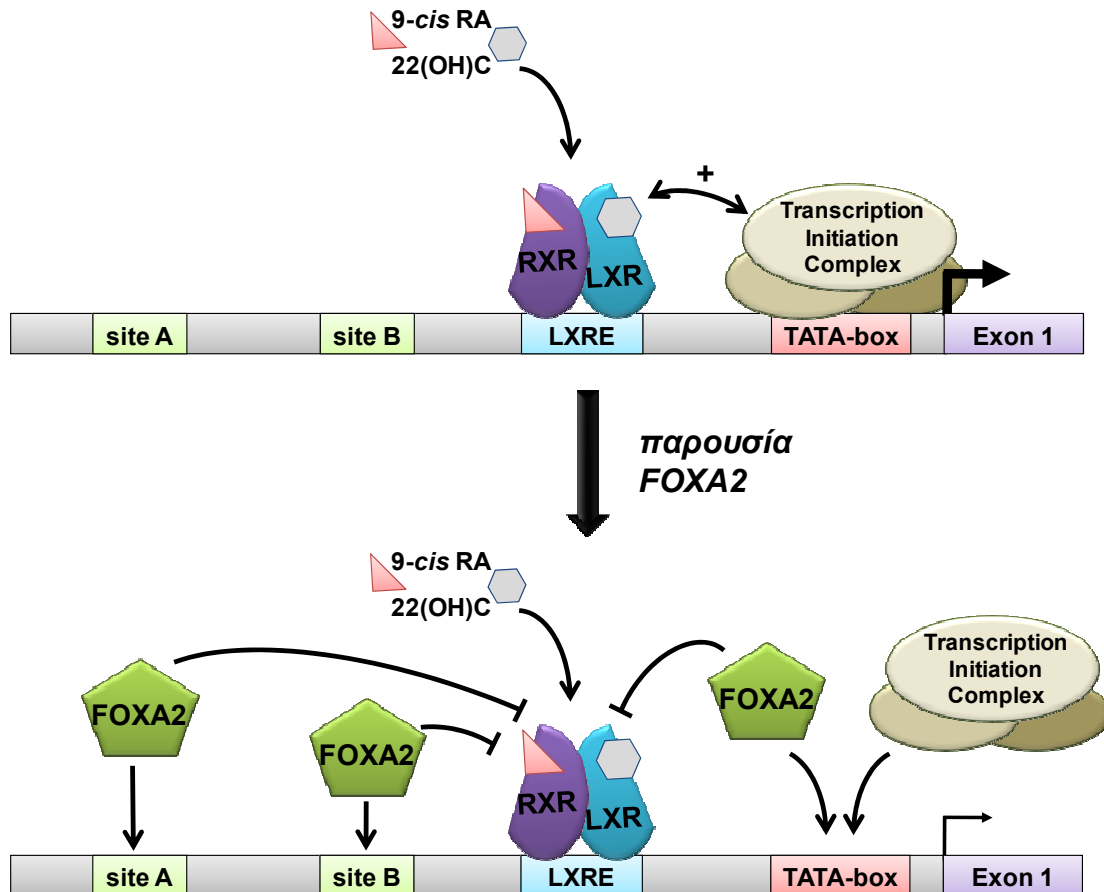
(δ) Ο FOXA2 παρεμβάλλεται στην αλληλεπίδραση των LXRα/RXRα με τη βασική μεταγραφική μηχανή.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 62, το TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης του FOXA2 και η πρόσδεση του FOXA2 σε αυτή τη θέση αναστέλλει τη σηματοδότηση από τους LXRα/RXRα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη που δείχνει ότι η πρόσδεση ενός άλλου μέλους της οικογένειας των forkhead, ο FOXM1c, στα δύο TATA-box των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου c-myc ενισχύει την ενεργότητα των υποκινητών του c-myc συνεργατικά με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (340, 341). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ο FOXA2 δεν μπορεί να αναστείλει τη βασική ενεργότητα της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 -76/+205 η οποία δεν περιέχει τις θέσεις του FOXA2, A και B, που βρίσκονται ανοδικά (εικόνα 50). Βασισμένοι σε αυτά τα ευρήματα υποθέσαμε ότι κάτω από συνθήκες επαγωγής του γονιδίου ABCA1, όπως κατά την διέγερση από οξυστερόλες μέσω των LXRα/RXRα, η πρόσδεση του FOXA2 στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 παρεμβάλλεται στη στρατολόγηση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων στο TATA-box και εμποδίζει με τον τρόπο αυτό τις αλληλεπιδράσεις των δυο πυρηνικών υποδοχέων με πρωτεΐνες της γενικής μεταγραφικής μηχανής (εικόνα 69). Αντίθετα, κάτω από συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης του FOXA2, το TATA-box δεν καταλαμβάνεται από τον FOXA2 και η επαγωγή του γονιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί (εικόνα 69). Άλλες πρωτεΐνες forkhead μπορεί να είναι σε θέση να παίξουν παρόμοιο ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του ABCA1 αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Ο ανασταλτικός ρόλος του FOXA2 στη σηματοδότηση των LXRα/RXRα δεν επηρεάζεται από το μονοπάτι της Akt/PKB

Ο γενετικός χειρισμός ζώων έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με το ρόλο του FOXA2 στην ομοιόσταση της γλυκόζης, τη χρησιμοποίηση της ενέργειας, την ομοιόσταση των χολικών οξέων και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (265-267, 320). Πρόσφατα, ο Stoffel και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η χορήγηση ινσουλίνης στα κύτταρα HepG2 αναστέλλει τον FOXA2 και ότι αυτός ο μηχανισμός απαιτεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση του FOXA2 (268). Πιο συγκεκριμένα, οι συγγραφείς αυτοί έδειξαν ότι ακολούθως της διέγερσης από ινσουλίνη, ο FOXA2 αλληλεπιδρά φυσικά με την Akt/PKB, ενός κύριου μεσολαβητή του μονοπατιού της PI3 κινάσης (phosphoinositol 3 phosphate kinase), και φωσφορυλιώνεται από την Akt/PKB στη θρεονίνη 156 (268). Η φωσφορυλίωση αυτή

έδειξαν ότι αναστέλλει τον πυρηνικό εντοπισμό του FOXA2 και ως συνέπεια, την ικανότητά του να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση (268). Προχωρήσαμε επομένως να εξετάσουμε το ρόλο της επαγόμενης από την Akt/PKB φωσφορυλίωσης του FOXA2 στην έκφραση του γονιδίου ABCA1 κάτω από βασικές συνθήκες ή κατά την επαγωγή από τις οξυστερόλες. Αρχικά, παρατηρήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του FOXA2 στα κύτταρα HepG2 τα οποία είχαν μολυνθεί με τον ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εκφράζει μια συνεχώς ενεργή μορφή (myristoylated) της κινάσης Akt (321). Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη (268), βρήκαμε ότι ο πυρηνικός εντοπισμός του FOXA2 στα κύτταρα HepG2 δεν επηρεάστηκε από την υπερέκφραση της myrAkt (εικόνα 66). Στη συνέχεια μετρήσαμε τα επίπεδα mRNA του ABCA1 στα κύτταρα HepG2 που είχαν μολυνθεί με τον αδενοϊό που εκφράζει τη myrAkt και δείξαμε ότι η myrAkt αύξησε τα επίπεδα mRNA του ABCA1 κατά 1,5 φορές (εικόνα 67). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εκτοπική έκφραση του FOXA2 μέσω αδενοϊού εξακολουθούσε να καταστέλει την έκφραση του ABCA1 παρά την παρουσία της υπερεκφρασμένης ενεργής Akt υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση της Akt δεν αντισταθμίζει την ανασταλτική δράση του FOXA2 στην έκφραση του ABCA1. Επίσης δείξαμε ότι η μεταλλαγμένη μορφή του FOXA2 που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την Akt (FOXA2 T156A) ήταν εξίσου αποτελεσματική στην αναστολή της επαγωγής του υποκινητή του ABCA1 από τα ετεροδιμερή των LXRα/RXRα παρουσία των συνδετών τους (εικόνα 68). Η παρατήρηση ότι η σηματοδότηση από την Akt/PKB αυξάνει την έκφραση του γονιδίου ABCA1 (εικόνα 67) είναι πολύ ενδιαφέρουσα και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει μια θετική επίδραση της σηματοδότησης ινσουλίνη/PI3K/Akt στη βιογένεση της HDL. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη συνδυασμένη με αντισταθμιστική υπερινσουλιναϊμία συνδέεται με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, χαμηλά επίπεδα HDL στο πλάσμα καθώς και με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών ασθενειών (342, 343). Μία πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι η αναστολή της ενεργοποίησης της απολιποπρωτεΐνης M (APOM) από τον FOXA2 σε καταστάσεις ανθεκτικότητας ινσουλίνης συμβάλλει στα χαμηλά επίπεδα HDL στα ποντίκια (344). Κατανοώντας το μηχανισμό με τον οποίο η σηματοδότηση από την Akt/PKB αυξάνει την έκφραση του γονιδίου ABCA1 ή άλλων γονιδίων στη βιογένεση και το μεταβολισμό της HDL, καθώς και τον πιθανό ρόλο πρωτεϊνών forkhead όπως ο FOXA2 ή ο FOXO1 που ρυθμίζονται από την Akt (345) σε αυτές τις διαδικασίες, μπορεί να ρίξει φως στη λειτουργική σχέση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων HDL στο πλάσμα και την υπερινσουλιναϊμία/ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη.



Εικόνα 69: Προτεινόμενο μοντέλο για τον ανασταλτικό ρόλο του FOXA2 στο σηματοδοτικό μονοπάτι των LXRα/RXRα στον υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Απουσία του FOXA2 η επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή διευκολύνεται από τη συνεργατική αλληλεπίδραση μεταξύ του ετεροδιμερούς LXRα/RXRα και του συμπλόκου της βασικής μεταγραφικής μηχανής που συγκροτείται στο TATA-box. Ο FOXA2 μπορεί να προσδένεται στον υποκινητή του ABCA1 στη θέση A, στη θέση B και στο TATA-box όπου είναι πιθανό να ανταγωνίζεται τη βασική μεταγραφική μηχανή. Η πρόσδεση του FOXA2 στις παραπάνω θέσεις αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης του ABCA1 μέσω του ετεροδιμερούς LXRα/RXRα και των συνδετών τους.

Μέρος III

Ταυτοποίηση και Χαρακτηρισμός Ρυθμιστικών Στοιχείων που Εδράζονται στο Πρώτο Ιντρόνιο του Γονιδίου ABCA1

A. Ο διπλός ρόλος των πρωτεϊνών SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) στη ρύθμιση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1

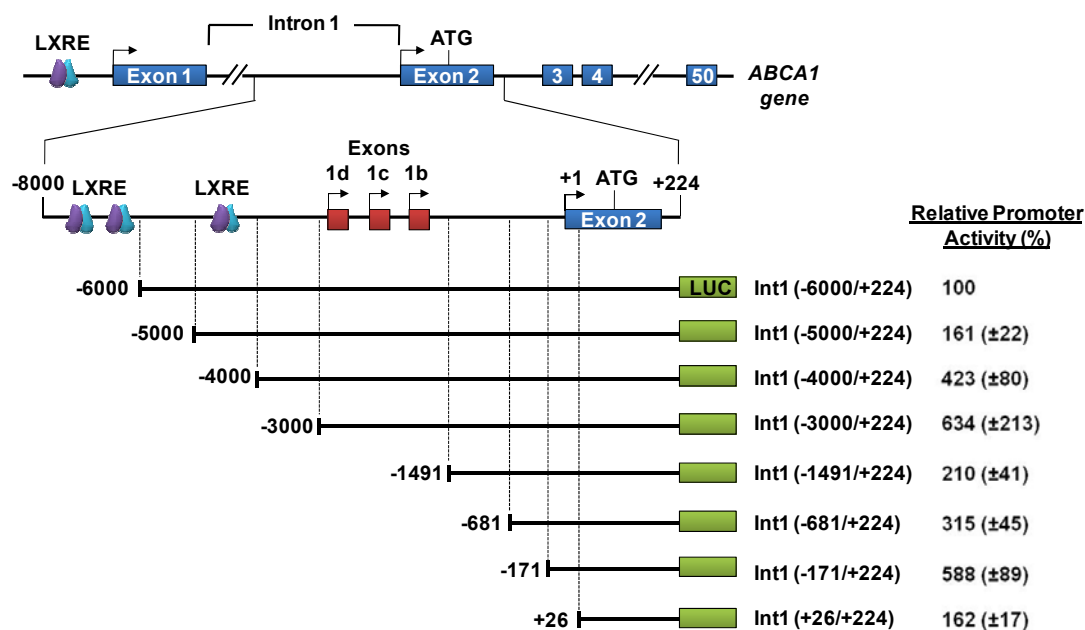
Αποτελέσματα

Ταυτοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων στο πρώτο ιντρόνιο του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 τα οποία απαιτούνται για την ενεργότητά του στα ηπατικά κύτταρα

Σε μια προηγούμενη εργασία, όπου είχαν χρησιμοποιηθεί διαγονιδιακά ποντίκια BAC, είχε δείχθει ότι ένας εσωτερικός υποκινητής μέσα στο πρώτο ιντρόνιο είναι λειτουργικός *in vivo* και συνεισφέρει απευθείας στη ρύθμιση του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 σε διάφορους ιστούς και στην αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης, της apoA-I και της apoA-II στο πλάσμα (114). Το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1 εκτείνεται σε μια περιοχή 24kb και περιλαμβάνει πολλαπλά σημεία έναρξης της μεταγραφής από τα οποία παράγονται εναλλακτικά μετάγραφα που ξεκινούν από τα εξόνια 1d, 1c, 1b και 2 (Εικόνα 70) (115, 117, 346). Το πρώτο ιντρόνιο περιλαμβάνει επίσης θέσεις πρόσδεσης για τα ετεροδιμερή LXR/RXR (LXREs) τα οποία μεσολαβούν στην επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες (114).

Η περιοχή ανάμεσα στα νουκλεοτίδια -8000 και +1 (αναφορικά με το σημείο έναρξης του εξονίου 2) έχει δείχθει ότι είναι ικανή να προάγει τη μεταγραφή ενός γονιδίου αναφοράς σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές όπως είναι η HepG2 (ήπατος), η HuH7 (ηπατώματος), η CaCo2 (εντέρου) και η RK13 (νεφρού) (114). Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε ρυθμιστικά στοιχεία μέσα στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1, κλωνοποιήσαμε μια περιοχή 6kb (-6000/+224) του ιντρονίου 1 από γενωμικό DNA ανθρώπου και κατασκευάσαμε μια σειρά από απαλοιφές στο 5' άκρο, οι οποίες παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 70. Όλα τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης και η μεταγραφική τους ενεργότητα καθορίστηκε με παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2. Για να διακρίνονται τα τμήματα του ιντρονίου από αυτά του κανονικού υποκινητή ανοδικά του πρώτου εξονίου, έχουν σημειωθεί με το πρόθεμα Int1 (Intron 1). Όπως φαίνεται στην εικόνα 70, παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ενεργότητα του υποκινητή του ιντρονίου 1 όταν αφαιρέσαμε διαδοχικά τα νουκλεοτίδια μέχρι το -5000, -4000 και -3000 (1,6-, 4,23- και 3,34-φορές αύξηση αντίστοιχα αναφορικά με το πλήρους μήκους τμήμα του υποκινητή -6000/+224) υποδηλώνοντας την παρουσία αρνητικών ρυθμιστικών στοιχείων στην περιοχή -6000/-3000. Επιπλέον απαλοιφή μέχρι το νουκλεοτίδιο -

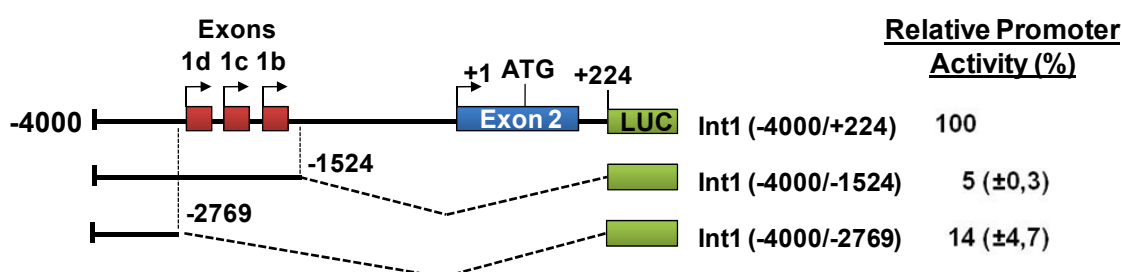
1491 μείωσε περαιτέρω την ενεργότητα του υποκινητή του ιντρονίου του ABCA1 κατά 3 φορές. Αυτή η πτώση στην ενεργότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στην αφαίρεση των τριών εναλλακτικών εξονίων (εξόνια 1 b-d) και των πιθανών ρυθμιστικών τους στοιχείων (Εικόνα 70). Η απαλοιφή του τμήματος μέχρι το -171 αποκατέστησε την ενεργότητα του υποκινητή του ιντρονίου 1 (σε παρόμοια επίπεδα με το τμήμα -3000/+224). Αντίθετα, η απαλοιφή του υποκινητή μέχρι το νουκλεοτίδιο +26 μείωσε την ενεργότητά του 3,6 φορές.



Εικόνα 70: Το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1 του ανθρώπου περιλαμβάνει έναν ενεργό υποκινητή. Επάνω: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου ABCA1, όπου φαίνεται με λεπτομέρεια η περιοχή των 8kb ανοδικά του εξονίου 2 η οποία περιλαμβάνει τρεις θέσεις πρόσδεσης για LXR/RXR (LXRE) και τρία διαφορετικά σημεία έναρξης της μεταγραφής (1d, 1c, 1b). Η αρχή του εξονίου 2 ορίζεται ως +1 και το ATG βρίσκεται στο +93. Κάτω: Σχηματική αναπαράσταση (αριστερά) των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν σε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 (1μg η καθεμία) και περιλαμβάνουν τμήμα της περιοχής του ιντρονίου 1 και του εξονίου 2 του γονιδίου ABCA1. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται στην δεξιά στήλη. Luc, luciferase.

Όπως επισημάνθηκε και νωρίτερα, το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1 περιλαμβάνει τρία εναλλακτικά μετάγραφα, αποκαλούμενα εξόνια 1d, 1c και 1b τα οποία έχουν μήκος 178bp, 136bp και 120bp, αντίστοιχα (Εικόνα 70). Ένα στοιχείο CAAT βρίσκεται ανοδικά του εξονίου 1b, και στοιχεία CAAT και TATA βρίσκονται αμέσως ανοδικά του εξονίου 1c. Παρόμοια μετάγραφα που ξεκινούν από τα εξόνια

1d, 1c και 1b όπως και από το εξόνιο 2 βρέθηκαν και στους ανθρώπους (114). Προκειμένου να διερευνησουμε το αν η περιοχή που περιλαμβάνει τα εξόνια 1b-d ή βρίσκεται ανοδικά αυτών είναι μεταγραφικά ενεργή, κατασκευάσαμε δύο επιπλέον πλασμίδια αναφοράς. Στη μία κατασκευή το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της περιοχής ανοδικά των εξονίων 1b-d (-4000/-2769) και στην άλλη κατασκευή το τμήμα του υποκινητή επεκτάθηκε στο 3' άκρο (-4000/-1524) για να συμπεριλάβει τα τρία εξόνια μαζί με τις όποιες ρυθμιστικές περιοχές βρίσκονται ανάμεσά τους. Οι παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 με τις κατασκευές αυτές αποκάλυψαν ότι και οι δύο περιοχές είχαν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα βασικής ενεργότητας (14% και 5% σε σχέση με την ενεργότητα της πλήρους μήκους περιοχής -4000/+224, αντίστοιχα) (Εικόνα 71).



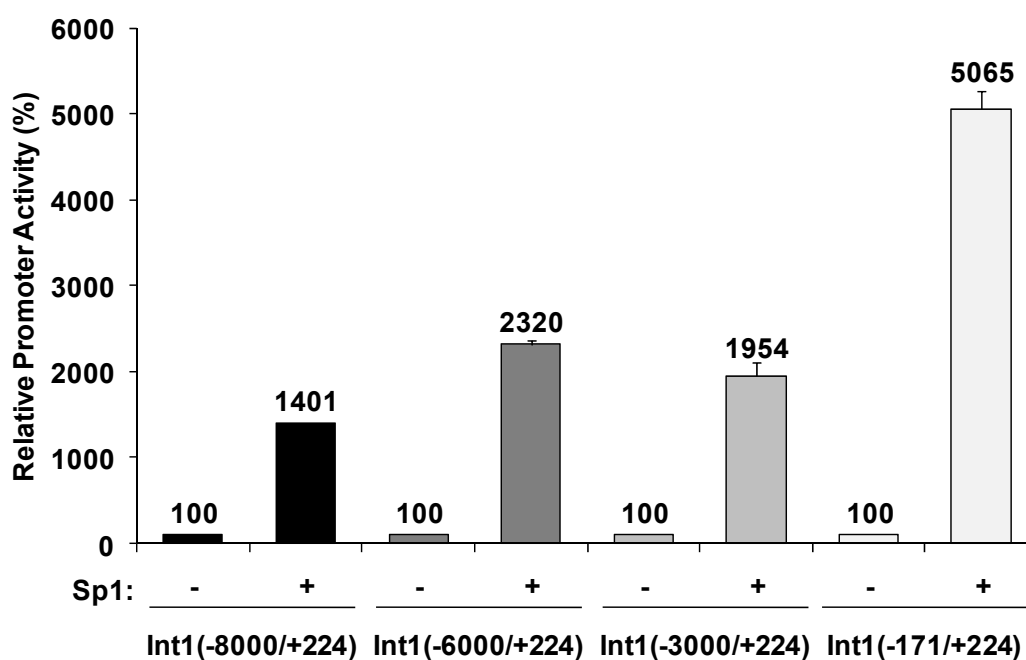
Εικόνα 71: Η περιοχή -1524/+224 ευθύνεται για τη μεταγραφική ενεργότητα του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο Int1(-4000/+224)-luc και με τα πλασμίδια Int1(-4000/+1524)-luc και Int1(-4000/+2769)-luc (1μg το καθένα) τα οποία αντιστοιχούν σε απαλοιφές του 3' άκρου της περιοχής -4000/+224. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται στη στήλη δεξιά.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των εικόνων 70 και 71 φανερώνουν ότι η περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 μεταξύ των νουκλεοτιδίων -171 και +1 αναφορικά με την αρχή του εξονίου 2 περιέχει ισχυρά θετικά ρυθμιστικά στοιχεία και ότι οι περιοχές ανοδικά ή ανάμεσα στα εξόνια 1b-d δεν είναι από μόνες τους ικανές να προάγουν τη μεταγραφή.

Ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 από το μεταγραφικό παράγοντα Sp1

Ο Sp1 (specificity protein 1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος προσδένεται κατά προτίμηση σε περιοχές πλούσιες σε GC οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό συστατικών ή επαγόμενων γονιδίων (169, 175). Ο Sp1 έχει δειχθεί

ότι προσδένεται σε πολλαπλές θέσεις στον κανονικό υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1 (ανοδικά του εξονίου 1) και ότι συνεργάζεται με τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα για τη βέλτιστη επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή (89, 103, 319). Προκειμένου να διερευνήσουμε την πιθανή εμπλοκή του Sp1 στη μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα S2 της Δροσόφιλας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 72, ο παράγοντας Sp1 ενεργοποίησε όλα τα τμήματα του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 που εξετάσαμε [Int1(-8000/+224), Int1(-6000/+224), Int1(-3000/+224) και Int1(-171/+224)] ενεργοποίηση κατά 14-, 23-, 19-, και 50-φορές, αντίστοιχα. Αυτή η ανάλυση δείχνει ότι η περιοχή -171/+224, η οποία στην εικόνα 70 παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης στα κύτταρα HepG2, είναι ικανή να μεσολαβήσει στην ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 από τον Sp1.



Εικόνα 72: Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 ενεργοποίησε τη μεταγραφή του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα Δροσόφιλας Schneider's S2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια Int1(-8000/+224)-luc, Int1(-6000/+224)-luc, Int1(-3000/+224)-luc and Int1(-171/+224)-luc (1,25μg το καθένα) μαζί με φορέα έκφρασης για τον Sp1 (0,5μg). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

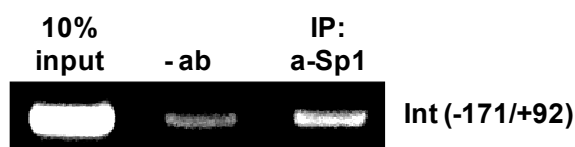
Μια έρευνα για πιθανά στοιχεία πρόσδεσης Sp1 σε αυτή την κοντινή περιοχή αποκάλυψε την παρουσία αρκετών θέσεων πρόσδεσης Sp1 οι οποίες εμφανίζουν χαμηλή ομολογία με την ομόφωνη ακολουθία που αναγνωρίζεται από τον Sp1 5'-GGGCGG-3' (Εικόνα 73).

```

-171   GGGTGAACCCAGAGGCTGGGAGCTGGTGA+CTCATGATCCATTGAGAAGCAGTCATGATGC
-111   AGAGCTGTGTGTTGGAGGTCTCAGCTGAGAGGGCTGGATTAGCAGTCCTCATTTGGTGTAT
-51    GGCTTTGCAGCAATAACTGATGGCTGTTTCC+CTCCTGCTTTATCTTTCA+GTTAATGACC
+10    AGCCACGGCGTCCCTGCTGTGAGCTCTGGCCGCTGCCTTCCAGGGCTCCCGACCCACACG
+70    CTGGGGGTGCTGGCTGAGGGAACATG+GCTTGTGGCCTCAGCTGAGGTTGCTGCTGTGGA
+130   AGAACCTCACTTTCAGAAGAAGACAAACA
  
```

Εικόνα 73: Η κοντινή περιοχή -171/+1 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 περιλαμβάνει πιθανές θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Η ανάλυση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Alibaba 2.1 και οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης Sp1 είναι υπογραμμισμένες. Ως +1 ορίστηκε η αρχή του εξονίου 2.

Επιβεβαιώσαμε τη φυσική αλληλεπίδραση του παράγοντα Sp1 με την κοντινή περιοχή -171/+92 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 *in vivo*, πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στα κύτταρα HepG2 (Εικόνα 74).

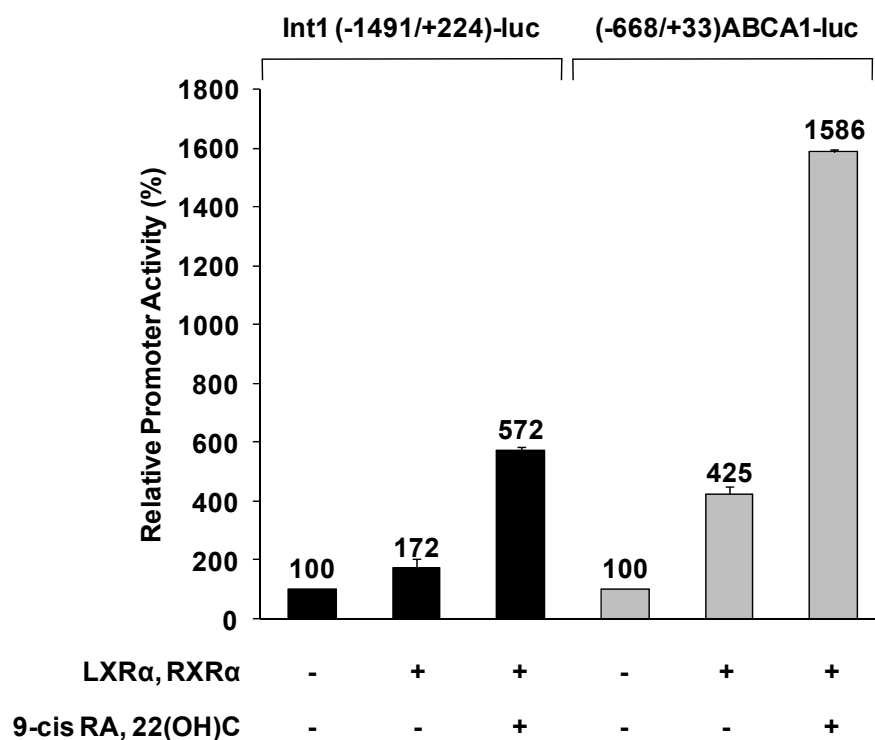


Εικόνα 74: Ο Sp1 προσδένεται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου ABCA1 *in vivo*. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το αντίσωμα α-Sp1 ή χωρίς αντίσωμα (αρνητικό δείγμα, -ab). Η χρωματίνη ελέγχθηκε με PCR με εκκινητές για την περιοχή -171/+92 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. IP, immunoprecipitation.

Τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα ρυθμίζουν έμμεσα την ενεργότητα του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες

Ορισμένες υδροξυλιωμένες μορφές της χοληστερόλης, οι οποίες είναι φυσικοί συνδέτες για τους υποδοχείς LXR (liver X receptors), επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 μέσω ρυθμιστικών στοιχείων που προσδένουν LXRα/RXRα

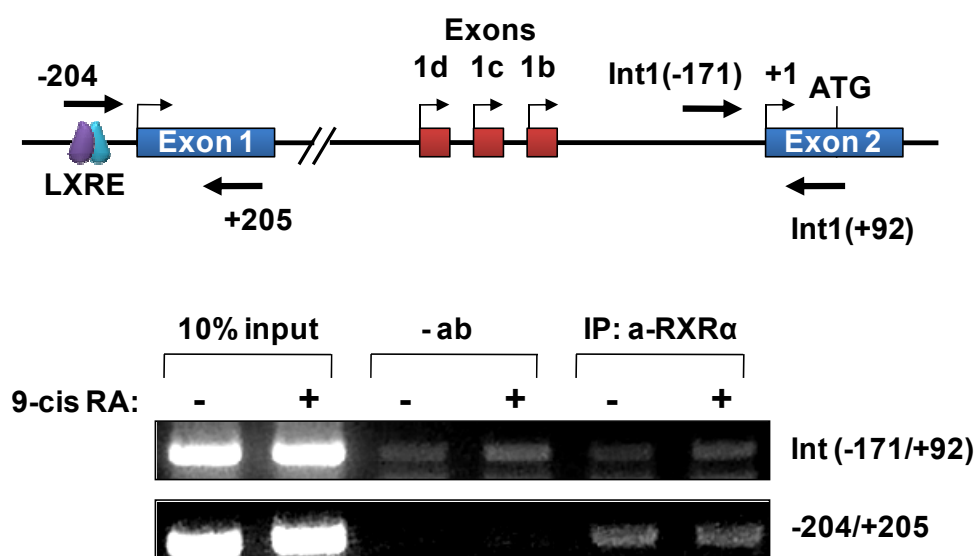
(LXREs) τα οποία βρίσκονται στον κανονικό υποκινητή (ανοδικά του εξονίου 1) καθώς και στη μακρινή περιοχή του υποκινητή του ιντρονίου 1 του ABCA1 (ανοδικά του -4000) (Εικόνα 70) (114, 319). Προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη πιθανών θέσεων LXRE στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ιντρονίου 1, πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HEK293T χρησιμοποιώντας δύο πλασμίδια αναφοράς, το Int1(-1491/+224)-luc, που αντιστοιχεί στην περιοχή του ιντρονίου 1, και το (-668/+33)ABCA1-luc, που αντιστοιχεί στον κανονικό υποκινητή ανοδικά του πρώτου εξονίου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 75, η περιοχή του υποκινητή του ιντρονίου 1 (-1491/+224) ενεργοποιείται από τους LXRα/RXRα παρουσία 9-cis ρετινοϊκού οξέος και 22(R)-υδροξυστερόλης αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό (5.7 φορές) σε σχέση με τον κανονικό υποκινητή (ενεργοποίηση 17 φορές).



Εικόνα 75: Ο κοντινός υποκινητής του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 ενεργοποιήθηκε από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Κύτταρα HEK293T υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια Int1(-1491/+224)-luc (1,25μg) και (-668/+33)-ABCA1-luc (50ng) μαζί με φορείς έκφρασης για τους υποδοχείς LXRα/RXRα (0,5μg ο καθένας) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης [22(OH)C] και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (9-cis RA) (10^{-6} M) για 24 ώρες. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την πιθανή φυσική αλληλεπίδραση των ετεροδιμερών LXRα/RXRα με την κοντινή περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1, πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης σε κύτταρα HepG2 παρουσία ή απουσία 9-cis ρετινοϊκού οξέος για 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα

76, ο ενδογενής RXRα προσδένεται στον κανονικό υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ανοδικά του εξονίου 1 (περιοχή -204/+205, κάτω σειρά) αλλά όχι στην κοντινή περιοχή -171/+92 του υποκινητή του ιντρονίου 1 (πάνω σειρά). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου 1 από τα ετεροδιμερή LXRα/RXRα και τους συνδέτες τους είναι έμμεση και θα μπορούσε να πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ενεργοποιούνται από οξυστερόλες και ρετινοειδή μέσω των LXRα/RXRα και στρατολογούνται στην κοντινή περιοχή αυτού του υποκινητή.

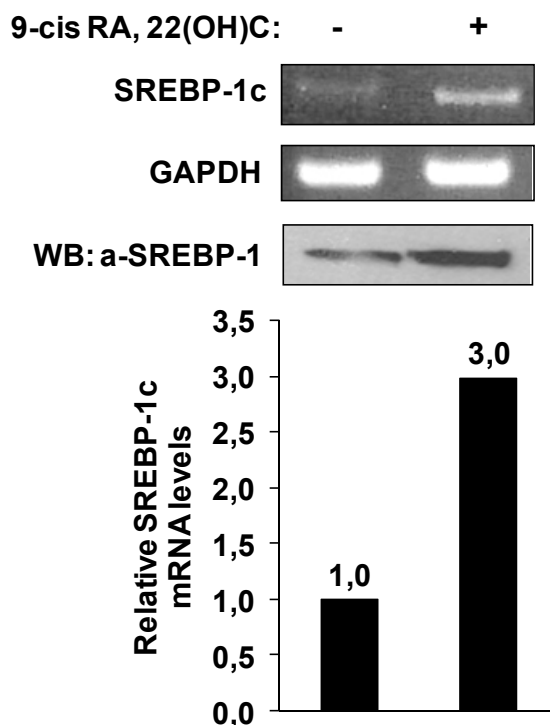


Εικόνα 76: Ο πυρηνικός υποδοχέας RXRα δεν στρατολογήθηκε στην περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Πάνω: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου ABCA1 όπου με τα μαύρα βέλη συμβολίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στο κάτω μέρος της εικόνας. Κάτω: Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το αντίσωμα α-RXRα ή χωρίς αντίσωμα (αρνητικό δείγμα, -ab) παρουσία ή απουσία 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Η χρωματίνη ελέγχθηκε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για την περιοχή -171/+92 (επάνω σειρά) του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 και για την περιοχή -204/+205 (κάτω σειρά) του κανονικού υποκινητή του γονιδίου ABCA1. IP, immunoprecipitation.

Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP-1c στρατολογείται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 σε απόκριση στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή

Έχει δείχθει ότι ο υποκινητής του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) περιέχει LXREs τα οποία

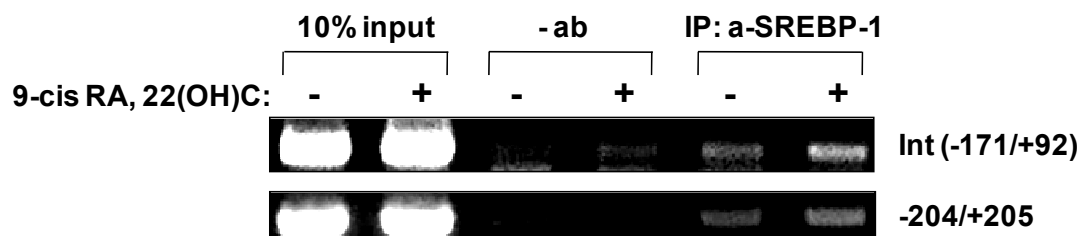
μεσολαβούν στη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου αυτού σε απόκριση στους συνδέτες του LXR (156, 160). Κατά συνέπεια, διερευνήσαμε αν ο παράγοντας SREBP-1c εμπλέκεται στη μεταγραφική επαγωγή του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή στα ηπατικά κύτταρα. Αρχικά, δείξαμε ότι η χορήγηση των συνδετών για τους υποδοχείς LXR α /RXR α [9-*cis* RA and 22(OH)C] στα κύτταρα HepG2 αύξησε ισχυρά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου SREBP-1c καθώς και τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Εικόνα 77).



Εικόνα 77: Επαγωγή του mRNA και των επιπέδων της πρωτεΐνης του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1c παρουσία οξυστερολών και ρετινοειδών. Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν απουσία ή παρουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης [22(OH)C] και 9-*cis*-ρετινοϊκού οξέος (9-*cis* RA) (10^{-6} M) για 24 ώρες. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου SREBP-1c ανιχνεύθηκαν με PCR. Ανιχνεύθηκαν επίσης και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ελέγχου GAPDH. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. Κάτω από τις εικόνες RT-PCR φαίνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης SREBP-1 όπως ανιχνεύθηκαν με Western Blot χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α -SREBP-1.

Στη συνέχεια πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης δείξαμε ότι ο SREBP-1c στρατολογείται στην κοντινή περιοχή -171/+92 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 απουσία των συνδετών 9-*cis* RA/22(OH)C και ότι η στρατολόγησή του ενισχύεται παρουσία αυτών των συνδετών (Εικόνα 78, πάνω σειρά). Ως δείγμα

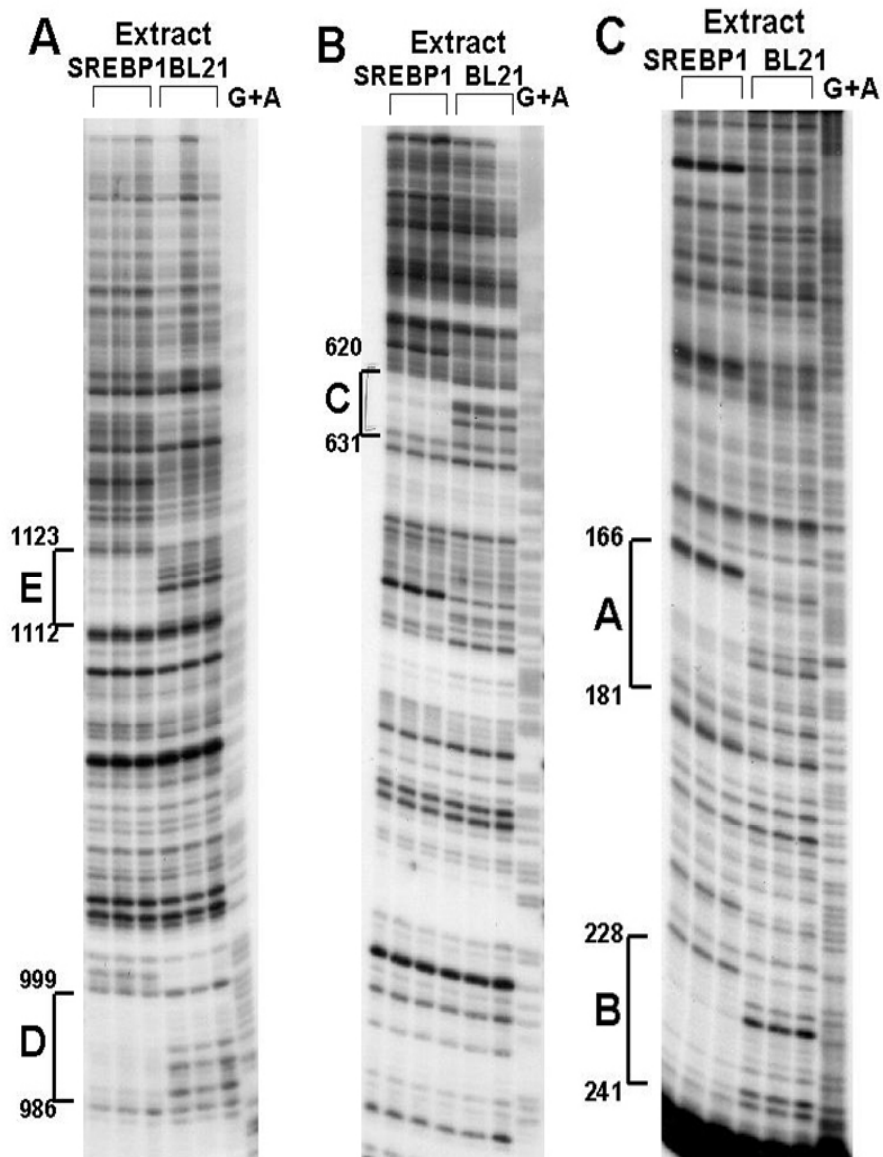
ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η περιοχή -204/+205 του κανονικού υποκινητή του γονιδίου ABCA1 (ανοδικά του εξονίου 1) η οποία περιλαμβάνει μία χαρακτηρισμένη θέση πρόσδεσης για SREBP (Εικόνα 78, κάτω σειρά) (101, 103).



Εικόνα 78: Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP-1 στρατολογήθηκε στην περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 παρουσία οξυστερολών και ρετινοειδών. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το αντίσωμα α-SREBP-1 ή χωρίς αντίσωμα (αρνητικό δείγμα, -ab) παρουσία ή απουσία 22-(R)-υδροξυστερόλης και 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (10^{-6} M) για 24 ώρες. Η χρωματίνη ελέγχθηκε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για την περιοχή -171/+92 (επάνω σειρά) του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 και για την περιοχή -204/+205 (κάτω σειρά) του κανονικού υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην εικόνα 7. IP, immunoprecipitation.

Ο SREBP-1 προσδένεται σε πολλαπλά σημεία και ενεργοποιεί τον υποκινητή του ιντρονίου 1 στο γονίδιο ABCA1

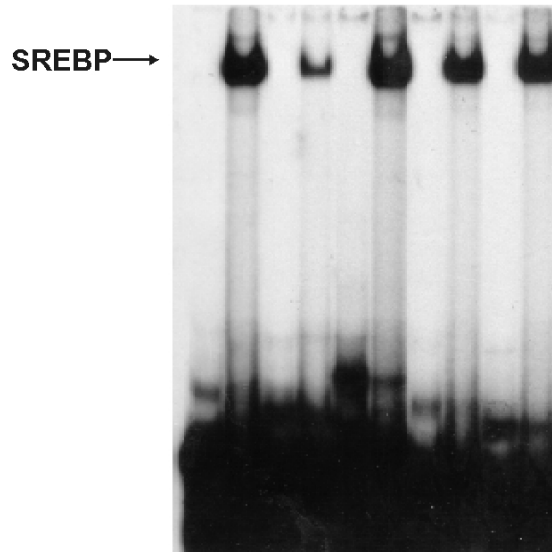
Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε σημεία πρόσδεσης για τον SREBP-1 στον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1, πραγματοποιήσαμε σε συνεργασία με τον Δρα. Hong-Yuan Kan του Πανεπιστημίου της Βοστώνης ανάλυση DNase I footprinting στην περιοχή -1500/+1 του ιντρονίου 1 χρησιμοποιώντας την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1a η οποία είχε εκφραστεί σε βακτήρια. Η ανάλυση αυτή ταυτοποίησε πέντε προστατευμένες περιοχές: -101/-76 (site A), -151/-132 (site B), -600/-572 (site C), -969/-956 (site D) και -1046/-1022 (site E) (Εικόνες 79, 81).



Εικόνα 79: Η παρουσία της πρωτεΐνης SREBP-1a ανέδειξε πέντε προστατευμένες περιοχές στην κοντινή περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Πραγματοποιήθηκε DNase I footprinting στην περιοχή -1500/+1 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 με την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1a (αα 1-460) η οποία είχε εκφραστεί σε βακτήρια. [με την άδεια του Δρα Hornq-Yuan Kan, Boston University Medical Center]

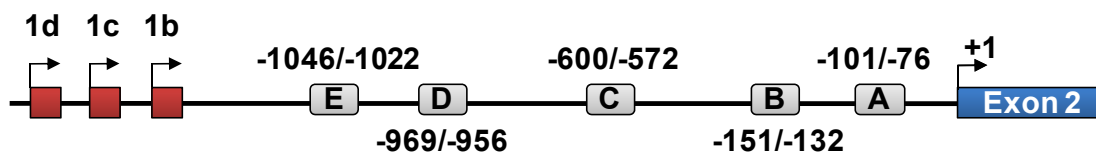
Η πρόσδεση του SREBP-1 σε αυτές τις θέσεις επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφορητική κινητικότητα συμπλόκου σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (EMSA, electrophoretic mobility shift assay) χρησιμοποιώντας σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις θέσεις A-E και την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1a η οποία είχε εκφραστεί σε βακτήρια (Εικόνα 80).

BL21 extract: + + + + +
 SREBP extract: + + + + +
 Probe: E E D D C C B B A A



Εικόνα 80: Οι «προστατευμένες» θέσεις A-E αποτελούν πραγματικές θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα SREBP-1. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ηλεκτροφορητική κινητικότητα συμπλόκου σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (EMSA, electrophoretic mobility shift assay) με τη χρήση σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στις θέσεις A-E και την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1a (αα 1-460) η οποία είχε εκφραστεί σε βακτήρια. [με την άδεια του Δρα Horng-Yuan Kan, Boston University Medical Center]

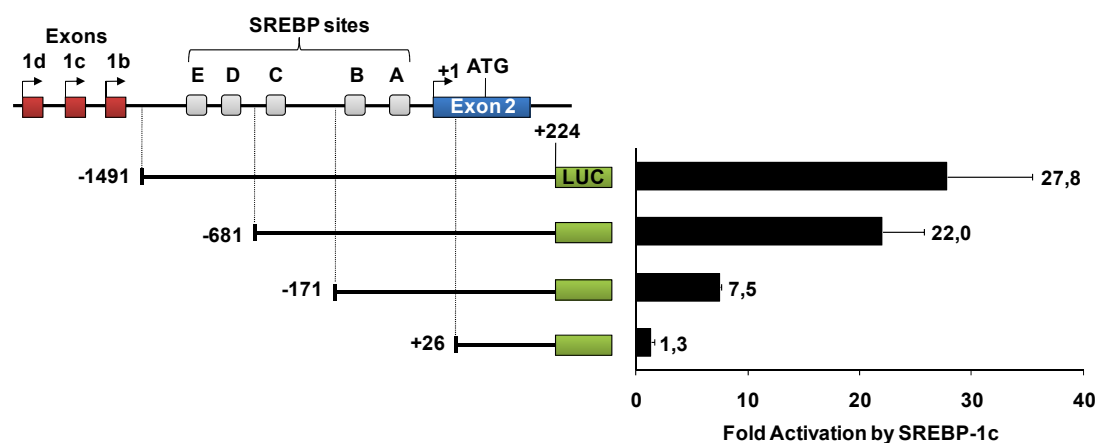
Από τα αποτελέσματα των εικόνων 79 και 80, προκύπτει ότι η κοντινή περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 περιλαμβάνει πέντε θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1, οι οποίες παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 81.



Εικόνα 81: Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1 ανοδικά του εξονίου 2 του γονιδίου ABCA1.

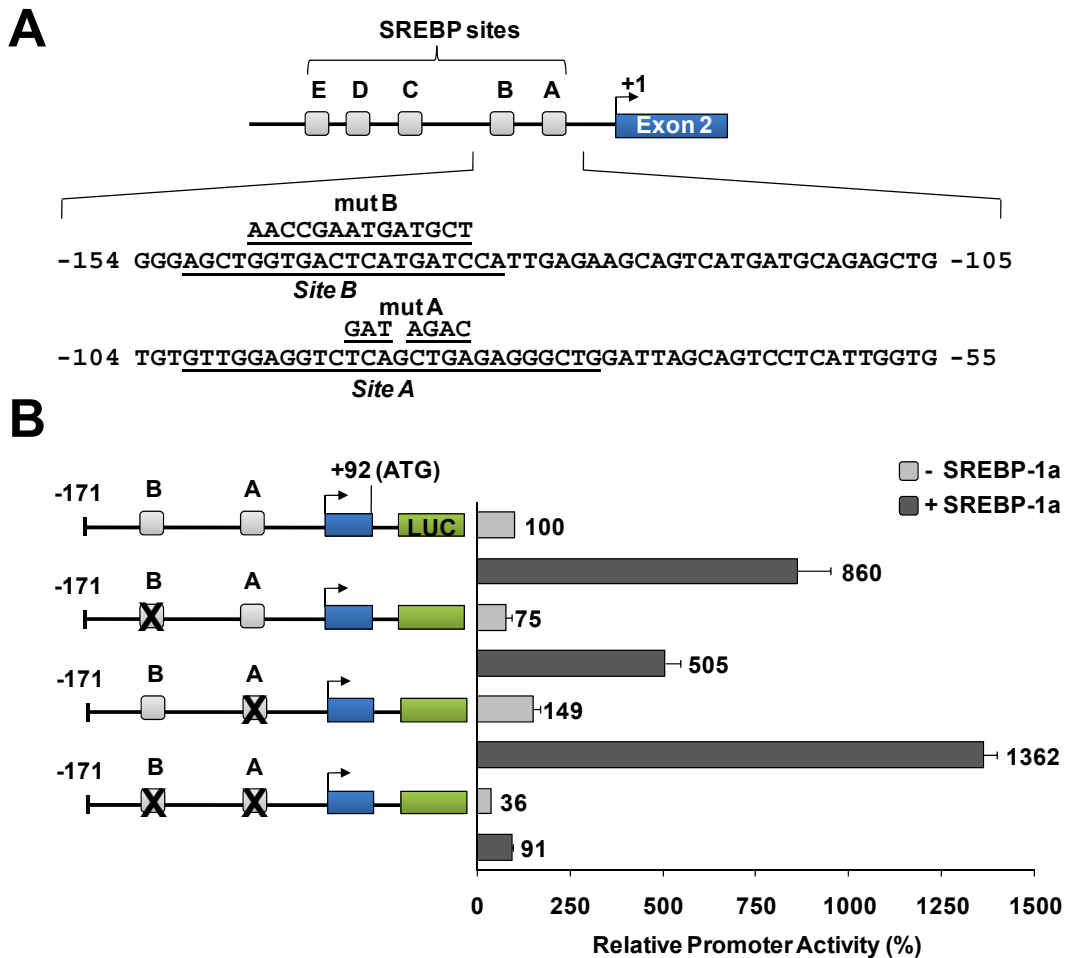
Προκειμένου να διερευνήσουμε αν ο SREBP-1 ενεργοποιεί τον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 που περιέχει αυτές τις θέσεις πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2. Βρήκαμε ότι η ώριμη μορφή του SREBP-1c ενεργοποίησε ισχυρά (28 φορές) το τμήμα του υποκινητή -1491/+224 του ιντρονίου 1 που περιέχει αυτές τις θέσεις (Εικόνα 82). Παρόμοια αποτελέσματα

προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε η ώριμη μορφή του SREBP-1a, ο οποίος περιέχει την ίδια περιοχή πρόσδεσης στο DNA με τον SREBP-1c [παράγονται από το ίδιο γονίδιο (347, 348)]. Κατόπιν, δείξαμε ότι η διαδοχική απαλοιφή των θέσεων E+D (-681/+224), C (-171/+224) και A+B (+26/+224) μείωσε σταδιακά την ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου 1 από τον SREBP-1c (22-, 7.5- και 1.3-φορές ενεργοποίηση, αντίστοιχα) (Εικόνα 82).



Εικόνα 82: Ο SREBP-1c ενεργοποίησε ισχυρά τον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια Int1(-1491/+224)-luc, Int1(-681/+224)-luc, Int1(-171/+224)-luc και Int1(+26/+224)-luc (1μg το καθένα) τα οποία περιέχουν διαδοχικές απαλοιφές των θέσεων πρόσδεσης για SREBP-1, μαζί με ένα φορέα έκφρασης για την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1c. Οι κανονικοποιημένες τιμές της επαγωγής από SREBP-1c εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Στη συνέχεια, εστιαστήκαμε στην κοντινή περιοχή -171/+92 του υποκινητή του ιντρονίου 1 η οποία περιέχει τις θέσεις A και B. Με μεταλλαξιγένεση εισάγαμε νουκλεοτιδικές αλλαγές στη θέση A, B ή και στις δύο (Εικόνα 83A) και εξετάσαμε το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλαγών στη μεσολαβούμενη από τον SREBP-1 ενεργοποίηση του υποκινητή του ιντρονίου στα κύτταρα HepG2. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η ανεξάρτητη μεταλλαξιγένεση της θέσης A ή B δεν επηρέασε την ενεργοποίηση του υποκινητή Int1(-171/+92) από τον SREBP-1 (8-10 φορές ενεργοποίηση). Αντίθετα, η ταυτόχρονη μεταλλαξιγένεση και των δύο θέσεων μείωσε δραστικά τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα από τον SREBP-1 επίπεδα μεταγραφής του υποκινητή υποδηλώνοντας ότι και οι δύο θέσεις είναι σημαντικές για αυτή τη μεταγραφή (Εικόνα 83B).

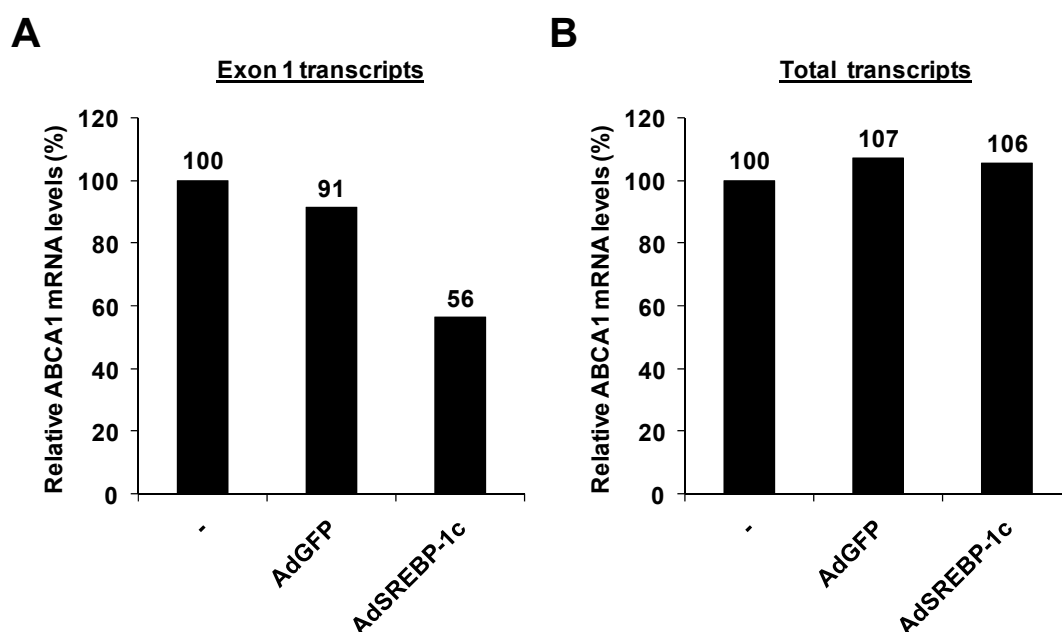


Εικόνα 83: Μεταλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης A και B του SREBP-1 οδήγησαν σε απώλεια της επαγωγής του υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 από τον SREBP-1a. (A) Παρουσίαση της αλληλουχίας της περιοχής -154/-55 που περιλαμβάνει τις κοντινές θέσεις A και B (υπογραμμισμένες), πάνω από τις οποίες σημειώνονται οι μεταλλαγές που εισήχθησαν. (B) Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο Int1(-171/+92)-luc που φέρει την αγρίου τύπου αλληλουχία ή με τα πλασμίδια που φέρουν τις μεταλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης του SREBP-1, A και B (στα αριστερά της εικόνας) μαζί με ένα φορέα έκφρασης για την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1a. Οι κανονικοποιημένες τιμές παρουσιάζονται ως ιστόγραμμα.

Διττός τρόπος ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τον SREBP-1

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης του SREBP-1 στη μεταγραφή του ενδογενούς γονιδίου ABCA1 στην κυτταρική σειρά HepG2. Για να επιτύχουμε το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε ένα ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εκφράζει την ώριμη, ενεργή μορφή του SREBP-1c (Ad-SREBP-1c) και έναν αδενοϊό ελέγχου που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Ad-GFP). Μολύναμε τα

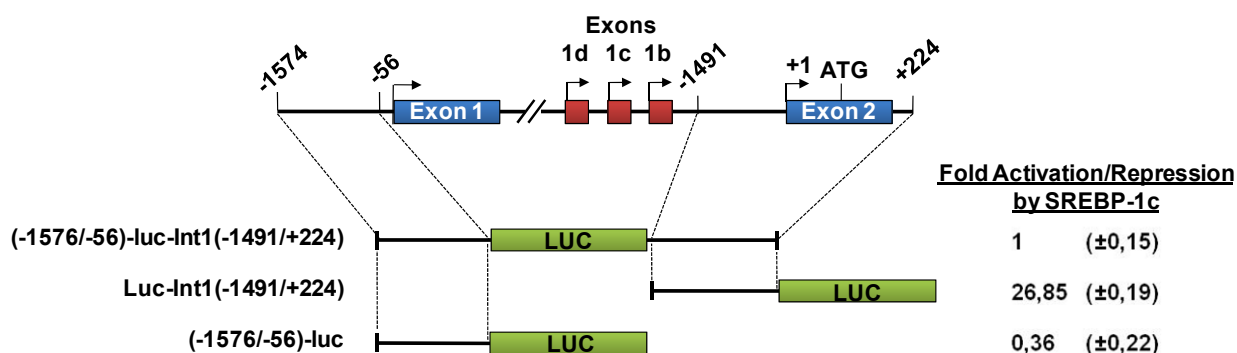
κύτταρα HepG2 με τους αδενοϊούς αυτούς και μετρήσαμε με RT-PCR τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου ABCA1 που ξεκινούν από το εξόνιο 1 χρησιμοποιώντας εκκινητές που αντιστοιχούν στα εξόνια 1 και 2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 84A, η υπερέκφραση του ώριμου SREBP-1c προκάλεσε σημαντική μείωση στη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 από το εξόνιο 1 (56% σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα) ενώ ο αδενοϊός ελέγχου είχε μια ελάχιστη επίδραση. Είναι ενδιαφέρον ότι όταν εξετάσαμε τα συνολικά επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 (μετάγραφα από όλα τα εξόνια), χρησιμοποιώντας εκκινητές που αντιστοιχούν στα εξόνια 8 και 9 του γονιδίου ABCA1, βρήκαμε ότι η υπερέκφραση του ώριμου SREBP-1c δεν είχε επίδραση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου (Εικόνα 84B).



Εικόνα 84: Ο διπλός ρόλος του SREBP-1 στη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1. (A) Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-GFP ή τον αδενοϊό Ad-SREBP-1c για 3 ώρες με MOI 50 (multiplicity of infection). Το RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα 24 ώρες μετά και υποβλήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) με εκκινητές που ανιχνεύουν τα μετάγραφα του γονιδίου ABCA1 που ξεκινούν από το εξόνιο 1. Για λόγους κανονικοποίησης ανιχνεύθηκαν επίσης τα επίπεδα mRNA του γονιδίου ελέγχου GAPDH. Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα. (B) Όμοια με το (A), αλλά χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ανιχνεύουν τα συνολικά μετάγραφα του γονιδίου ABCA1.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, υποθέσαμε ότι οι πρωτεΐνες SREBP ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 με ένα διπλό μηχανισμό: προσδένονται στο στοιχείο SRE (sterol regulatory element) στον κανονικό υποκινητή και καταστέλουν τη μεταγραφή που ξεκινά από το εξόνιο 1 ενώ την ίδια στιγμή

προσδένονται σε πολλαπλά SREs που βρίσκονται στον υποκινητή του ιντρονίου 1 και ενεργοποιούν τη μεταγραφή που ξεκινά από το εξόνιο 2. Σε κύτταρα όπου και οι δύο υποκινητές είναι λειτουργικοί, όπως τα κύτταρα HepG2, η μεσολαβούμενη από τον SREBP καταστολή της μεταγραφής από το εξόνιο 1 θα μπορούσε να αντισταθμιστεί από τη μεσολαβούμενη από τον SREBP ενεργοποίηση της μεταγραφής από το εξόνιο 2. Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την υπόθεση, κατασκευάσαμε ένα πλασμίδιο στο οποίο το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο τόσο του κανονικού (-1571/-56) όσο και του ιντρονικού [(Int1(-1491/+224))] υποκινητή και το χρησιμοποιήσαμε σε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 μαζί με έναν φορέα έκφρασης για την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1c. Όπως προβλέψαμε, ο SREBP-1c ενεργοποίησε ισχυρά τον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 κατά 27 φορές, κατέστειλε τον κανονικό υποκινητή κατά 64% αλλά δεν είχε καμία επίδραση στη μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης όταν και οι δύο υποκινητές του γονιδίου ήταν παρόντες (Εικόνα 85).



Εικόνα 85: Ο SREBP-1c δεν ενεργοποίησε τη μεταγραφή παρουσία και των δύο υποκινητών του γονιδίου ABCA1. Κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-1576/-56)-luc-Int1(-1491/+224), Luc-Int1(-1491/+224) και (-1576/-56)-luc (1μg το καθένα) τα οποία περιέχουν τους υποκινητές του γονιδίου ABCA1 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, μαζί με ένα φορέα έκφρασης για την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης SREBP-1c. Οι κανονικοποιημένες τιμές της επαγωγής από SREBP-1c εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Συζήτηση

Η περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1

Ο μεταφορέας χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων ABCA1 κατέχει κεντρικό ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από την περιφέρεια (μακροφάγα)

πίσω στο ήπαρ αλλά και στη βιογένεση της HDL, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό της HDL στο πλάσμα παράγεται από τη δράση του ABCA1 στο ήπαρ και το έντερο. Κατά συνέπεια η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 στους διάφορους ιστούς οφείλει να υπόκειται σε υψηλό βαθμό ρύθμισης ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κάθε κυτταρικού τύπου και με τα ερεθίσματα που λαμβάνονται. Πράγματι, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες μέχρι τώρα, η μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 καθορίζεται από τουλάχιστον δύο ρυθμιστικές περιοχές. Η πρώτη, και αρκετά μελετημένη, περιοχή βρίσκεται ανοδικά του πρώτου εξονίου. Σε αυτή την περιοχή, όπως έχει ήδη αναφερθεί στις προηγούμενες ενότητες και στην εισαγωγή, υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης για τα ετεροδιμερή των πυρηνικών υποδοχέων LXR/RXR, τον Sp1, τον ZNF202, τον SREBP-2 και τους USF1/2. Η πρόσδεση του ετεροδιμερούς LXR/RXR είναι καθοριστική για την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Η δεύτερη περιοχή ρύθμισης βρίσκεται στην περιοχή ανάμεσα στα εξόνια 1 και 2. Μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια (BAC) απέδειξαν τη λειτουργικότητα αυτής της περιοχής στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 στο ήπαρ και άλλους ιστούς, και τη συνειφορά της στα επίπεδα της HDL (114). Στην περιοχή του ιντρονίου 1 έχουν περιγραφεί εναλλακτικά σημεία έναρξης της μεταγραφής από τα οποία προκύπτουν μετάγραφα τα οποία ξεκινούν είτε από εξόνια μέσα στο ιντρόνιο 1 (1b, 1c, 1d) ή από το εξόνιο 2 (40, 114, 116, 117). Σε κάθε περίπτωση, η πρωτεΐνη που παράγεται είναι η ίδια καθώς το σημείο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στο εξόνιο 2. Ωστόσο, τα διάφορα μετάγραφα ρυθμίζονται ξεχωριστά και επάγονται σε διαφορετικούς ιστούς προσφέροντας ιστοειδική ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 (117). Φαίνεται επομένως ότι η ρυθμιστική περιοχή του ιντρονίου 1 αυξάνει την πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1. Τη μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής του ιντρονίου 1 επιβεβαιώσαμε και εμείς χρησιμοποιώντας την περιοχή των 8kb ανοδικά του εξονίου 2 στην ηπατική κυτταρική σειρά HepG2. Είναι ωστόσο ενδιαφέρον ότι η ενεργότητα της περιοχής αυτής οφείλεται κατά κύριο λόγο στην κοντινή περιοχή των 1500bp ανοδικά του εξονίου 2 και όχι στα ρυθμιστικά στοιχεία ανοδικά των εναλλακτικών σημείων έναρξης της μεταγραφής 1b, 1c, 1d (Εικόνα 70). Τη σημασία και τη λειτουργικότητα της περιοχής των 1500bp φανερώνει και η ενεργοποίησή της από το μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Ο Sp1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη βέλτιστη ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 ανοδικά του πρώτου εξονίου από οξυστερόλες και ρετινοειδή (319). Η πρόσδεση του Sp1 και στην κοντινή περιοχή του εξονίου 2 επιβεβαιώνει τη σημασία αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1.

Η δράση των οξυστερολών στη ρύθμιση της περιοχής του ιντρονίου

Η ενεργοποίηση από οξυστερόλες και ρετινοειδή είναι το κυριότερο μονοπάτι επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 και περιλαμβάνει την πρόσδεση των υποδοχέων LXR/RXR στη θέση LXRE ανοδικά του εξονίου 1. Πλήθος ρυθμιστικών στοιχείων περιβάλουν το LXRE όπου προσδένονται κυρίως παράγοντες με αρνητική δράση (ZNF202, SREBP-2, USF1/2) επιτρέποντας τη βέλτιστη ρύθμιση της απόκρισης. Εκτός από την περιοχή ανοδικά του πρώτου εξονίου οι οξυστερόλες και τα ρετινοειδή ενεργοποιούν και την περιοχή του ιντρονίου 1. Αν και οι πληροφορίες για τη ρύθμιση της περιοχής του ιντρονίου 1 από μεταγραφικούς παράγοντες είναι αρκετά περιορισμένες, για το ανθρώπινο γονίδιο έχουν περιγραφεί τρεις θέσεις πρόσδεσης για τα ετεροδιμερή LXR/RXR (-7656, -7174, -4686 ανοδικά του εξονίου 2) τα οποία ενεργοποιούν τη μεταγραφή παρουσία του συνδέτη του LXR, τη 22-υδροξυστερόλη (114). Στην περίπτωση όμως της κοντινής περιοχής των 1500bp ανοδικά του εξονίου 2 η ενεργοποίηση από οξυστερόλες και ρετινοειδή μέσω των LXR/RXR δεν είναι άμεση καθώς οι υποδοχείς δεν προσδένονται στην περιοχή *in vivo* (Εικόνα 76). Το ρόλο του μεσολαβητή στην ενεργοποίηση της κοντινής περιοχής του ιντρονίου 1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή αναλαμβάνει ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP-1c ο οποίος επάγεται μέσω του LXRE στο δικό του υποκινητή του.

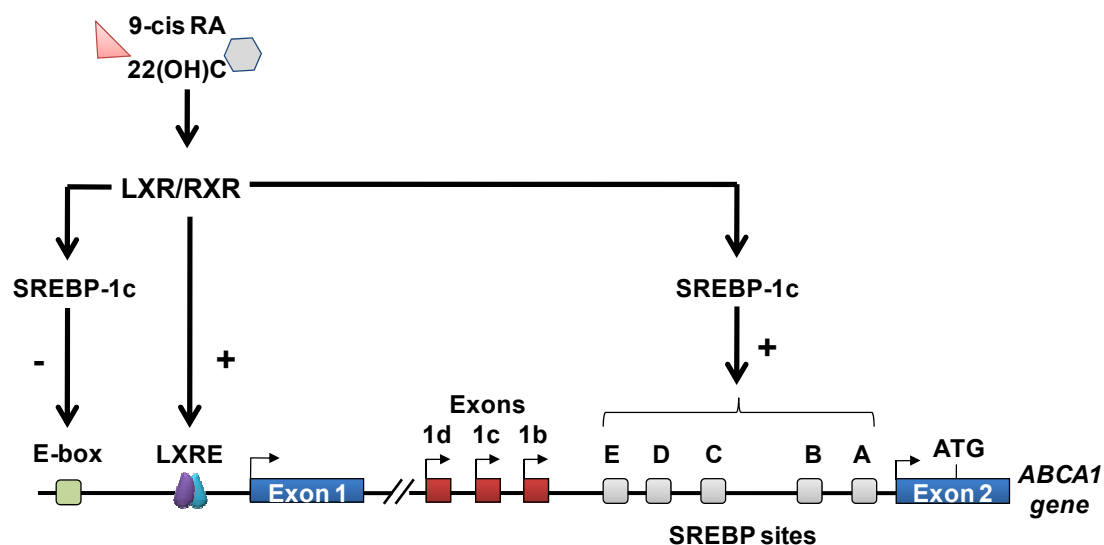
Ο διπτός ρόλος του SREBP-1c στη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1

Η δράση του SREBP-1c στον υποκινητή ανοδικά του εξονίου 1 του γονιδίου ABCA1 ανέστειλε τη μεταγραφή, πιθανότατα δρώντας μέσω του στοιχείου E-box, όπως έχει δειχθεί να συμβαίνει με το άλλο μέλος της οικογένειας, τον SREBP-2, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (101). Από την άλλη όμως, ο SREBP-1c ενεργοποίησε ισχυρά τη μεταγραφή του ABCA1 μέσω πολλαπλών στοιχείων πρόσδεσης στην κοντινή περιοχή ανοδικά του εξονίου 2. Το τελικό αποτέλεσμα των αντίθετων αυτών δράσεων ήταν τα συνολικά μετάγραφα του ABCA1 να παραμείνουν σταθερά. Σε παρόμοιες παρατηρήσεις καταλήγει και μια πρόσφατη μελέτη από τους Tamehiro et al. με τον SREBP-2 σε κύτταρα ήπατος αρουραίου (349). Στην περίπτωση αυτή οι συγγραφείς εξέτασαν τη δράση των στατινών (αναστολείς της παραγωγής χοληστερόλης) στους δύο υποκινητές του γονιδίου ABCA1. Ανοδικά του εξονίου 1, η δράση των στατινών μείωσε τη μεταγραφή πιθανότατα μειώνοντας η διαθεσιμότητα των ενδογενών συνδετών για τον υποδοχέα LXR. Αντίθετα, στην περιοχή του ιντρονίου 1 ο ενεργοποιημένος (πυρηνικός) SREBP-2 ενώθηκε σε στοιχεία SRE και

ενεργοποίησε τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1. Το τελικό αποτέλεσμα και σε αυτή την περίπτωση ήταν η εξισορρόπηση των δύο δράσεων.

Η κατασταλτική δράση του SREBP-1 στον υποκινητή ανοδικά του πρώτου εξονίου μπορεί να λειτουργεί ως αντιστάθμιση προκειμένου να εμποδίσει την υπερενεργοποίηση μέσω των οξυστερολών. Αντίθετα, η δράση του SREBP-1c στο ιντρόνιο 1 πιθανότατα εξασφαλίζει τη συνεχή έκφραση του ABCA1 αλλά και την επαγόμενη από οξυστερόλες. Σε ιστούς όπως το ήπαρ όπου χρησιμοποιούνται και οι δύο ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου ABCA1, παρουσία οξυστερολών οι αντίθετες δράσεις του SREBP, επιτρέπουν τελικά την ενεργοποίηση από τους LXR/RXR μέσω του στοιχείου LXRE στον υποκινητή ανοδικά του εξονίου 1 (Εικόνα 86).

Μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα, σύμφωνα με τους Hegarty et al., είναι ότι ο παράγοντας SREBP-1c ενεργοποιείται πλήρως παρουσία οξυστερολών μόνο παρουσία ινσουλίνης (246). Το ενδεχόμενο αυτό προσφέρει ακόμη ένα επίπεδο πολυπλοκότητας στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 συνδέοντας το μεταβολισμό της χοληστερόλης με αυτόν της γλυκόζης.



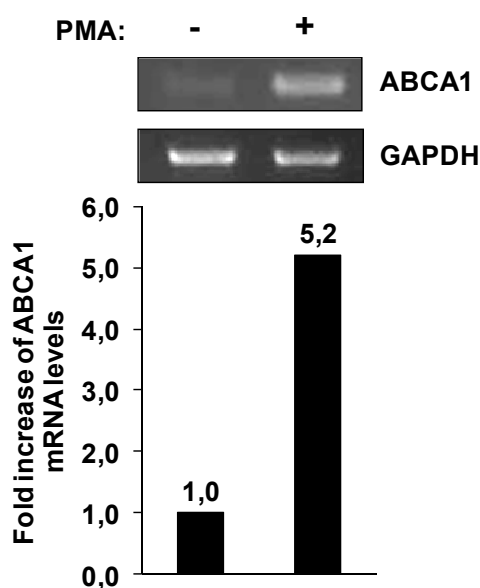
Εικόνα 86: Ο διπλός ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1c στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1. Οι πυρηνικοί υποδοχείς LXR/RXR ενεργοποιούνται από τους συνδέτες τους (οξυστερόλες και ρετινοειδή, αντίστοιχα) προκειμένου να επάγουν την έκφραση των γονιδίων SREBP-1c και ABCA1, μέσω των στοιχείων LXRE στους υποκινητές τους. Επιπλέον, ο SREBP-1c μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 δρώντας στο E-box του υποκινητή του ABCA1 ανοδικά του πρώτου εξονίου ή να επάγει τη μεταγραφή δρώντας μέσω των SREs στην περιοχή του πρώτου ιντρονίου.

B. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα JUNB στην επαγωγή του ανθρώπινου γονιδίου ABCA1

Αποτελέσματα

Η έκφραση του γονιδίου ABCA1 επάγεται κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων THP-1 σε μακροφάγα

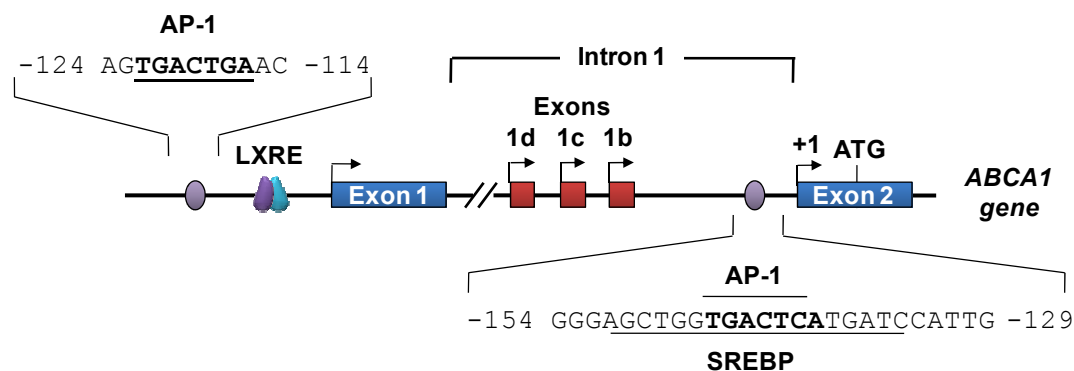
Είναι γνωστό ότι η έκφραση του γονιδίου ABCA1 επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκύτταρων THP-1 σε μακροφάγα με την επίδραση εστέρων φορβόλης (PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate) (115). Την παρατήρηση αυτή επιβεβαιώσαμε και εμείς, χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά THP-1 και επιδρώντας με PMA για 72 ώρες. Πράγματι παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα mRNA του ABCA1 αυξήθηκαν τουλάχιστον κατά 5 φορές στα διαφοροποιημένα κύτταρα σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα (εικόνα 87).



Εικόνα 87: Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 κατά τη διαφοροποίηση των μονοκύτταρων THP-1. Κύτταρα THP-1 επώαστηκαν για 72 ώρες παρουσία ή απουσία 200ng/ml PMA. Το RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα και υποβλήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Στο επάνω μέρος φαίνονται τα επίπεδα mRNA του ABCA1 και του GAPDH που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση. Οι κανονικοποιημένες τιμές φαίνονται στο κάτω μέρος ως ιστόγραμμα.

Τα μέλη της οικογένειας AP1 (c-JUN, JUND και JUNB) επάγονται από το PMA και προδένονται στη θέση 5'-TGA(G/C)TCA-3' ως διμερή ή ετερομερή. Επομένως, διερευνήσαμε την αλληλουχία του γονιδίου ABCA1 για την ύπαρξη πιθανών θέσεων πρόσδεσης των πρωτεϊνών αυτών, με το πρόγραμμα AliBaba 2.1 (www.gene-regulation.com). Όπως φαίνεται στην εικόνα 88, από τη διερεύνηση προέκυψαν δύο πιθανές περιοχές πρόσδεσης AP1, μία στην περιοχή ανοδικά του

πρώτου εξονίου στη θέση -122/-116 (5'-TGACTGA-3') και μία στη θέση -145/-139 ανοδικά του δεύτερου εξονίου μέσα στο πρώτο ιντρόνιο (5'-TGACTCA-3'). Πρέπει να σημειωθεί ότι η θέση AP1 του ιντρονίου συμφωνεί απόλυτα με την ομόφωνη αλληλουχία 5'-TGA(G/C)TCA-3' και συμπίπτει με μία από τις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1 (θέση A).

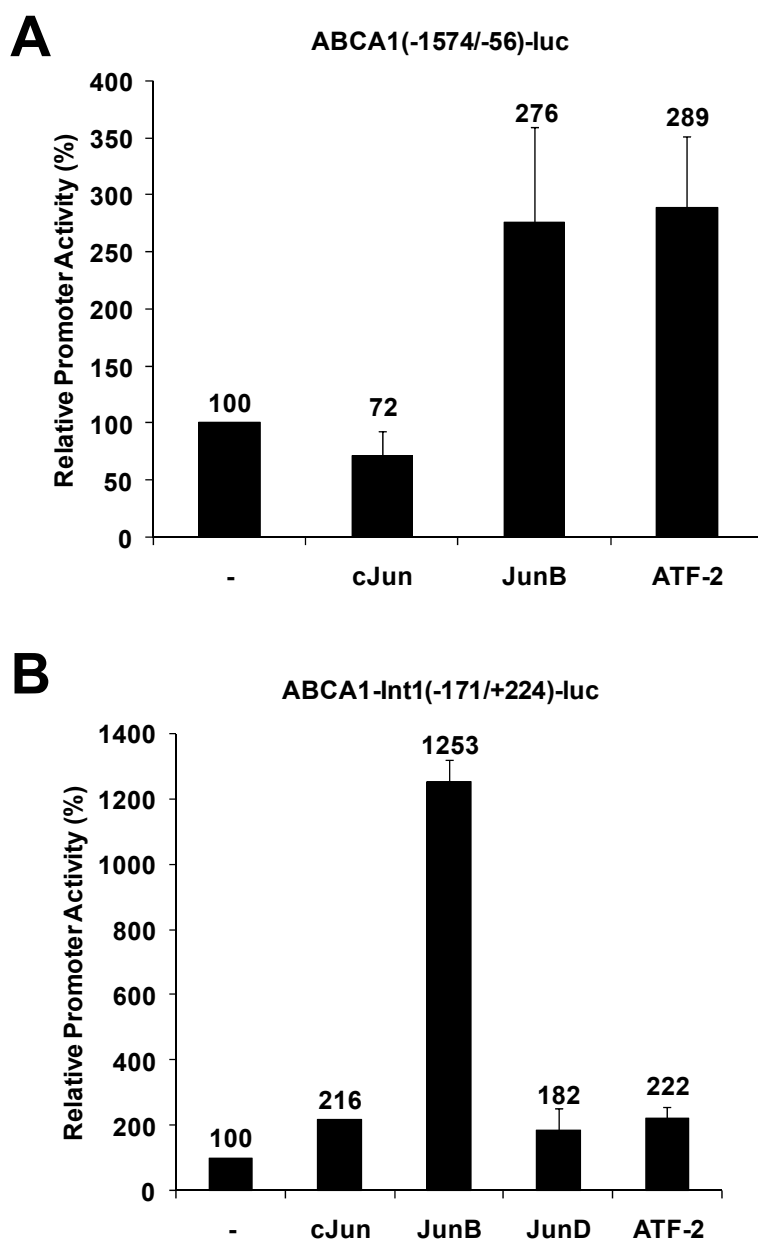


Εικόνα 88: Οι ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου ABCA1 περιέχουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης AP1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου ABCA1, όπου φαίνονται τα δύο πρώτα εξόνια ανοδικά των οποίων βρίσκονται ρυθμιστικές περιοχές της έκφρασης του γονιδίου. Από την ανάλυση των περιοχών αυτών με το πρόγραμμα AliBaba 2.1 προέκυψαν δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης παραγόντων AP-1 (υπογραμμισμένες), μπροστά από το εξόνιο 1 και το εξόνιο 2. Στο σχήμα παρουσιάζεται και η θέση πρόσδεσης για τον παράγοντα SREBP-1 η οποία συμπίπτει με τη θέση AP1.

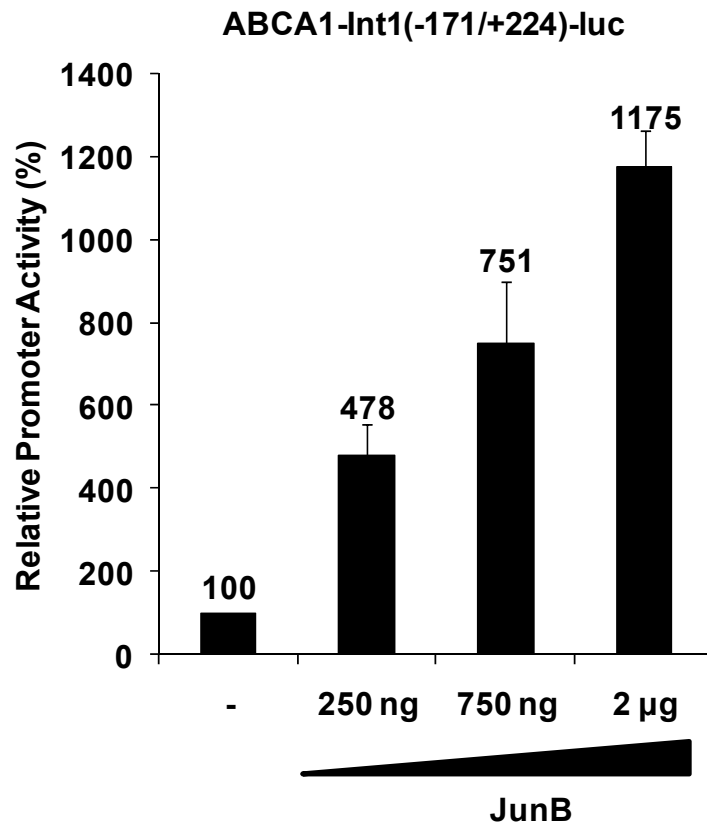
Ο μεταγραφικός παράγοντας JUNB ενεργοποιεί τον υποκινητή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1

Προκειμένου να εξακριβώσουμε τη λειτουργικότητα των πιθανών θέσεων AP1 πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 με τα πλασμίδια (-1574/-56)ABCA1-luc και Int1(-171/+224)ABCA1-luc, που φέρουν τμήμα του υποκινητή ανοδικά του πρώτου και του δεύτερου εξονίου, αντίστοιχα, και με φορείς έκφρασης για τα μέλη της οικογένειας AP1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 89A, η περιοχή ανοδικά του πρώτου εξονίου (-1574/-56) ενεργοποιήθηκε σε μικρό βαθμό από τα JUNB και ATF-2, ενώ δε σημειώθηκε ενεργοποίηση από τον cJUN. Αντίθετα, η κοντινή περιοχή του δεύτερου εξονίου ενεργοποιήθηκε πολύ ισχυρά από τον JUNB, όχι όμως και από τους cJUN, JUND και ATF-2 (εικόνα 89B). Επίσης, παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης JUNB οδήγησαν σε δόσοεξαρτώμενη αύξηση της ενεργότητας της περιοχή του ιντρονίου -171/+224 (εικόνα 90), συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της εικόνας 89B. Τα αποτελέσματα

των εικόνων 89B και 90 επιβεβαιώνουν τη λειτουργικότητα της θέσης AP1 στην περιοχή -145/-139 του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1.

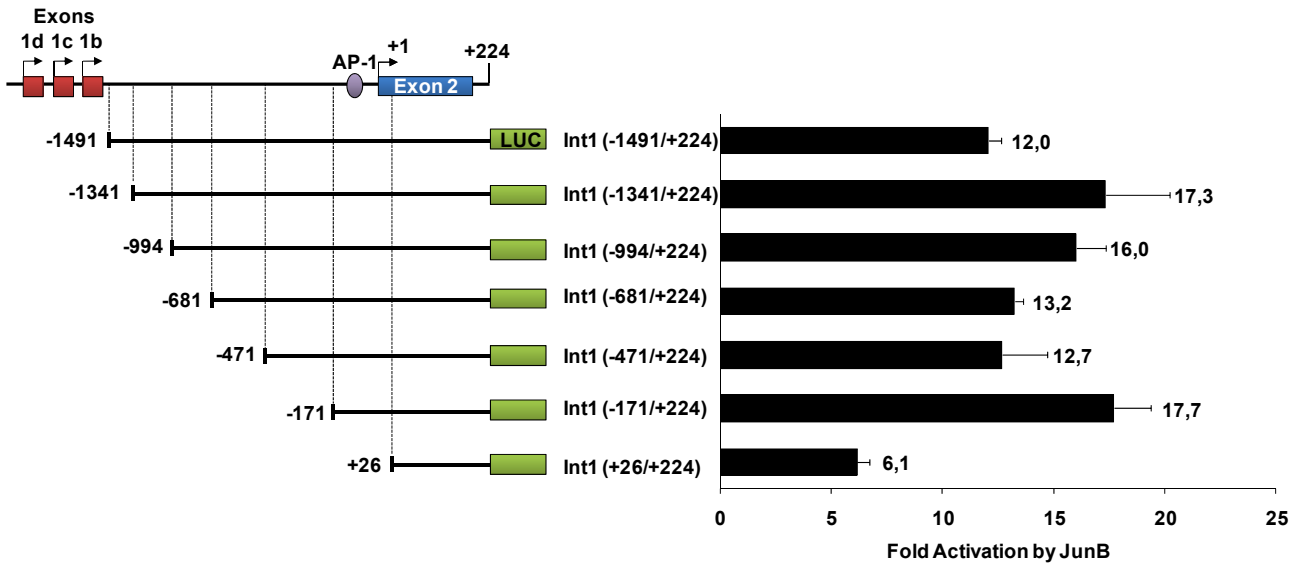
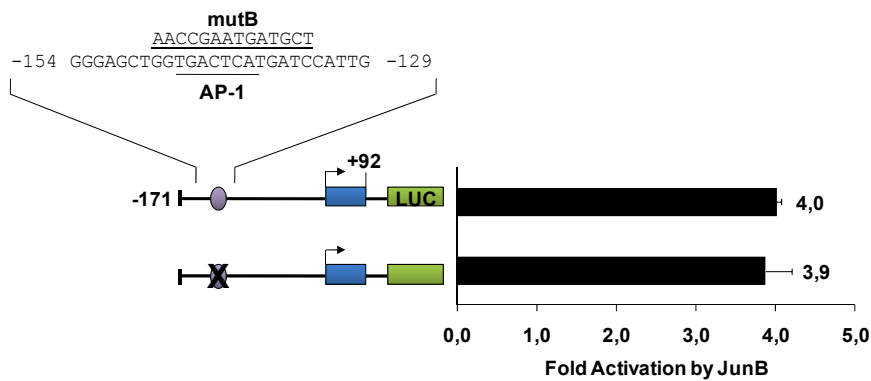


Εικόνα 89: Η περιοχή του ιντρονίου 1 του γονιδίου ABCA1 ενεργοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα JUNB. (A) Τα κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο (-1574/-56)ABCA1-luc (1,25μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τους παράγοντες cJUN, JUNB και ATF-2 (1μg το καθένα). (B) Τα κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο Int1(-171/+224)ABCA1-luc (1,25μg) μαζί με φορείς έκφρασης για τους παράγοντες cJUN, JUNB, JUNB, JUND και ATF-2 (1μg το καθένα). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.



Εικόνα 90: Ο μεταγραφικός παράγοντας JUNB αυξάνει την ενεργότητα του ιντρονίου του γονιδίου ABCA1 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τα κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο Int1(-171/+224)ABCA1-luc (1,25µg) μαζί με φορέα έκφρασης για τον JUNB σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,25-2µg). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Κατόπιν, θελήσαμε να διερευνήσουμε την ύπαρξη άλλων πιθανών στοιχείων απόκρισης στον παράγοντα JUNB και πραγματοποιήσαμε παροδικές διαμολύνσεις με μια σειρά απαλοιφών μιας περιοχής 1500bp ανοδικά του εξονίου 2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 91A, η ενεργοποίηση από JUNB παρέμεινε σταθερή (περίπου 12 φορές) μέχρι και την περιοχή -171, η οποία περιλαμβάνει τη θέση AP-1 (-145/-139). Παρατηρήσαμε ότι η ενεργοποίηση από τον JUNB μειώθηκε σημαντικά (περίπου στο μισό) όταν αφαιρέθηκε η περιοχή -171/+25, αλλά παρέμεινε ένας σημαντικός βαθμός ενεργοποίησης που υποδηλώνει την παρουσία και άλλων θέσεων AP-1 στην περιοχή +26/+224. Την τελευταία παρατήρηση επιβεβαιώνει και ότι η μεταλλαγή της θέσης AP-1 (-145/-139) δεν οδήγησε σε απώλεια της ενεργοποίησης από τον παράγοντα JUNB, όπως φαίνεται στην εικόνα 91B.

A**B**

Εικόνα 91: Ο παράγοντας JUNB ενεργοποιεί το γονίδιο ABCA1 μέσω της περιοχής του ιντρονίου 1. (A) Απαλοιφές της κοντινής περιοχής (~1500bp) ανοδικά του εξονίου 2 χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων HepG2 (1μg το καθένα) απουσία ή παρουσία ενός φορέα έκφρασης για τον παράγοντα JUNB (1μg). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως σχετική αύξηση από τον JUNB (σε σχέση με το δείγμα απουσία του JUNB). (B) Τα κύτταρα HepG2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια Int1(-171/+92)-luc και Int1(-171/+92)mutB-luc τα οποία φέρουν την αγρίου τύπου ή τη μεταλλαγμένη θέση AP1(-145/-139) (1μg το καθένα), αντίστοιχα, μαζί με ένα φορέα έκφρασης για τον παράγοντα JUNB (1μg). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως σχετική αύξηση από τον JUNB (σε σχέση με το δείγμα απουσία του JUNB).

Συζήτηση

Η διαδικασία εκροής της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων για τη βιογένεση της HDL είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία η οποία γίνεται με τη μεσολάβηση του μεταφορέα ABCA1. Απουσία του ABCA1 η απολιποπρωτεΐνη A-I καταβολίζεται ταχύτατα και τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα είναι σχεδόν ανύπαρκτα. Στα μακροφάγα η έκφραση του ABCA1 είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτρέπει το μετασχηματισμό τους σε αφρώδη κύτταρα, ένα από τα πρώιμα σημάδια αθηροσκλήρωσης.

Στην ανθρώπινη αδιαφοροποίητη μονοκυτταρική σειρά THP-1 λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση με την apoA-I αλλά η HDL που παράγεται περιέχει μόνο φωσφολιπίδια και όχι χοληστερόλη. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα αυτά υποστούν διαφοροποίηση με PMA αρχίζουν να εμφανίζουν γνωστές λειτουργίες των μακροφάγων και η HDL που παράγεται είναι πλούσια σε χοληστερόλη. Κατά τη διαφοροποίηση σημειώνεται εντυπωσιακή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την παραγωγή της πλούσιας σε χοληστερόλη HDL.

Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της δράσης σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από το PMA και στοχεύουν στη μεταγραφική ρύθμιση του ABCA1. Τα μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων JUN ενεργοποιούνται από τη δράση του PMA και προσδένονται ως διμερή σε θέσεις AP-1 με την ομόφωνη ακολουθία 5'-TGA(G/C)TCA-3'. Το γονίδιο ABCA1 διαθέτει θέσεις πρόσδεσης AP-1 και στις δύο ρυθμιστικές περιοχές (ανοδικά του πρώτου εξονίου και μέσα στο ιντρόνιο 1). Από τα μέλη της οικογένειας JUN μόνο η πρωτεΐνη JUNB οδήγησε σε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου ABCA1, δρώντας στην περιοχή του ιντρονίου. Η μεταγραφή του γονιδίου JUNB έχει δειχθεί ότι επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων THP-1 υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να εμπλέκεται και στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1. Επίσης, η περιοχή του ιντρονίου του γονιδίου ABCA1 έχει δειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στα μακροφάγα μεσολαβώντας στην επαγωγή του γονιδίου κατά τη χορήγηση δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά (114, 117). Επιπρόσθετα, η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 στην κυτταρική σειρά ηπατοβλαστώματος HepG2 από το μεταγραφικό παράγοντα JUNB υποδηλώνει ότι η περιοχή του ιντρονίου μπορεί να εξυπηρετεί τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που δρουν μέσω των θέσεων AP-1 και σε άλλους κυτταρικούς τύπους στους οποίους η περιοχή του ιντρονίου είναι ενεργή.

Μέρος IV

Λειτουργική Μεταλλαγή στο Γονίδιο ABCG1 του Ανθρώπου Ευθύνεται για Ισχαιμικά Επεισόδια

Σε συνεργασία με τους:

Jesper Schou¹, Ruth Frikke-Schmidt MD PhD¹, Børge G. Nordestgaard MD DMSc^{2,3,5}, Gorm Jensen MD DMSc³, Peer Grande MD DMSc⁴, Anne Tybjaerg-Hansen MD DMSc^{1,3,5}.

¹Department of Clinical Biochemistry and ⁴Department of Cardiology, Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital; ²Department of Clinical Biochemistry, Herlev University Hospital; ³The Copenhagen City Heart Study, Bispebjerg University Hospital; ⁵Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

Αποτελέσματα

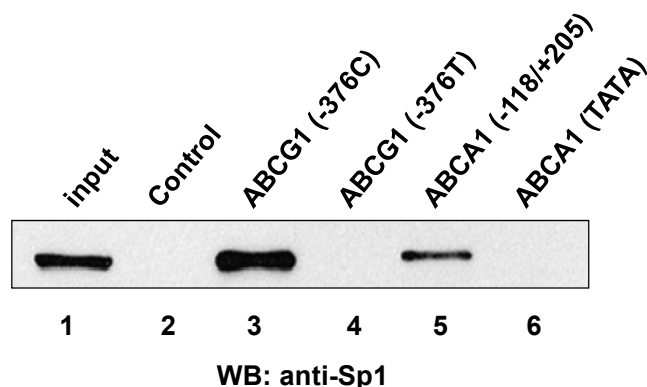
Ο μεταφορέας ABCG1 προάγει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα προς τα ώριμα σωματίδια της HDL (350). Τα ποντίκια με απαλοιφή του *Abcg1* και σε αθηρογενετική δίαιτα παρουσιάζουν αυξημένη αθηροσκλήρωση, αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων στους πνεύμονες, και αλλοιωμένη σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια (351, 352), αλλά χωρίς αλλαγές στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης του πλάσματος ή άλλα λιπίδια και λιποπρωτεΐνες. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν μεταλλαγές στο γονίδιο ABCG1 επηρεάζουν τον κίνδυνο για ισχαιμικό επεισόδιο και ασθένεια των πνευμόνων στους ανθρώπους.

Προκειμένου να αναγνωριστεί ένας φαινότυπος της έλλειψης ABCG1 στους ανθρώπους πραγματοποιήθηκε ανάλυση του γενοτύπου αρχικά σε 380 άτομα του γενικού πληθυσμού, στα οποία βρέθηκε μία νέα μεταλλαγή -376C>T, η οποία χαρτογραφείται σε μία πιθανή θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (118, 353). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη ανάλυση σε 10.313 άτομα που περιλαμβάνονταν στη Μελέτη της πόλης της Κοπεγχάγης (CCHS, Copenhagen City Heart Study). Στη CCHS, το 0,5% των ατόμων βρέθηκε να είναι ετερόζυγο για τη μεταλλαγή -376C>T στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1.

Η μεταλλαγή -376C>T δεν είχε κάποια επίδραση στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης του πλάσματος ή άλλα λιπίδια και λιποπρωτεΐνες. Ωστόσο, η συχνότητα των ισχαιμικών επεισοδίων και του εμφράγματος του μυοκαρδίου ως συνέπεια του γήρατος ήταν αυξημένη στους ετερόζυγους -376C>T σε σύγκριση με όσους δεν ήταν φορείς.

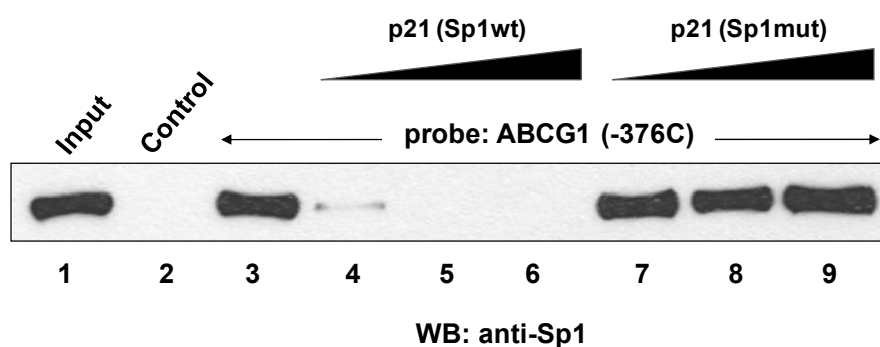
Ο υποκινητής του γονιδίου ABCG1 περιλαμβάνει τρεις πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα Sp1 στις θέσεις -566/-557, -382/-374 (GCCCAGGGCCCC, η θέση -376 είναι υπογραμμισμένη) και -183/-175, αντίστοιχα (118). Προκειμένου να καθορίσουμε αν η μεταλλαγή -376C>T είναι λειτουργική και κατά συνέπεια αν ευθύνεται για τα κλινικά ευρήματα στους ανθρώπους, πραγματοποιήσαμε *in vitro* και *in vivo* κυτταρικές μελέτες. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affinity precipitation-Υλικά και Μέθοδοι σελ.90) για να επιβεβαιώσουμε ότι η μεταλλαγή -376C>T βρίσκεται μέσα σε μια λειτουργική θέση πρόσδεσης Sp1. Ο παράγοντας Sp1 προσδέθηκε με υψηλή συγγένεια σε ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή -391/-361 του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 και έφερε το αλληλίο C (-376C) (Εικόνα 92, τρίτη θέση). Αντίθετα, ο Sp1 δεν μπόρεσε να προσδεθεί σε ένα όμοιο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει το

αλληλίο T στη θέση -376 (-376T, Εικόνα 92, τέταρτη θέση). Ως θετικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή -118/+205 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 και το οποίο περιλαμβάνει μια λειτουργική θέση πρόσδεσης Sp1 (319) (Εικόνα 92, πέμπτη θέση). Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή που βρίσκεται το στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου ABCA1(Εικόνα 92, έκτη θέση).



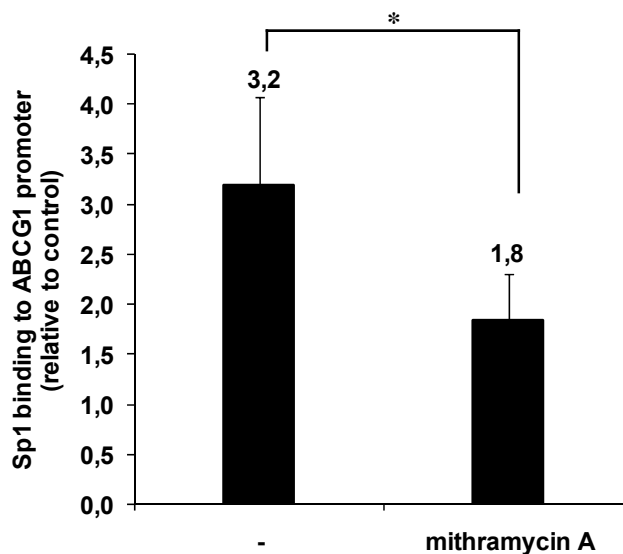
Εικόνα 92: Ο Sp1 προσδένεται στο -376C αλληλίο του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 αλλά όχι στο -376T. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για τον παράγοντα Sp1 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στην περιοχή -391/-361 του υποκινητή του ABCG1 [αλληλίο -376C (θέση 3) ή αλληλίο -376T (θέση 4)]. Βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές -118/+205 και -31/-9 του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό και αρνητικό δείγμα ελέγχου, αντίστοιχα (θέσεις 5 και 6). Η πρωτεΐνη Sp1 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-Sp1. DNAP, DNA affinity precipitation-control, σφαιρίδια στρεπταβιδίνης χωρίς βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο.

Με πειράματα DNAP ανταγωνισμού της πρόσδεσης επιβεβαιώσαμε ότι ο Sp1 προσδένεται στην περιοχή -391/-361 του υποκινητή του γονιδίου ABCG1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 93, η πρόσδεση του Sp1 στο ολιγονουκλεοτίδιο -391/-361 (-376C) του γονιδίου ABCG1 ανταγωνίστηκε από αυξανόμενες ποσότητες ενός ολιγονουκλεοτιδίου που αντιστοιχεί στην περιοχή -63/-45 του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου [p21(Sp1wt)] η οποία φέρει μια καλά χαρακτηρισμένη θέση πρόσδεσης Sp1 (354) (θέσεις 4-6). Αντίθετα, η μεταλλαγμένη περιοχή -63/-45 του γονιδίου p21 [p21(Sp1mut)] δεν ήταν ικανή να μειώσει την πρόσδεση του Sp1 στο ολιγονουκλεοτίδιο -391/-361 του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 (Εικόνα 93, θέσεις 7-9).



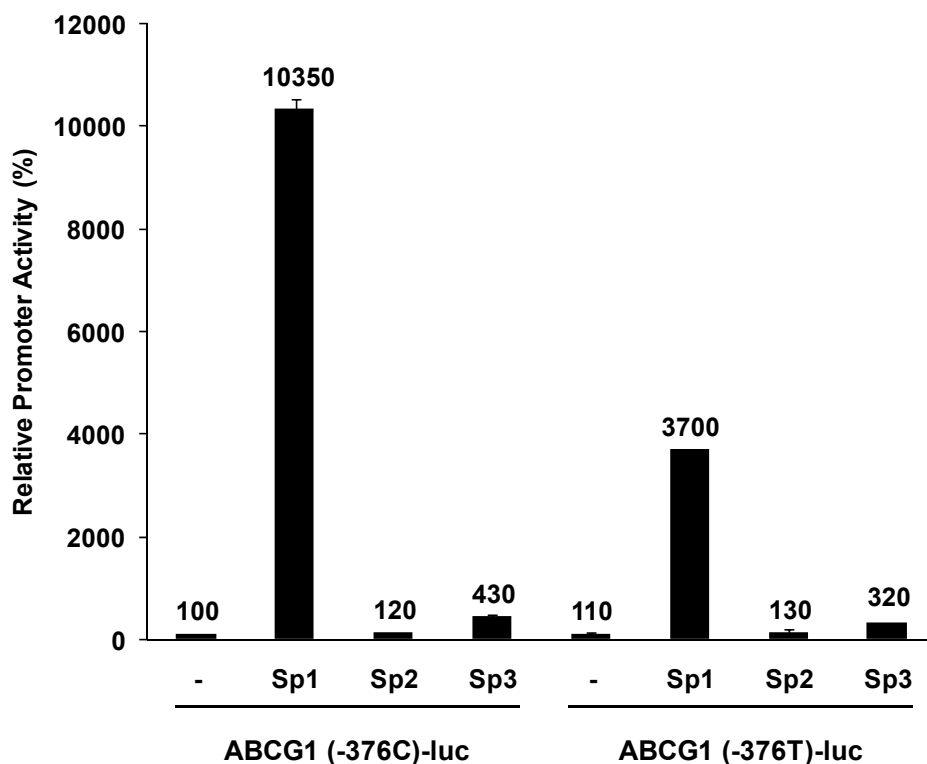
Εικόνα 93: Η πρόσδεση του Sp1 στο -376C αλληλίο του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 είναι ειδική. Εκχύλισμα από κύτταρα HEK293T που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης για Sp1 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση DNAP, με το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή -391/-361 του υποκινητή του ABCG1 [αλληλίο -376C (θέσεις 3-9)]. Η πρόσδεση στον υποκινητή του ABCG1 ανταγωνίστηκε από αυξανόμενες συγκεντρώσεις από μη βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στην αργίου τύπου p21(Sp1wt) ή τη μεταλλαγμένη p21(Sp1mut) περιοχή -63/-45 του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου. Η πρωτεΐνη Sp1 που προσδέθηκε στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύθηκε με Western blotting χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-Sp1. DNAP, DNA affinity precipitation· control, σφαιρίδια στρεπταβιδίνης χωρίς βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο

Στη συνέχεια αποδείξαμε την πρόσδεση του ενδογενούς Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 του ανθρώπου *in vivo* πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στα κύτταρα HEK293T. Όπως φαίνεται στην εικόνα 94, ο Sp1 βρέθηκε να είναι συνεχώς προσδεμένος με το τμήμα της χρωματίνης που αντιστοιχεί στην κοντινή περιοχή (-487/-144) του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 (3,2-φορές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου-χωρίς αντίσωμα), ενώ η πρόσδεση μειώθηκε κατά 44% παρουσία της μιθραμυκίνης A, η οποία είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος αναστολέας της πρόσδεσης του Sp1 (355).



Εικόνα 94: Η μιθραμυκίνη A εμπόδισε την πρόσδεση του Sp1 στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του ABCG1. Κύτταρα HEK293T επώαστηκαν παρουσία ή απουσία μιθραμυκίνης A (0,2μM) και υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα για Sp1 ή χωρίς αντίσωμα (δείγμα ελέγχου). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας εκκινήτες για την κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 (-487/-144). Η αύξηση της πρόσδεσης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου παρουσιάζεται ως ιστόγραμμα. *, $p < 0,05$.

Επίσης, παροδικές διαμολύνσεις στα κύτταρα S2 της Δροσόφιλας από τα οποία απουσιάζει ενδογενής Sp1 ή αντίστοιχη δραστικότητα (356), έδειξαν ότι η περιοχή -1080/+14 του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 που φέρει το αλληλίο -376C ενεργοποιήθηκε ισχυρά από τον Sp1 (103,5 φορές), και ότι η μεταλλαγή -376C>T μείωσε τη μεσολαβούμενη από τον Sp1 ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 κατά 64% (Εικόνα 95). Αντίθετα, οι παράγοντες Sp2 και Sp3 δεν ενεργοποίησαν τη μεταγραφή του υποκινητή του γονιδίου ABCG1 σε σημαντικά επίπεδα (Εικόνα 95).



Εικόνα 95: Το αλληλίο -376T στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 παρουσίασε μειωμένη επαγωγή από τον παράγοντα Sp1. Κύτταρα Schneider's S2 υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια (-1080/+14)-ABCG1-luc (-376C ή -376T) (1μg το καθένα) μαζί με φορείς έκφρασης για τους Sp1, Sp2 και Sp3 (5ng ο καθένας). Οι κανονικοποιημένες τιμές εμφανίζονται ως ιστόγραμμα.

Συζήτηση

Ο μεταφορέας ABCG1 παίζει σημαντικό ρόλο στη μεσολάβηση της εκροής χοληστερόλης σε ώριμα σωματίδια HDL αποτρέποντας έτσι τη συσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα, και κατά συνέπεια θεωρείται ότι προστατεύει ενάντια στην αθηροσκλήρωση (42, 124). Πρόσφατα, τρεις ομάδες ανέφεραν μελέτες μεταμόσχευσης μυελού των οστών από ποντίκια με έλλειψη *Abcg1* (*Abcg1*^{-/-}) σε αποδέκτες με έλλειψη του υποδοχέα της LDL (*Ldl*^{-/-}) με αντικρούομενα αποτελέσματα όσον αφορά στο σχηματισμό αθηροματικών πλακών (357-359). Αυτή η ασυμφωνία στα αποτελέσματα θεωρήθηκε ότι οφείλονταν σε διαφορές στην περιεκτικότητα της δίαιτας (360). Προκειμένου να βρεθεί μια ικανοποιητική εξήγηση για τα φαινομενικά διαφορετικά αποτελέσματα της έλλειψης του *Abcg1* στο σχηματισμό αθηροματικών πλακών, οι Out et al. πραγματοποίησαν μια επιπλέον

μελέτη της συνολικής έλλειψης του *Abcg1* στον ποντικό σε γενετικό υπόβαθρο C57Bl/6 (αγρίου τύπου) χωρίς την έλλειψη του υποδοχέα *Ldlr* και της *apoE* (351). Σε αυτά τα πειραματόζωα ποντίκια χορηγήθηκε αθηρογενετική διαίτα (15% λίπος, 1% χοληστερόλη και 0,5% χολικό οξύ), και τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό έφτασαν μόνο τα 210 ως 220 mg/dL στις 12 εβδομάδες που αντιστοιχούν σε μέτρια ανεβασμένα επίπεδα στους ανθρώπους. Η έλλειψη του *Abcg1* ενίσχυσε την αθηροσκλήρωση χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα των λιπιδίων ή των λιποπρωτεϊνών, ακριβώς όμοια με τις παρατηρήσεις στους ανθρώπους.

Ποντίκια με έλλειψη στο γονίδιο *Abcg1* παρουσιάζουν μια προοδευτική πνευμονική ασθένεια, η οποία εξαρτάται από την ηλικία και εμφανίζει πολλές από τις ιδιότητες που σχετίζονται με τα αναπνευστικά σύνδρομα του στρες (respiratory distress syndromes). Στην ηλικία των οκτώ μηνών, οι πνεύμονες των *Abcg1*^{-/-} ποντικών σε φυσιολογική διαίτα (chow) είχαν τεράστια συσσώρευση λιπιδίων στα μακροφάγα και στα τύπου 2 κύτταρα των πνευμόνων, και συσσώρευση υπερβολικών επιπέδων επιφανειοδραστικών παραγόντων (surfactant) (352). Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, όλες οι προηγούμενες μελέτες ανεξάρτητα από τις διαφορές στη σχεδιάσή τους, έδειξαν μεγάλη συσσώρευση λιπιδίων στους πνεύμονες των ποντικών *Abcg1*^{-/-} (350, 357). Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, δείξαμε ότι η ετερόζυγη κατάσταση g.-376C>T στον υποκινητή του ABCG1 συνδεόταν με αυξημένες πιθανότητες για ήπια, μέτρια και σοβαρή δύσπνοια σε σύγκριση με αυτούς που δεν είναι φορείς, υποδηλώνοντας ότι μεταλλαγές στον ABCG1 μπορεί να είναι η αιτία της ασθένειας των πνευμόνων στους ανθρώπους.

Συμπερασματικά, ταυτοποιήσαμε μια λειτουργική μεταλλαγή στον υποκινητή του ABCG1 η οποία συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για ισχαιμικό επεισόδιο (IHD, ischaemic heart disease), έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infraction) και δύσπνοια στο γενικό πληθυσμό. Επιβεβαιώνεται επομένως, ο ρόλος μιας γενετικής ποικιλομορφίας του ABCG1 στην αθηρογένεση στους ανθρώπους.

ΣΥΝΟΨΗ

Πληθώρα επιδημιολογικών και κλινικών μελετών έχει δείξει ότι τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογα με την εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών. Παρόλο που η HDL διαθέτει αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις, αγγειοδιασταλτικές και αντι-θρομβωτικές ιδιότητες, η κεντρική αντι-αθηρογενετική δράση της είναι η απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα μακροφάγα του τοιχώματος των αρτηριών. Στα μακροφάγα η χοληστερόλη απομακρύνεται είτε μέσω του μεταφορέα ABCA1 προς την απολιποπρωτεΐνη apoA-I για να γίνει η βιογένεση της HDL ή μέσω του μεταφορέα ABCG1 προς τα ώριμα σωματίδια της HDL. Τα μακροφάγα εξαρτώνται απόλυτα από αυτό το μηχανισμό προκειμένου να απομακρύνουν την περίσσεια χοληστερόλης και να μην μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα, ένα πρώιμο σημάδι αθηροσκλήρωσης. Σε αντίθεση με τα μακροφάγα, το ήπαρ διαθέτει μηχανισμούς ρύθμισης της σύνθεσης και του καταβολισμού της χοληστερόλης και αποτελεί τον κύριο ιστό παραγωγής της HDL μέσω της δράσης του μεταφορέα ABCA1.

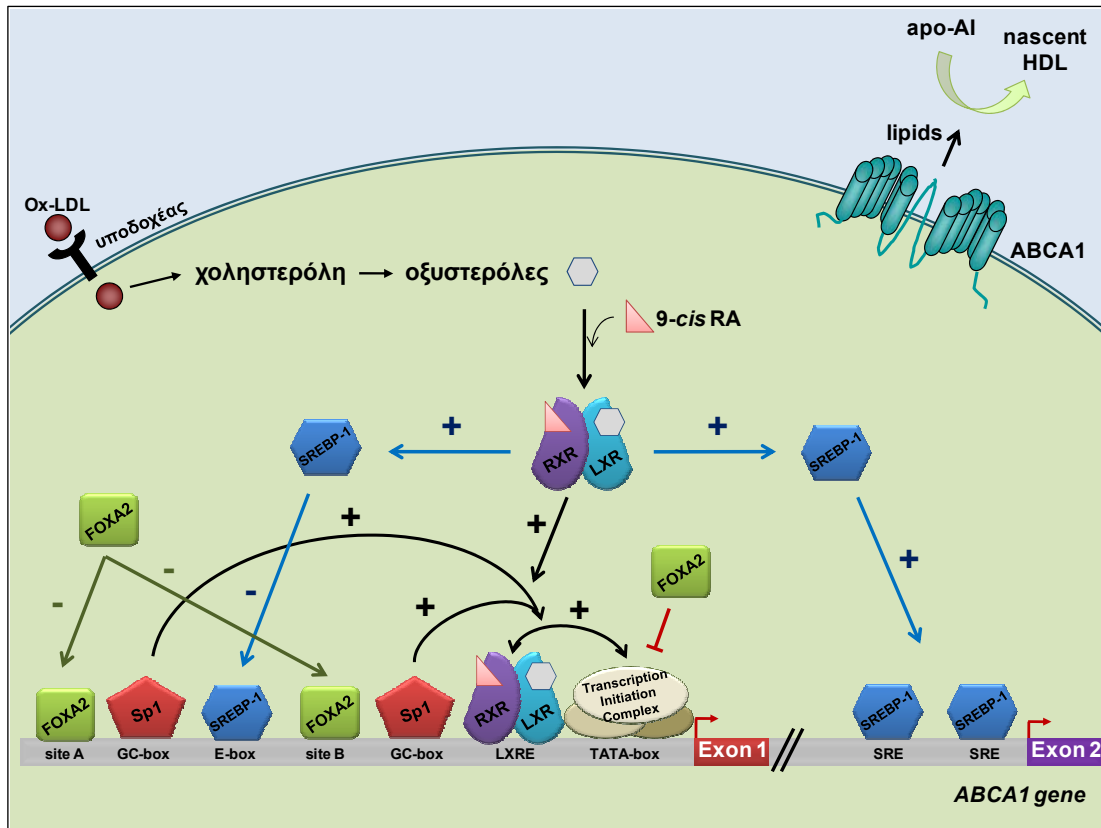
Οι υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις αν και επιτυγχάνουν αύξηση των επιπέδων της HDL παρουσιάζουν παρενέργειες ενώ οι στρατηγικές μείωσης της LDL (μέσω των στατινών) δεν μπορούν να εξαλείψουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων. Κατά συνέπεια, η διερεύνηση του ρόλου και της ρύθμισης παραγόντων που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1 είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί η στοχευμένη αύξηση της έκφρασης αυτών των γονιδίων με τις ελάχιστες δυνατές παρενέργειες. Το αποτέλεσμα θα είναι η δημιουργία νέων ουσιών οι οποίες αυξάνοντας την έκφραση των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1, και κατά συνέπεια τα επίπεδα της HDL, θα δρουν αντι-αθηρογενετικά.

Στην παρούσα διατριβή, διερευνήσαμε το πως διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή (Εικόνα 96). Δείξαμε ότι ο παράγοντας Sp1 είναι απαραίτητος για τη βέλτιστη επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή, ενώ ο παράγοντας FOXA2 αναστέλλει αυτή την επαγωγή μέσω της πρόσδεσής του στο TATA-box του υποκινητή του γονιδίου ABCA1. Επίσης, δείξαμε ότι το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1 είναι ένας λειτουργικός υποκινητής που περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα SREBP-1. Ο παράγοντας SREBP-1c ενεργοποιείται από τους LXRα/RXRα ως απόκριση στις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή και αντισταθμίζει την κατασταλτική δράση των παραγόντων SREBPs ανοδικά του πρώτου εξονίου.

Στο σύνολο τους οι παρατηρήσεις στην παρούσα διατριβή φανερώνουν ότι η έκφραση του γονιδίου ABCA1 υπόκειται σε λεπτή ρύθμιση από τη δράση

παραγόντων που επιδρούν στο μονοπάτι των υποδοχέων LXR/RXR προκειμένου να εξασφαλίσουν την απρόσκοπτη εκροή της χοληστερόλης προς τους αποδέκτες της (apoA-I) αλλά και να συγκρατήσουν την υπερενεργοποίηση του μονοπατιού όταν δεν υπάρχει ανάγκη. Το μονοπάτι ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 από οξυστερόλες και ρετινοειδή μέσω των LXR/RXR αποτελεί ένα χρήσιμο σύστημα για την ανάπτυξη νέων συνθετικών μορίων με επαγωγική δράση στην έκφραση του γονιδίου ABCA1 με θεραπευτικό στόχο την επιθετική αύξηση της HDL στο πλάσμα. Στο σύστημα αυτό θα μπορούσαμε να εξετάσουμε αναστολείς του παράγοντα FOXA2, επαγωγείς της θετικής δράσης του παράγοντα SREBP-1 στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου ABCA1, αλλά και ειδικούς αγωνιστές για τους πυρηνικούς υποδοχείς LXR/RXR που θα μπορούν να ενεργοποιούν ειδικά το μονοπάτι επαγωγής του γονιδίου ABCA1.

Τέλος, χαρακτηρίσαμε τη φυσική μεταλλαγή (-376C>T) στον υποκινητή του γονιδίου ABCG1 του ανθρώπου η οποία ευθύνεται για ισχαιμικά επεισόδια. Δείξαμε ότι η μεταλλαγή αυτή καταστρέφει μια θέση πρόσδεσης για τον παράγοντα Sp1 και μειώνει την επαγωγή του γονιδίου από τον παράγοντα αυτό. Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός φυσικών μεταλλαγών, όπως αυτή, αλλά και πολυμορφισμών που συναντώνται στον πληθυσμό μπορούν να εμπλουτίσουν τις γνώσεις μας για τη ρύθμιση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της HDL και να χρησιμεύσουν ως βιολογικοί δείκτες (biomarkers) για τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων, ιδιαίτερα αυτών που σχετίζονται με τα ισχαιμικά επεισόδια.



Εικόνα 96: Παράγοντες που επηρεάζουν την επαγωγή του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Οι συνδέτες των πυρηνικών υποδοχέων LXRα/RXRα ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου ABCA1 μέσω αλληλεπίδρασης με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Η ενεργοποίηση αυτή ενισχύεται περαιτέρω παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Οι υποδοχείς LXRα/RXRα ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1c ο οποίος έχει αρνητική δράση στη μεταγραφή ανοδικά του πρώτου εξονίου του γονιδίου ABCA1 η οποία αντισταθμίζεται από τη θετική δράση στο 1^ο ιντρόνιο. Ο παράγοντας FOXA2 ανταγωνίζεται την πρόσδεση της βασικής μεταγραφικής μηχανής στο TATA-box και αναστέλλει την επαγωγή του υποκινητή του γονιδίου ABCA1 από τις οξυστερόλες και τα ρετινοειδή. Επίσης, ο παράγοντας FOXA2 μπορεί να προσδένεται και σε άλλες θέσεις του υποκινητή ανοδικά του εξονίου 1 μειώνοντας τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ABCA1.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Hulley, S. B., Kagan, A., and Zukel, W. J. (1977) HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study, *Circulation* 55, 767-772.
2. Anderson, K. M., Wilson, P. W., Odell, P. M., and Kannel, W. B. (1991) An updated coronary risk profile. A statement for health professionals, *Circulation* 83, 356-362.
3. Glueck, C. J., Gartside, P., Fallat, R. W., Sielski, J., and Steiner, P. M. (1976) Longevity syndromes: familial hypobeta and familial hyperalpha lipoproteinemia, *The Journal of laboratory and clinical medicine* 88, 941-957.
4. Glueck, C. J., Fallat, R. W., Millett, F., and Steiner, P. M. (1975) Familial hyperalphalipoproteinemia, *Archives of internal medicine* 135, 1025-1028.
5. Patsch, W., Kuisk, I., Glueck, C., and Schonfeld, G. (1981) Lipoproteins in familial hyperalphalipoproteinemia, *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1, 156-161.
6. Rader, D. J., and Daugherty, A. (2008) Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis, *Nature* 451, 904-913.
7. Sever, P. S., Dahlof, B., Poulter, N. R., Wedel, H., Beevers, G., Caulfield, M., Collins, R., Kjeldsen, S. E., Kristinsson, A., McInnes, G. T., Mehlsen, J., Nieminen, M., O'Brien, E., and Ostergren, J. (2003) 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.
8. (2002) 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.
9. Waters, D. D., Guyton, J. R., Herrington, D. M., McGowan, M. P., Wenger, N. K., and Shear, C. (2004) Treating to New Targets (TNT) Study: does lowering low-density lipoprotein cholesterol levels below currently recommended guidelines yield incremental clinical benefit?, *The American journal of cardiology* 93, 154-158.
10. Cannon, C. P., Braunwald, E., McCabe, C. H., Rader, D. J., Rouleau, J. L., Belder, R., Joyal, S. V., Hill, K. A., Pfeffer, M. A., and Skene, A. M. (2004) Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes, *The New England journal of medicine* 350, 1495-1504.
11. Rhoads, G. G., Gulbrandsen, C. L., and Kagan, A. (1976) Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men, *The New England journal of medicine* 294, 293-298.
12. Genest, J. J., McNamara, J. R., Salem, D. N., and Schaefer, E. J. (1991) Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease, *The American journal of cardiology* 67, 1185-1189.
13. Assmann, G., and Schulte, H. (1987) The Prospective Cardiovascular Munster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension, *The American journal of cardiology* 59, 9G-17G.
14. Assmann, G., and Schulte, H. (1992) Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study, *The American journal of cardiology* 70, 733-737.
15. Gordon, T., Kannel, W. B., Castelli, W. P., and Dawber, T. R. (1981) Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study, *Archives of internal medicine* 141, 1128-1131.
16. Williams, C. L., Hayman, L. L., Daniels, S. R., Robinson, T. N., Steinberger, J., Paridon, S., and Bazzarre, T. (2002) Cardiovascular health in childhood: A statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis,

- Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association, *Circulation* 106, 143-160.
17. Bonow, R. O., Smaha, L. A., Smith, S. C., Jr., Mensah, G. A., and Lenfant, C. (2002) World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic, *Circulation* 106, 1602-1605.
 18. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I, *The Journal of clinical investigation* 115, 1333-1342.
 19. Singaraja, R. R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H. L., Hildebrand, R. B., Hayden, A., Brunham, L. R., Kang, M. H., Fruchart, J. C., Van Berkel, T. J., Parks, J. S., Staels, B., Rothblat, G. H., Fievret, C., and Hayden, M. R. (2006) 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.
 20. Cuchel, M., and Rader, D. J. (2006) Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?, *Circulation* 113, 2548-2555.
 21. Linsel-Nitschke, P., and Tall, A. R. (2005) HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease, *Nat Rev Drug Discov* 4, 193-205.
 22. Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R. H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X. Q., Elkon, K., Marcovina, S., Ridker, P., Oram, J. F., and Heinecke, J. W. (2007) Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL, *The Journal of clinical investigation* 117, 746-756.
 23. Nofer, J. R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport, *Atherosclerosis* 161, 1-16.
 24. Navab, M., Hama, S. Y., Cooke, C. J., Anantharamaiah, G. M., Chaddha, M., Jin, L., Subbanagounder, G., Faull, K. F., Reddy, S. T., Miller, N. E., and Fogelman, A. M. (2000) Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1, *Journal of lipid research* 41, 1481-1494.
 25. Navab, M., Berliner, J. A., Subbanagounder, G., Hama, S., Lusis, A. J., Castellani, L. W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A. D., Van Lenten, B. J., Vora, D., and Fogelman, A. M. (2001) HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 481-488.
 26. Navab, M., Hama, S. Y., Hough, G. P., Subbanagounder, G., Reddy, S. T., and Fogelman, A. M. (2001) A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids, *Journal of lipid research* 42, 1308-1317.
 27. Kontush, A., and Chapman, M. J. (2006) Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis, *Pharmacological reviews* 58, 342-374.
 28. Barter, P. J., Nicholls, S., Rye, K. A., Anantharamaiah, G. M., Navab, M., and Fogelman, A. M. (2004) Antiinflammatory properties of HDL, *Circulation research* 95, 764-772.

29. Nofer, J. R., Bot, M., Brodde, M., Taylor, P. J., Salm, P., Brinkmann, V., van Berkel, T., Assmann, G., and Biessen, E. A. (2007) FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice, *Circulation* 115, 501-508.
30. Gomaraschi, M., Basilico, N., Sisto, F., Taramelli, D., Eligini, S., Colli, S., Sirtori, C. R., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2005) High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli, *Biochimica et biophysica acta* 1736, 136-143.
31. Mineo, C., Yuhanna, I. S., Quon, M. J., and Shaul, P. W. (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases, *The Journal of biological chemistry* 278, 9142-9149.
32. Mackness, M. I., Arrol, S., and Durrington, P. N. (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, *FEBS letters* 286, 152-154.
33. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., and Shaul, P. W. (2006) Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circulation research* 98, 1352-1364.
34. Shaul, P. W. (2003) Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis, *The Journal of physiology* 547, 21-33.
35. Nofer, J. R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., Tietge, U. J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schafers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J., and Levkau, B. (2004) HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3, *The Journal of clinical investigation* 113, 569-581.
36. Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A. K., Gibson, L. L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K. L., Hahner, L. D., Cummings, M. L., Kitchens, R. L., Marcel, Y. L., Rader, D. J., and Shaul, P. W. (2006) High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I, *Circulation research* 98, 63-72.
37. Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J. C., Laudet, V., and Staels, B. (1998) The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates, *The Journal of biological chemistry* 273, 25713-25720.
38. Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouet, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J. C., Rubin, E., Deneffe, P., Staels, B., and Branellec, D. (1996) Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice, *The Journal of clinical investigation* 97, 2408-2416.
39. Miyazaki, A., Sakuma, S., Morikawa, W., Takiue, T., Miake, F., Terano, T., Sakai, M., Hakamata, H., Sakamoto, Y., Natio, M., and et al. (1995) Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 1882-1888.
40. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A. R. (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor, *The Journal of biological chemistry* 275, 28240-28245.
41. Costet, P., Lalanne, F., Gerbod-Giannone, M. C., Molina, J. R., Fu, X., Lund, E. G., Gudas, L. J., and Tall, A. R. (2003) Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages, *Molecular and cellular biology* 23, 7756-7766.
42. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9774-9779.

43. Brousseau, M. E., Schaefer, E. J., Wolfe, M. L., Bloedon, L. T., Digenio, A. G., Clark, R. W., Mancuso, J. P., and Rader, D. J. (2004) Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol, *The New England journal of medicine* 350, 1505-1515.
44. Ansell, B. J., Navab, M., Hama, S., Kamranpour, N., Fonarow, G., Hough, G., Rahmani, S., Mottahedeh, R., Dave, R., Reddy, S. T., and Fogelman, A. M. (2003) Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment, *Circulation* 108, 2751-2756.
45. Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M. F., Chimini, G., Kaminski, W. E., and Schmitz, G. (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages, *Biochemical and biophysical research communications* 257, 29-33.
46. Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., and Schmitz, G. (2003) Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues, *Clinical chemistry* 49, 230-238.
47. Kielar, D., Dietmaier, W., Langmann, T., Aslanidis, C., Probst, M., Naruszewicz, M., and Schmitz, G. (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR, *Clinical chemistry* 47, 2089-2097.
48. Wellington, C. L., Walker, E. K., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y. Z., Zhang, L. H., James, E., Wilson, J. E., Francone, O., McManus, B. M., and Hayden, M. R. (2002) ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 273-283.
49. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouellette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr., and Hayden, M. R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Nature genetics* 22, 336-345.
50. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nature genetics* 22, 347-351.
51. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P., and Assmann, G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1, *Nature genetics* 22, 352-355.
52. Schmitz, G., Kaminski, W. E., and Orso, E. (2000) ABC transporters in cellular lipid trafficking, *Current opinion in lipidology* 11, 493-501.
53. McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K. L., Roach, M. L., Royer, L. J., de Wet, J., Broccardo, C., Chimini, G., and Francone, O. L. (2000) High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4245-4250.
54. Christiansen-Weber, T. A., Volland, J. R., Wu, Y., Ngo, K., Roland, B. L., Nguyen, S., Peterson, P. A., and Fung-Leung, W. P. (2000) Functional loss of

- ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency, *The American journal of pathology* 157, 1017-1029.
55. Brunham, L. R., Singaraja, R. R., and Hayden, M. R. (2006) Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis, *Annual review of nutrition* 26, 105-129.
 56. Francis, G. A., Knopp, R. H., and Oram, J. F. (1995) Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease, *The Journal of clinical investigation* 96, 78-87.
 57. Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Journal of lipid research* 42, 1007-1017.
 58. Bungert, S., Molday, L. L., and Molday, R. S. (2001) Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites, *The Journal of biological chemistry* 276, 23539-23546.
 59. Fitzgerald, M. L., Mendez, A. J., Moore, K. J., Andersson, L. P., Panjeton, H. A., and Freeman, M. W. (2001) ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH2-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space, *The Journal of biological chemistry* 276, 15137-15145.
 60. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84, 276-294.
 61. Cohen, J. C., Kiss, R. S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y. L., McPherson, R., and Hobbs, H. H. (2004) Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol, *Science (New York, N.Y)* 305, 869-872.
 62. Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., Jensen, G. B., and Tybjaerg-Hansen, A. (2004) Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population, *The Journal of clinical investigation* 114, 1343-1353.
 63. Rader, D. J. (2003) Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications, *The American journal of cardiology* 92, 42J-49J.
 64. Aiello, R. J., Brees, D., and Francone, O. L. (2003) ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 972-980.
 65. Aiello, R. J., Brees, D., Bourassa, P. A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M., and Francone, O. L. (2002) Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 630-637.
 66. van Eck, M., Bos, I. S., Kaminski, W. E., Orso, E., Rothe, G., Twisk, J., Bottcher, A., Van Amersfoort, E. S., Christiansen-Weber, T. A., Fung-Leung, W. P., Van Berkel, T. J., and Schmitz, G. (2002) Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6298-6303.
 67. Haghpassand, M., Bourassa, P. A., Francone, O. L., and Aiello, R. J. (2001) Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels, *The Journal of clinical investigation* 108, 1315-1320.
 68. Lee, J. Y., and Parks, J. S. (2005) ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation, *Current opinion in lipidology* 16, 19-25.
 69. Ragozin, S., Niemeier, A., Laatsch, A., Loeffler, B., Merkel, M., Beisiegel, U., and Heeren, J. (2005) Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1433-1438.

70. Basso, F., Freeman, L., Knapper, C. L., Remaley, A., Stonik, J., Neufeld, E. B., Tansey, T., Amar, M. J., Fruchart-Najib, J., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2003) Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations, *Journal of lipid research* 44, 296-302.
71. Wellington, C. L., Brunham, L. R., Zhou, S., Singaraja, R. R., Visscher, H., Gelfer, A., Ross, C., James, E., Liu, G., Huber, M. T., Yang, Y. Z., Parks, R. J., Groen, A., Fruchart-Najib, J., and Hayden, M. R. (2003) Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1, *Journal of lipid research* 44, 1470-1480.
72. Vaisman, B. L., Lambert, G., Amar, M., Joyce, C., Ito, T., Shamburek, R. D., Cain, W. J., Fruchart-Najib, J., Neufeld, E. D., Remaley, A. T., Brewer, H. B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2001) ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice, *The Journal of clinical investigation* 108, 303-309.
73. Brewer, H. B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2003) New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport, *The American journal of cardiology* 91, 3E-11E.
74. Singaraja, R. R., Fievet, C., Castro, G., James, E. R., Hennuyer, N., Clee, S. M., Bissada, N., Choy, J. C., Fruchart, J. C., McManus, B. M., Staels, B., and Hayden, M. R. (2002) Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis, *The Journal of clinical investigation* 110, 35-42.
75. Wang, Y., and Oram, J. F. (2002) Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1, *The Journal of biological chemistry* 277, 5692-5697.
76. Schwartz, K., Lawn, R. M., and Wade, D. P. (2000) ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR, *Biochemical and biophysical research communications* 274, 794-802.
77. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J. (1999) Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism, *Current opinion in biotechnology* 10, 557-563.
78. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 266-271.
79. Fu, X., Menke, J. G., Chen, Y., Zhou, G., MacNaul, K. L., Wright, S. D., Sparrow, C. P., and Lund, E. G. (2001) 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells, *The Journal of biological chemistry* 276, 38378-38387.
80. Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D. C., Collins, J. L., and Tontonoz, P. (2001) Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter, *Molecular and cellular biology* 21, 7558-7568.
81. Whitney, K. D., Watson, M. A., Goodwin, B., Galardi, C. M., Maglich, J. M., Wilson, J. G., Willson, T. M., Collins, J. L., and Kliewer, S. A. (2001) Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages, *The Journal of biological chemistry* 276, 43509-43515.
82. Uehara, Y., Engel, T., Li, Z., Goepfert, C., Rust, S., Zhou, X., Langer, C., Schachtrup, C., Wiekowski, J., Lorkowski, S., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2002) Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1, *Diabetes* 51, 2922-2928.
83. Gan, X., Kaplan, R., Menke, J. G., MacNaul, K., Chen, Y., Sparrow, C. P., Zhou, G., Wright, S. D., and Cai, T. Q. (2001) Dual mechanisms of ABCA1

- regulation by geranylgeranyl pyrophosphate, *The Journal of biological chemistry* 276, 48702-48708.
84. Huuskonen, J., Vishnu, M., Pullinger, C. R., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2004) Regulation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by thyroid hormone receptor, *Biochemistry* 43, 1626-1632.
 85. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free radical biology & medicine* 13, 341-390.
 86. Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *The Journal of clinical investigation* 88, 1785-1792.
 87. Mangelsdorf, D. J. (1994) Vitamin A receptors, *Nutrition reviews* 52, S32-44.
 88. Allenby, G., Bocquel, M. T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J. F., Chambon, P., and et al. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 30-34.
 89. Schmitz, G., and Langmann, T. (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression, *Biochimica et biophysica acta* 1735, 1-19.
 90. Barbier, O., Torra, I. P., Duguay, Y., Blanquart, C., Fruchart, J. C., Glineur, C., and Staels, B. (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 717-726.
 91. Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M., and Tontonoz, P. (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis, *Molecular cell* 7, 161-171.
 92. Chinetti, G., Fruchart, J. C., and Staels, B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation, *Inflamm Res* 49, 497-505.
 93. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V., and Staels, B. (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway, *Nature medicine* 7, 53-58.
 94. Li, A. C., Brown, K. K., Silvestre, M. J., Willson, T. M., Palinski, W., and Glass, C. K. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *The Journal of clinical investigation* 106, 523-531.
 95. Li, A. C., Binder, C. J., Gutierrez, A., Brown, K. K., Plotkin, C. R., Pattison, J. W., Valledor, A. F., Davis, R. A., Willson, T. M., Witztum, J. L., Palinski, W., and Glass, C. K. (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma, *The Journal of clinical investigation* 114, 1564-1576.
 96. Oliver, W. R., Jr., Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Sznajdman, M. L., Lambert, M. H., Xu, H. E., Sternbach, D. D., Kliewer, S. A., Hansen, B. C., and Willson, T. M. (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5306-5311.
 97. Knight, B. L., Patel, D. D., Humphreys, S. M., Wiggins, D., and Gibbons, G. F. (2003) Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice, *Journal of lipid research* 44, 2049-2058.

98. Jiang, C., Ting, A. T., and Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature* 391, 82-86.
99. Pasceri, V., Wu, H. D., Willerson, J. T., and Yeh, E. T. (2000) Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators, *Circulation* 101, 235-238.
100. Liao, H., Langmann, T., Schmitz, G., and Zhu, Y. (2002) Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 127-132.
101. Zeng, L., Liao, H., Liu, Y., Lee, T. S., Zhu, M., Wang, X., Stemerman, M. B., Zhu, Y., and Shyy, J. Y. (2004) Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism, *The Journal of biological chemistry* 279, 48801-48807.
102. Horton, J. D., and Shimomura, I. (1999) Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis, *Current opinion in lipidology* 10, 143-150.
103. Langmann, T., Porsch-Ozcurumez, M., Heimerl, S., Probst, M., Moehle, C., Taher, M., Borsukova, H., Kielar, D., Kaminski, W. E., Dittrich-Wengenroth, E., and Schmitz, G. (2002) 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, *The Journal of biological chemistry* 277, 14443-14450.
104. Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J. F., Osorio, J., Remaley, A., Yang, X. P., Haudenschild, C., Prades, C., Chimini, G., Blackmon, E., Francois, T., Duverger, N., Rubin, E. M., Rosier, M., Deneffe, P., Fredrickson, D. S., and Brewer, H. B., Jr. (2000) Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7987-7992.
105. Yang, X. P., Freeman, L. A., Knapper, C. L., Amar, M. J., Remaley, A., Brewer, H. B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2002) The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene, *Journal of lipid research* 43, 297-306.
106. Porsch-Ozcurumez, M., Langmann, T., Heimerl, S., Borsukova, H., Kaminski, W. E., Drobnik, W., Honer, C., Schumacher, C., and Schmitz, G. (2001) 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, *The Journal of biological chemistry* 276, 12427-12433.
107. Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors, *The Journal of biological chemistry* 276, 36865-36868.
108. Freedman, L. P. (1999) Multimeric Coactivator Complexes for Steroid/Nuclear Receptors, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 10, 403-407.
109. Hermanson, O., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2002) Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 55-60.
110. Huuskonen, J., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2004) Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 703-708.
111. Wagner, B. L., Valledor, A. F., Shao, G., Daige, C. L., Bischoff, E. D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S. H., Heyman, R. A., Rosenfeld, M. G., Schulman, I. G., and Glass, C. K. (2003) Promoter-specific roles for liver X

- receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression, *Molecular and cellular biology* 23, 5780-5789.
112. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D. S. (2003) Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 1019-1026.
 113. Brendel, C., Schoonjans, K., Botrugno, O. A., Treuter, E., and Auwerx, J. (2002) The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 16, 2065-2076.
 114. Singaraja, R. R., Bocher, V., James, E. R., Clee, S. M., Zhang, L. H., Leavitt, B. R., Tan, B., Brooks-Wilson, A., Kwok, A., Bissada, N., Yang, Y. Z., Liu, G., Tafuri, S. R., Fievet, C., Wellington, C. L., Staels, B., and Hayden, M. R. (2001) Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1, *The Journal of biological chemistry* 276, 33969-33979.
 115. Huuskonen, J., Abedin, M., Vishnu, M., Pullinger, C. R., Baranzini, S. E., Kane, J. P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2003) Dynamic regulation of alternative ATP-binding cassette transporter A1 transcripts, *Biochemical and biophysical research communications* 306, 463-468.
 116. Cavelier, L. B., Qiu, Y., Bielicki, J. K., Afzal, V., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (2001) Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice, *The Journal of biological chemistry* 276, 18046-18051.
 117. Singaraja, R. R., James, E. R., Crim, J., Visscher, H., Chatterjee, A., and Hayden, M. R. (2005) Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1, *Journal of lipid research* 46, 2061-2071.
 118. Langmann, T., Porsch-Ozcurumez, M., Unkelbach, U., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000) Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene, *Biochimica et biophysica acta* 1494, 175-180.
 119. Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006) ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 534-540.
 120. Hoekstra, M., Kruijt, J. K., Van Eck, M., and Van Berkel, T. J. (2003) Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells, *The Journal of biological chemistry* 278, 25448-25453.
 121. Lorkowski, S., Rust, S., Engel, T., Jung, E., Tegelkamp, K., Galinski, E. A., Assmann, G., and Cullen, P. (2001) Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene, *Biochemical and biophysical research communications* 280, 121-131.
 122. Kennedy, M. A., Venkateswaran, A., Tarr, P. T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P. A. (2001) Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein, *The Journal of biological chemistry* 276, 39438-39447.
 123. Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J. M., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J., and Edwards, P. A. (2000) Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols, *The Journal of biological chemistry* 275, 14700-14707.
 124. Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W. E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., and Schmitz, G. (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the

- Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 817-822.
125. Sabol, S. L., Brewer, H. B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2005) The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver, *Journal of lipid research* 46, 2151-2167.
 126. Uehara, Y., Miura, S., von Eckardstein, A., Abe, S., Fujii, A., Matsuo, Y., Rust, S., Lorkowski, S., Assmann, G., Yamada, T., and Saku, K. (2007) Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element, *Atherosclerosis* 191, 11-21.
 127. Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function, *Endocrine reviews* 20, 689-725.
 128. Castrillo, A., and Tontonoz, P. (2004) Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation, *Annual review of cell and developmental biology* 20, 455-480.
 129. Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., and Mangelsdorf, D. J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway, *Genes & development* 9, 1033-1045.
 130. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J. (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis, *Annual review of cell and developmental biology* 16, 459-481.
 131. Prufer, K., and Boudreaux, J. (2007) Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated, *Journal of cellular biochemistry* 100, 69-85.
 132. Lehmann, J. M., Kliewer, S. A., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Oliver, B. B., Su, J. L., Sundseth, S. S., Winegar, D. A., Blanchard, D. E., Spencer, T. A., and Willson, T. M. (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway, *The Journal of biological chemistry* 272, 3137-3140.
 133. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha, *Nature* 383, 728-731.
 134. Quinet, E. M., Savio, D. A., Halpern, A. R., Chen, L., Miller, C. P., and Nambi, P. (2004) Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor, *Journal of lipid research* 45, 1929-1942.
 135. Chen, W., Chen, G., Head, D. L., Mangelsdorf, D. J., and Russell, D. W. (2007) Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice, *Cell metabolism* 5, 73-79.
 136. Song, C., Hiipakka, R. A., and Liao, S. (2000) Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs, *Steroids* 65, 423-427.
 137. Lund, E. G., Peterson, L. B., Adams, A. D., Lam, M. H., Burton, C. A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J. C., Menke, J. G., Milot, D. P., Mitnaul, L. J., Rex-Rabe, S. E., Rosa, R. L., Tian, J. Y., Wright, S. D., and Sparrow, C. P. (2006) 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, *Biochemical pharmacology* 71, 453-463.
 138. Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V. P., Kirchgessner, T. G., Billheimer, J., and Mukherjee, R. (2004) Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator, *Journal of lipid research* 45, 1410-1417.
 139. Fievet, C., and Staels, B. (2008) Liver X receptor modulators: Effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis, *Biochemical pharmacology*.

140. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., and Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers, *Science (New York, N.Y)* **289**, 1524-1529.
141. Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D. J. (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta, *The Journal of biological chemistry* **277**, 18793-18800.
142. Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., and Graziano, M. P. (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption, *Science (New York, N.Y)* **303**, 1201-1204.
143. Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J. C., Fievet, C., Clavey, V., Staels, B., and Lestavel, S. (2006) Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine, *Biochemical and biophysical research communications* **340**, 1259-1263.
144. Wang, Y., Rogers, P. M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K. R., and Burris, T. P. (2008) Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA, *The Journal of biological chemistry* **283**, 26332-26339.
145. Ishimoto, K., Tachibana, K., Sumitomo, M., Omote, S., Hanano, I., Yamasaki, D., Watanabe, Y., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., and Doi, T. (2006) Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha, *FEBS letters* **580**, 4929-4933.
146. Tall, A. R., Costet, P., and Wang, N. (2002) Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux, *The Journal of clinical investigation* **110**, 899-904.
147. Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D. J. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **17**, 985-993.
148. Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A. R. (2006) LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 1310-1316.
149. Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A. L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhrel, M. A., Bultel, S., Fruchart, J. C., Ikonen, E., Clavey, V., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2005) Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages, *Circulation research* **97**, 682-689.
150. Mak, P. A., Laffitte, B. A., Desrumaux, C., Joseph, S. B., Curtiss, L. K., Mangelsdorf, D. J., Tontonoz, P., and Edwards, P. A. (2002) Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta, *The Journal of biological chemistry* **277**, 31900-31908.
151. Liang, Y., Jiang, X. C., Liu, R., Liang, G., Beyer, T. P., Gao, H., Ryan, T. P., Dan Li, S., Eacho, P. I., and Cao, G. (2004) Liver X receptors (LXRs) regulate apolipoprotein AIV-implications of the antiatherosclerotic effect of LXR agonists, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **18**, 2000-2010.
152. Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Chen, M., Castrillo, A., Repa, J., Wilpitz, D., Mangelsdorf, D., and Tontonoz, P. (2003) The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions, *Molecular and cellular biology* **23**, 2182-2191.
153. Cao, G., Beyer, T. P., Yang, X. P., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Bensch, W. R., Kauffman, R. F., Gao, H., Ryan, T. P., Liang, Y., Eacho, P. I., and Jiang, X. C. (2002) Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo, *The Journal of biological chemistry* **277**, 39561-39565.

154. Zhang, Y., Repa, J. J., Gauthier, K., and Mangelsdorf, D. J. (2001) Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, *The Journal of biological chemistry* 276, 43018-43024.
155. Schuster, G. U., Parini, P., Wang, L., Alberti, S., Steffensen, K. R., Hansson, G. K., Angelin, B., and Gustafsson, J. A. (2002) Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice, *Circulation* 106, 1147-1153.
156. Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., and Shan, B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis, *Genes & development* 14, 2831-2838.
157. Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plosch, T., Kok, T., Bloks, V. W., van der Sluijs, F. H., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Verkade, H. J., and Kuipers, F. (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles, *The Journal of biological chemistry* 277, 34182-34190.
158. Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E., and Mangelsdorf, D. J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *Cell* 93, 693-704.
159. Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter, *Molecular and cellular biology* 21, 2991-3000.
160. Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, *Genes & development* 14, 2819-2830.
161. Liang, G., Yang, J., Horton, J. D., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c, *The Journal of biological chemistry* 277, 9520-9528.
162. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors, *Nature medicine* 9, 213-219.
163. Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R. K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors, *Cell* 122, 707-721.
164. Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II, *Cell* 32, 669-680.
165. Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., and Tjian, R. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1, *Science (New York, N.Y)* 234, 47-52.
166. Letovsky, J., and Dynan, W. S. (1989) Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence, *Nucleic acids research* 17, 2639-2653.
167. Black, A. R., Black, J. D., and Azizkhan-Clifford, J. (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer, *Journal of cellular physiology* 188, 143-160.

168. Cook, T., Gebelein, B., and Urrutia, R. (1999) Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors, *Annals of the New York Academy of Sciences* 880, 94-102.
169. Philipsen, S., and Suske, G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors, *Nucleic acids research* 27, 2991-3000.
170. Turner, J., and Crossley, M. (1999) Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger, *Trends in biochemical sciences* 24, 236-240.
171. Dang, D. T., Pevsner, J., and Yang, V. W. (2000) The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors, *The international journal of biochemistry & cell biology* 32, 1103-1121.
172. Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors, *Genome biology* 4, 206.
173. Lomberk, G., and Urrutia, R. (2005) The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins, *The Biochemical journal* 392, 1-11.
174. Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002) Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors, *Molecular and cellular endocrinology* 195, 27-38.
175. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors, *Gene* 238, 291-300.
176. Kingsley, C., and Winoto, A. (1992) Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression, *Molecular and cellular biology* 12, 4251-4261.
177. Harrison, S. M., Houzelstein, D., Dunwoodie, S. L., and Beddington, R. S. (2000) Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury, *Developmental biology* 227, 358-372.
178. Courey, A. J., and Tjian, R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif, *Cell* 55, 887-898.
179. Su, K., Roos, M. D., Yang, X., Han, I., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (1999) An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro, *The Journal of biological chemistry* 274, 15194-15202.
180. Murata, Y., Kim, H. G., Rogers, K. T., Udvardia, A. J., and Horowitz, J. M. (1994) Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain, *The Journal of biological chemistry* 269, 20674-20681.
181. Courey, A. J., Holtzman, D. A., Jackson, S. P., and Tjian, R. (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1, *Cell* 59, 827-836.
182. Mastrangelo, I. A., Courey, A. J., Wall, J. S., Jackson, S. P., and Hough, P. V. (1991) DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5670-5674.
183. Pascal, E., and Tjian, R. (1991) Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism, *Genes & development* 5, 1646-1656.
184. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3, *The EMBO journal* 13, 3843-3851.
185. Li, L., He, S., Sun, J. M., and Davie, J. R. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 460-471.
186. Kennett, S. B., Udvardia, A. J., and Horowitz, J. M. (1997) Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription, *Nucleic acids research* 25, 3110-3117.

187. Emili, A., Greenblatt, J., and Ingles, C. J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein, *Molecular and cellular biology* 14, 1582-1593.
188. Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H., and Tjian, R. (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 192-196.
189. Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G., and Tjian, R. (1999) The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1, *Nature* 397, 446-450.
190. Lee, J. A., Suh, D. C., Kang, J. E., Kim, M. H., Park, H., Lee, M. N., Kim, J. M., Jeon, B. N., Roh, H. E., Yu, M. Y., Choi, K. Y., Kim, K. Y., and Hur, M. W. (2005) Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK, *The Journal of biological chemistry* 280, 28061-28071.
191. Soutoglou, E., Viollet, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M., and Talianidis, I. (2001) Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity, *The EMBO journal* 20, 1984-1992.
192. Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., and Emerson, B. M. (2000) Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits, *Genes & development* 14, 2441-2451.
193. Kadam, S., and Emerson, B. M. (2003) Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes, *Molecular cell* 11, 377-389.
194. Song, J., Ugai, H., Kanazawa, I., Sun, K., and Yokoyama, K. K. (2001) Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements, *The Journal of biological chemistry* 276, 19897-19904.
195. Esteve, P. O., Chin, H. G., and Pradhan, S. (2007) Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells, *The Journal of biological chemistry* 282, 2615-2625.
196. Samson, S. L., and Wong, N. C. (2002) Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression, *Journal of molecular endocrinology* 29, 265-279.
197. Chu, S., and Ferro, T. J. (2005) Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation, *Gene* 348, 1-11.
198. Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R., and Horikoshi, M. (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding, *Genes Cells* 5, 29-41.
199. Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R., and Kudlow, J. E. (1997) O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions, *Molecular and cellular biology* 17, 6472-6480.
200. Yang, X., Su, K., Roos, M. D., Chang, Q., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2001) O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6611-6616.
201. Spengler, M. L., Guo, L. W., and Brattain, M. G. (2008) Phosphorylation mediates Sp1 coupled activities of proteolytic processing, desumoylation and degradation, *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 623-630.
202. Zaniolo, K., Desnoyers, S., Leclerc, S., and Guerin, S. L. (2007) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1, *BMC molecular biology* 8, 96.

203. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell* 89, 331-340.
204. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells, *The Journal of clinical investigation* 99, 838-845.
205. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene, *Cell* 75, 187-197.
206. Hua, X., Wu, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Hobbs, H. H. (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13, *Genomics* 25, 667-673.
207. Goldstein, J. L., Rawson, R. B., and Brown, M. S. (2002) Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis, *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 139-148.
208. Hua, X., Sakai, J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1995) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection, *The Journal of biological chemistry* 270, 29422-29427.
209. Rawson, R. B. (2003) The SREBP pathway--insights from Insigs and insects, *Nature reviews* 4, 631-640.
210. Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M. J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), *The Journal of biological chemistry* 269, 17267-17273.
211. Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells, *The Journal of clinical investigation* 99, 846-854.
212. Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Wang, X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11603-11607.
213. Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein, *The Journal of biological chemistry* 272, 20213-20221.
214. Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER, *Cell* 110, 489-500.
215. Yabe, D., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12753-12758.
216. Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Espenshade, P. J. (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes, *Cell* 102, 315-323.
217. Espenshade, P. J., Li, W. P., and Yabe, D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER,

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11694-11699.
218. Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R., and Yoneda, Y. (1999) Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip, *Molecular biology of the cell* 10, 2221-2233.
 219. Nagoshi, E., and Yoneda, Y. (2001) Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta, *Molecular and cellular biology* 21, 2779-2789.
 220. Yieh, L., Sanchez, H. B., and Osborne, T. F. (1995) Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6102-6106.
 221. Inoue, J., Sato, R., and Maeda, M. (1998) Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase, *Journal of biochemistry* 123, 1191-1198.
 222. Dooley, K. A., Millinder, S., and Osborne, T. F. (1998) Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y, *The Journal of biological chemistry* 273, 1349-1356.
 223. Bennett, M. K., Ngo, T. T., Athanikar, J. N., Rosenfeld, J. M., and Osborne, T. F. (1999) Co-stimulation of promoter for low density lipoprotein receptor gene by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 is specifically disrupted by the yin yang 1 protein, *The Journal of biological chemistry* 274, 13025-13032.
 224. Sato, R. (2009) SREBPs: protein interaction and SREBPs, *The FEBS journal* 276, 622-627.
 225. Sheng, Z., Otani, H., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1995) Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 935-938.
 226. Magana, M. M., and Osborne, T. F. (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter, *The Journal of biological chemistry* 271, 32689-32694.
 227. Kim, J. B., Spotts, G. D., Halvorsen, Y. D., Shih, H. M., Ellenberger, T., Towle, H. C., and Spiegelman, B. M. (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain, *Molecular and cellular biology* 15, 2582-2588.
 228. Shimano, H., Horton, J. D., Hammer, R. E., Shimomura, I., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a, *The Journal of clinical investigation* 98, 1575-1584.
 229. Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *The Journal of clinical investigation* 109, 1125-1131.
 230. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B. S., Bashmakov, Y., and Horton, J. D. (1998) Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in

- transgenic mouse liver, *The Journal of biological chemistry* 273, 35299-35306.
231. Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., and Shimano, H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2, *The Journal of clinical investigation* 101, 2331-2339.
 232. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis, *Biochimie* 86, 839-848.
 233. Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., and Maeda, M. (1996) Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2, *The Journal of biological chemistry* 271, 26461-26464.
 234. Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hasty, A. H., Okazaki, H., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2000) Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene, *The Journal of biological chemistry* 275, 31078-31085.
 235. Horton, J. D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., and Shimano, H. (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5987-5992.
 236. Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M. (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1, *The Journal of clinical investigation* 101, 1-9.
 237. Bizeau, M. E., MacLean, P. S., Johnson, G. C., and Wei, Y. (2003) Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats, *The Journal of nutrition* 133, 1787-1792.
 238. Commerford, S. R., Peng, L., Dube, J. J., and O'Doherty, R. M. (2004) In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R218-227.
 239. Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J. B., Ferre, P., and Fofelle, F. (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose, *Molecular and cellular biology* 19, 3760-3768.
 240. Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P., and Fofelle, F. (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes, *The Biochemical journal* 350 Pt 2, 389-393.
 241. Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Fofelle, F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12737-12742.
 242. Fleischmann, M., and Iynedjian, P. B. (2000) Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt, *The Biochemical journal* 349, 13-17.
 243. DeBose-Boyd, R. A., Ou, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2001) Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands, *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 1477-1482.
244. Laffitte, B. A., Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., Castrillo, A., Wilpitz, D. C., Mangelsdorf, D. J., Collins, J. L., Saez, E., and Tontonoz, P. (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5419-5424.
 245. Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2004) Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11245-11250.
 246. Hegarty, B. D., Bobard, A., Hainault, I., Ferre, P., Bossard, P., and Foufelle, F. (2005) Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 791-796.
 247. Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R. (2003) Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway, *The Journal of biological chemistry* 278, 16809-16819.
 248. Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002) Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity, *The Journal of biological chemistry* 277, 8999-9009.
 249. Nishida, T., and Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription, *The Journal of biological chemistry* 277, 41311-41317.
 250. Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway, *The Journal of biological chemistry* 276, 36431-36437.
 251. Arito, M., Horiba, T., Hachimura, S., Inoue, J., and Sato, R. (2008) Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis, *The Journal of biological chemistry* 283, 15224-15231.
 252. Carlsson, P., and Mahlapuu, M. (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism, *Developmental biology* 250, 1-23.
 253. Kaestner, K. H., Knochel, W., and Martinez, D. E. (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors, *Genes & development* 14, 142-146.
 254. Lantz, K. A., and Kaestner, K. H. (2005) Winged-helix transcription factors and pancreatic development, *Clin Sci (Lond)* 108, 195-204.
 255. Overdier, D. G., Porcella, A., and Costa, R. H. (1994) The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix, *Molecular and cellular biology* 14, 2755-2766.
 256. Gerrish, K., Gannon, M., Shih, D., Henderson, E., Stoffel, M., Wright, C. V., and Stein, R. (2000) Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites, *The Journal of biological chemistry* 275, 3485-3492.
 257. Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Koch, C., Ameer, A., Enroth, S., Clelland, G., Wester, K., Wilcox, S., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Wraight, V. L., James,

- K., Andrews, R., Langford, C., Dhimi, P., Carter, N., Vetrie, D., Ponten, F., Komorowski, J., Dunham, I., and Wadelius, C. (2005) Binding sites for metabolic disease related transcription factors inferred at base pair resolution by chromatin immunoprecipitation and genomic microarrays, *Human molecular genetics* 14, 3435-3447.
258. Cirillo, L. A., Lin, F. R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., and Zaret, K. S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4, *Molecular cell* 9, 279-289.
 259. Friedman, J. R., and Kaestner, K. H. (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism, *Cell Mol Life Sci* 63, 2317-2328.
 260. Pani, L., Overdier, D. G., Porcella, A., Qian, X., Lai, E., and Costa, R. H. (1992) Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein, *Molecular and cellular biology* 12, 3723-3732.
 261. Shen, W., Scarce, L. M., Brestelli, J. E., Sund, N. J., and Kaestner, K. H. (2001) Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast, *The Journal of biological chemistry* 276, 42812-42817.
 262. Kaestner, K. H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D. J., and Schutz, G. (1999) Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo, *Genes & development* 13, 495-504.
 263. Lantz, K. A., Vatamaniuk, M. Z., Brestelli, J. E., Friedman, J. R., Matschinsky, F. M., and Kaestner, K. H. (2004) Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion, *The Journal of clinical investigation* 114, 512-520.
 264. Lee, C. S., Sund, N. J., Behr, R., Herrera, P. L., and Kaestner, K. H. (2005) Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells, *Developmental biology* 278, 484-495.
 265. Zhang, L., Rubins, N. E., Ahima, R. S., Greenbaum, L. E., and Kaestner, K. H. (2005) Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting, *Cell metabolism* 2, 141-148.
 266. Wolfrum, C., Shih, D. Q., Kuwajima, S., Norris, A. W., Kahn, C. R., and Stoffel, M. (2003) Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation, *The Journal of clinical investigation* 112, 345-356.
 267. Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J. M., and Stoffel, M. (2004) Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes, *Nature* 432, 1027-1032.
 268. Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E., and Stoffel, M. (2003) Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11624-11629.
 269. Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M. D., and Edlund, H. (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse, *Cell metabolism* 1, 245-258.
 270. Zaret, K. (1999) Developmental competence of the gut endoderm: genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins, *Developmental biology* 209, 1-10.
 271. Gao, N., Zhang, J., Rao, M. A., Case, T. C., Mirosevich, J., Wang, Y., Jin, R., Gupta, A., Rennie, P. S., and Matusik, R. J. (2003) The role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 1484-1507.

272. Carroll, J. S., Liu, X. S., Brodsky, A. S., Li, W., Meyer, C. A., Szary, A. J., Eeckhoutte, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T. R., Fox, E. A., Silver, P. A., and Brown, M. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1, *Cell* 122, 33-43.
273. Laganier, J., Deblois, G., Lefebvre, C., Bataille, A. R., Robert, F., and Giguere, V. (2005) From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11651-11656.
274. Ryseck, R. P., and Bravo, R. (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins, *Oncogene* 6, 533-542.
275. Schumacher, M. A., Goodman, R. H., and Brennan, R. G. (2000) The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding, *The Journal of biological chemistry* 275, 35242-35247.
276. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor, *Cell* 49, 729-739.
277. Macgregor, P. F., Abate, C., and Curran, T. (1990) Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1, *Oncogene* 5, 451-458.
278. Nomura, N., Zu, Y. L., Maekawa, T., Tabata, S., Akiyama, T., and Ishii, S. (1993) Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1, *The Journal of biological chemistry* 268, 4259-4266.
279. Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E., and Leder, P. (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities, *Cell* 55, 917-924.
280. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction, *Nature* 336, 646-651.
281. Chiu, R., Angel, P., and Karin, M. (1989) Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun, *Cell* 59, 979-986.
282. Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. (2000) Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression, *The EMBO journal* 19, 2056-2068.
283. Passegue, E., and Wagner, E. F. (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression, *The EMBO journal* 19, 2969-2979.
284. Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E., and Angel, P. (2000) c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin, *Cell* 103, 745-755.
285. Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *The Journal of biological chemistry* 270, 16483-16486.
286. Karin, M., and Delhase, M. (1998) JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9067-9069.
287. Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A. A., Moll, J. R., and Bonovich, M. (2002) Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties, *Molecular and cellular biology* 22, 6321-6335.

288. Ryder, K., and Nathans, D. (1988) Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 8464-8467.
289. Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P., and Verma, I. M. (1988) Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA, *Nature* 334, 629-631.
290. Quantin, B., and Breathnach, R. (1988) Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts, *Nature* 334, 538-539.
291. Angel, P., and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochimica et biophysica acta* 1072, 129-157.
292. Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M. (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha, *Nature* 337, 661-663.
293. Goldgaber, D., Harris, H. W., Hla, T., Maciag, T., Donnelly, R. J., Jacobsen, J. S., Vitek, M. P., and Gajdusek, D. C. (1989) Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7606-7610.
294. Muegge, K., Williams, T. M., Kant, J., Karin, M., Chiu, R., Schmidt, A., Siebenlist, U., Young, H. A., and Durum, S. K. (1989) Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1, *Science (New York, N.Y)* 246, 249-251.
295. Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1994) Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain, *The EMBO journal* 13, 5421-5432.
296. Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain, *Cell* 76, 1025-1037.
297. Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999) Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation, *The EMBO journal* 18, 420-432.
298. Suzuki, Y., Shimada, J., Shudo, K., Matsumura, M., Crippa, M. P., and Kojima, S. (1999) Physical interaction between retinoic acid receptor and Sp1: mechanism for induction of urokinase by retinoic acid, *Blood* 93, 4264-4276.
299. Husmann, M., Dragneva, Y., Romahn, E., and Jehnichen, P. (2000) Nuclear receptors modulate the interaction of Sp1 and GC-rich DNA via ternary complex formation, *The Biochemical journal* 352 Pt 3, 763-772.
300. Huang, Y. C., Chen, J. Y., and Hung, W. C. (2004) Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3, *Oncogene* 23, 4856-4861.
301. Cheng, H. T., Chen, J. Y., Huang, Y. C., Chang, H. C., and Hung, W. C. (2006) Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex, *Journal of cellular biochemistry* 98, 1450-1456.
302. Vyhlidal, C., Samudio, I., Kladde, M. P., and Safe, S. (2000) Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site, *Journal of molecular endocrinology* 24, 329-338.
303. Safe, S. (2001) Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions, *Vitamins and hormones* 62, 231-252.

304. Kim, K., Thu, N., Saville, B., and Safe, S. (2003) Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 804-817.
305. Kim, K., Barhoumi, R., Burghardt, R., and Safe, S. (2005) Analysis of estrogen receptor alpha-Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 19, 843-854.
306. Dong, J., Tsai-Morris, C. H., and Dufau, M. L. (2006) A novel estradiol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor, *The Journal of biological chemistry* 281, 18825-18836.
307. Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., and Safe, S. (1997) Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 11, 1569-1580.
308. Shimada, J., Suzuki, Y., Kim, S. J., Wang, P. C., Matsumura, M., and Kojima, S. (2001) Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 15, 1677-1692.
309. Sun, G., Porter, W., and Safe, S. (1998) Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 12, 882-890.
310. Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, *Trends in pharmacological sciences* 21, 381-388.
311. Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Current opinion in genetics & development* 9, 140-147.
312. Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. (2000) p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor, *The Journal of biological chemistry* 275, 1371-1376.
313. Shea-Eaton, W., Lopez, D., and McLean, M. P. (2001) Yin yang 1 protein negatively regulates high-density lipoprotein receptor gene transcription by disrupting binding of sterol regulatory element binding protein to the sterol regulatory element, *Endocrinology* 142, 49-58.
314. Mizutani, T., Yamada, K., Minegishi, T., and Miyamoto, K. (2000) Transcriptional regulation of rat scavenger receptor class B type I gene, *The Journal of biological chemistry* 275, 22512-22519.
315. Malerod, L., Juvet, L. K., Hanssen-Bauer, A., Eskild, W., and Berg, T. (2002) Oxysterol-activated LXRA/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes, *Biochemical and biophysical research communications* 299, 916-923.
316. Luo, Y., and Tall, A. R. (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element, *The Journal of clinical investigation* 105, 513-520.
317. Le Goff, W., Guerin, M., Petit, L., Chapman, M. J., and Thillet, J. (2003) Regulation of human CETP gene expression: role of SP1 and SP3 transcription factors at promoter sites -690, -629, and -37, *Journal of lipid research* 44, 1322-1331.
318. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J. (2002) The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis, *Nature medicine* 8, 1243-1248.
319. Thymiakou, E., Zannis, V. I., and Kardassis, D. (2007) Physical and functional interactions between liver X receptor/retinoid X receptor and Sp1 modulate

- the transcriptional induction of the human ATP binding cassette transporter A1 gene by oxysterols and retinoids, *Biochemistry* 46, 11473-11483.
320. Bochkis, I. M., Rubins, N. E., White, P., Furth, E. E., Friedman, J. R., and Kaestner, K. H. (2008) Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress, *Nature medicine* 14, 828-836.
 321. Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M., and Hemmings, B. A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B, *The Journal of biological chemistry* 272, 31515-31524.
 322. Oram, J. F., and Vaughan, A. M. (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins, *Current opinion in lipidology* 11, 253-260.
 323. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein, *The Journal of biological chemistry* 276, 23742-23747.
 324. Remaley, A. T., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Neufeld, E. B., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Eggerman, T. L., Patterson, A. P., Duverger, N. J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001) Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter, *Biochemical and biophysical research communications* 280, 818-823.
 325. Joyce, C. W., Amar, M. J., Lambert, G., Vaisman, B. L., Paigen, B., Najib-Fruchart, J., Hoyt, R. F., Jr., Neufeld, E. D., Remaley, A. T., Fredrickson, D. S., Brewer, H. B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2002) The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 407-412.
 326. Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., and Burley, S. K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature* 364, 412-420.
 327. Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerback, S., and Carlsson, P. (1994) Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending, *The EMBO journal* 13, 5002-5012.
 328. Yang, Q., Kong, Y., Rothermel, B., Garry, D. J., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000) The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian sin3B, *The Biochemical journal* 345 Pt 2, 335-343.
 329. Scott, K. L., and Plon, S. E. (2005) CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor, *Gene* 359, 119-126.
 330. Wierstra, I., and Alves, J. (2006) Despite its strong transactivation domain, transcription factor FOXM1c is kept almost inactive by two different inhibitory domains, *Biological chemistry* 387, 963-976.
 331. Wang, J. C., Waltner-Law, M., Yamada, K., Osawa, H., Stifani, S., and Granner, D. K. (2000) Transducin-like enhancer of split proteins, the human homologs of Drosophila groucho, interact with hepatic nuclear factor 3beta, *The Journal of biological chemistry* 275, 18418-18423.
 332. Li, P., Lee, H., Guo, S., Unterman, T. G., Jenster, G., and Bai, W. (2003) AKT-independent protection of prostate cancer cells from apoptosis mediated through complex formation between the androgen receptor and FKHR, *Molecular and cellular biology* 23, 104-118.
 333. Zhao, H. H., Herrera, R. E., Coronado-Heinsohn, E., Yang, M. C., Ludes-Meyers, J. H., Seybold-Tilson, K. J., Nawaz, Z., Yee, D., Barr, F. G., Diab, S. G., Brown, P. H., Fuqua, S. A., and Osborne, C. K. (2001) Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear

- receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions, *The Journal of biological chemistry* 276, 27907-27912.
334. Chen, G., Nomura, M., Morinaga, H., Matsubara, E., Okabe, T., Goto, K., Yanase, T., Zheng, H., Lu, J., and Nawata, H. (2005) Modulation of androgen receptor transactivation by FoxH1. A newly identified androgen receptor corepressor, *The Journal of biological chemistry* 280, 36355-36363.
 335. Yu, X., Gupta, A., Wang, Y., Suzuki, K., Mirosevich, J., Orgebin-Crist, M. C., and Matusik, R. J. (2005) Foxa1 and Foxa2 interact with the androgen receptor to regulate prostate and epididymal genes differentially, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1061, 77-93.
 336. Schuur, E. R., Loktev, A. V., Sharma, M., Sun, Z., Roth, R. A., and Weigel, R. J. (2001) Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family, *The Journal of biological chemistry* 276, 33554-33560.
 337. Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M., and Sueyoshi, T. (2007) Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver, *The Journal of biological chemistry* 282, 9768-9776.
 338. Dowell, P., Otto, T. C., Adi, S., and Lane, M. D. (2003) Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways, *The Journal of biological chemistry* 278, 45485-45491.
 339. Kamei, Y., Miura, S., Suganami, T., Akaike, F., Kanai, S., Sugita, S., Katsumata, A., Aburatani, H., Unterman, T. G., Ezaki, O., and Ogawa, Y. (2008) 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.
 340. Wierstra, I., and Alves, J. (2007) FOXM1c and Sp1 transactivate the P1 and P2 promoters of human c-myc synergistically, *Biochemical and biophysical research communications* 352, 61-68.
 341. Wierstra, I., and Alves, J. (2006) FOXM1c transactivates the human c-myc promoter directly via the two TATA boxes P1 and P2, *The FEBS journal* 273, 4645-4667.
 342. Kim, S. H., Abbasi, F., and Reaven, G. M. (2004) Impact of degree of obesity on surrogate estimates of insulin resistance, *Diabetes care* 27, 1998-2002.
 343. Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G., and Shaw, J. (2005) The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition, *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 12, 295-300.
 344. Wolfrum, C., Howell, J. J., Ndungo, E., and Stoffel, M. (2008) Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M, *The Journal of biological chemistry* 283, 16940-16949.
 345. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell* 96, 857-868.
 346. Bellincampi, L., Simone, M. L., Motti, C., Cortese, C., Bernardini, S., Bertolini, S., and Calandra, S. (2001) Identification of an alternative transcript of ABCA1 gene in different human cell types, *Biochemical and biophysical research communications* 283, 590-597.
 347. Shimano, H. (2000) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a dominant transcription factor for gene regulation of lipogenic enzymes in the liver, *Trends in cardiovascular medicine* 10, 275-278.
 348. Sakai, J., and Rawson, R. B. (2001) The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport, *Current opinion in lipidology* 12, 261-266.

349. Tamehiro, N., Shigemoto-Mogami, Y., Kakeya, T., Okuhira, K., Suzuki, K., Sato, R., Nagao, T., and Nishimaki-Mogami, T. (2007) Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status, *The Journal of biological chemistry* 282, 21090-21099.
350. Out, R., Jessup, W., Le Goff, W., Hoekstra, M., Gelissen, I. C., Zhao, Y., Kritharides, L., Chimini, G., Kuiper, J., Chapman, M. J., Huby, T., Van Berkel, T. J., and Van Eck, M. (2008) Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1, *Circulation research* 102, 113-120.
351. Out, R., Hoekstra, M., Meurs, I., de Vos, P., Kuiper, J., Van Eck, M., and Van Berkel, T. J. (2007) Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 594-599.
352. Baldan, A., Tarr, P., Vales, C. S., Frank, J., Shimotake, T. K., Hawgood, S., and Edwards, P. A. (2006) Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis, *The Journal of biological chemistry* 281, 29401-29410.
353. Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway, *Nature* 343, 425-430.
354. Koutsodontis, G., Moustakas, A., and Kardassis, D. (2002) The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter, *Biochemistry* 41, 12771-12784.
355. Koutsodontis, G., and Kardassis, D. (2004) Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A, *Oncogene* 23, 9190-9200.
356. Schneider, I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*, *Journal of embryology and experimental morphology* 27, 353-365.
357. Out, R., Hoekstra, M., Hildebrand, R. B., Kruit, J. K., Meurs, I., Li, Z., Kuipers, F., Van Berkel, T. J., and Van Eck, M. (2006) Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2295-2300.
358. Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Yvan-Charvet, L., Welch, C., and Tall, A. R. (2006) Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2308-2315.
359. Baldan, A., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R. K., Weinstein, M. M., Frank, J., Li, A. C., Tontonoz, P., and Edwards, P. A. (2006) Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic *Ldlr*^{-/-} and *ApoE*^{-/-} mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2301-2307.
360. Curtiss, L. K. (2006) Is two out of three enough for ABCG1?, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2175-2177.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ