



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ
ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

ΜΑΝΤΖΑΡΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ
ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

ΜΑΝΤΖΑΡΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μάντζαρη Μιχαήλ : 16-11-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 603^α/24-4-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-9-2007

«Ο ρόλος των ελεύθερων λιπαρών οξέων και του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας»

ΛΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 693^α/21-9-2010

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσελέπης Αλέξανδρος	Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιάνος Επαμεινώνδας	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκλαντζούνης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεις, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-9-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



Αφιερωμένο στους γονείς μου,

*Αφιερωμένο στον παππού μου, Μιχάλη
και στη γιαγιά μου, Τασούλα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Γαλάρη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθ. Δημήτριο Γαλάρη για την έμπνευση, τις εύστοχες υποδείξεις και την ακούραστη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Τις ευχαριστίες μου απευθύνω επίσης και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη και τους Διδάκτορες Μαρία Μελίδου και Χρήστο Αμοργιαννιώτη, καθώς και την υποψήφια Διδάκτορα Χαρά Βλάχου για την συνεργασία και τις ουσιαστικές συμβουλές τους. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη Διδάκτορα Βασιλική Σκιαδά για τη στήριξη και συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Νατάσα Εμμανουιλίδου, την Κατερίνα Γεωργοπούλου, τον Γιώργο Μερμελέκα, τον Κωνσταντίνο Παπακώστα και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών για όλες τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μέσα και έξω από το εργαστήριο.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Διδάκτορα Σοφία Μπέλλου για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην περαίωση της παρούσας διατριβής.

Περισσότερο από όλους, θέλω να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου Δημοσθένη και Δέσποινα και τον αδελφό μου Στέφανο για όσα μου έχουν προσφέρει...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Παχυσαρκία και Μεταβολικό Σύνδρομο.....	9
1.2 Ήπαρ και λιπώδης ιστός. Τα δύο κύρια όργανα για τον μεταβολισμό του λίπους. 10	
1.3 Λιποτοξικότητα και Αντίσταση στην Ινσουλίνη.	12
1.4 Μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ή NAFLD).....	14
1.4.1 Η υπόθεση των « δύο χτυπημάτων ».....	15
1.5 Μεταβολισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα κύτταρα του ήπατος – Αποθήκευση σε τριγλυκερίδια και σχηματισμός σταγονιδίων λίπους (Lipid Droplets).	16
1.6 Δραστικές μορφές οξυγόνου και κατάσταση οξειδωτικού στρες των κυττάρων... 19	
1.6.1 Οξειδωτικό στρες και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα – Το πιθανό δεύτερο χτύπημα.....	22
1.7 Προγραμματισμένος κυτταρικό θάνατος – Απόπτωση και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα.....	23
1.8 Μοριακοί μηχανισμοί αποπτωτικού θανάτου.....	25
1.8.1 Ο καταρράκτης των κασπασών.....	25
1.8.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων.....	26
1.8.3 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2.....	27
1.9 Η οικογένεια των MAPK.....	30
1.9.1 c-Jun N-terminal Kinases (JNK).....	31
1.9.2 JNK και απόπτωση.....	31
1.10 «Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου».....	33
1.10.1 Ενεργοποίηση του βραχίονα PERK.....	35
1.10.2 Ενεργοποίηση του βραχίονα IRE1.....	35
1.10.3 Ενεργοποίηση του βραχίονα ATF6.....	36
1.10.4 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και Απόπτωση.....	37
1.11 Ελεύθερα λιπαρά οξέα και λιποτοξικότητα.	39
ΣΚΟΠΟΣ	41
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43

2.1	Υλικά.....	43
2.2	Καλλιέργειες κυττάρων.....	44
2.3	Μέθοδοι	46
2.3.1	<i>Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων</i>	<i>46</i>
2.3.2	<i>Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης....</i>	<i>46</i>
2.3.3	<i>Χρώση πυρήνων με Hoechst 33342</i>	<i>47</i>
2.3.4	<i>Ανίχνευση υποδιπλοειδών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής</i>	<i>48</i>
2.3.5	<i>Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση του κυτταρικού DNA.....</i>	<i>48</i>
2.3.6	<i>Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....</i>	<i>50</i>
2.3.7	<i>Ανοσοαποτύπωση κατά Western</i>	<i>52</i>
2.3.8	<i>Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis ή comet assay).....</i>	<i>53</i>
2.3.9	<i>Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.)</i>	<i>55</i>
2.3.10	<i>Σήμανση με Αννεξίνη και Ιωδιούχο προπίδιο.....</i>	<i>56</i>
2.3.11	<i>Ανίχνευση σταγονιδίων λίπους (Lipid Droplets)</i>	<i>57</i>
2.3.12	<i>Απομόνωση Τριγλυκεριδίων με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)</i>	<i>58</i>
2.3.13	<i>Στατιστική Ανάλυση.....</i>	<i>59</i>
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
3.1	Έκθεση των κυττάρων σε κορεσμένα και όχι σε ακόρεστα λιπαρά οξέα προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.	61
3.2	Έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).	65
3.3	Το στεατικό οξύ προκαλεί ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων.	67
3.4	Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν "Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου"	70
3.5	Μελέτη του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην κυτταροτοξική δράση των κορεσμένων λιπαρών οξέων.	74
3.6	Έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ προκαλεί διακοπή της σύνθεσης τριγλυκεριδίων στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.	78
3.7	Η ενεργοποίηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων με το Συνένζυμο Α αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επίδειξη κυτταροτοξικής δράσης.	81
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
4.1	Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες.....	86

4.2 Ο ρόλος των ελεύθερων λιπαρών οξέων.....	88
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	95
SUMMARY	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ACS:** Acyl-Coenzyme A synthetase
- AGPAT:** Acyl-CoA: Acyl-Glycerol Phosphate Acyltransferase
- Apaf-1:** Apoptotic-protease activating factor-1
- APS:** ammonium persulfate, υπερ-θειϊκό αμμώνιο
- ASK1:** Apoptosis Signal-regulating Kinase1
- ATF4:** Activating Transcription Factor 4
- ATF6:** Activating Transcription Factor 6
- BiP/GRP78:** Glucose Regulated Protein 78
- BSA:** Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός
- CAT:** Catalase
- CHOP:** C/EBP Homologous Protein
- DAG:** Diacylglycerol
- DFO:** Desferrioxamine mesilate
- DGAT:** Acyl-CoA: Diacylglycerol Acyltransferase
- DNL:** *De novo* Lipogenesis
- DTT:** Διθειοθρεϊτόλη
- eIF2 α :** eukaryotic translation initiation factor 2 α
- ERAD:** ER Associated protein Degradation
- ERK:** Extracellular signal-regulated kinases
- FABPs:** Fatty Acid Binding Proteins
- FADD:** Fas associated death domain
- FAT/CD36:** Fatty Acid Translocase
- FATPs:** Fatty Acid Transport Proteins
- FCS:** Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου
- GADD34:** Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 34
- GLUT4:** Glucose Transporter 4
- GPAT:** Glycerol Phosphate Acyltransferase
- GPx:** Περοξειδάση της γλουταθειόνης
- IRE1:** Inositol Requiring Enzyme 1
- JNK:** c-Jun N-terminal kinase

LIP: Labile Iron Pool
LPA: Lysophosphatidic Acid
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MKPs: MAP kinase phosphatases
MPTP: Mitochondrion Permeability Transition Pore
NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH: Non alcoholic Steatohepatitis
Nrf2: Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2
PA: Phosphatidic Acid
PAP: Phosphatidic Acid Phosphatase
PERK: PKR-like eukaryotic translation initiation factor 2a kinase
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKC: Protein kinase C
PL: Phospholipids
PP2C: Protein phosphatase 2C
PRx: Περοξειπεδοξίνη
PTPs: Protein Tyrosine Phosphatases
RIDD: Regulated IRE1-Dependent Decay
SAPK: Stress Activated Protein Kinases
SCD1: Stearoyl-CoA Desaturase 1
SODs: Superoxide Dismutase
TAG: Triacylglycerol
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAF2: TNF Receptor Associated Factor 2
UPR: Unfolded Protein Response
VLDL: Very Low Density Lipoproteins
XPB1: X-box Binding Protein 1
 Δ MO: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

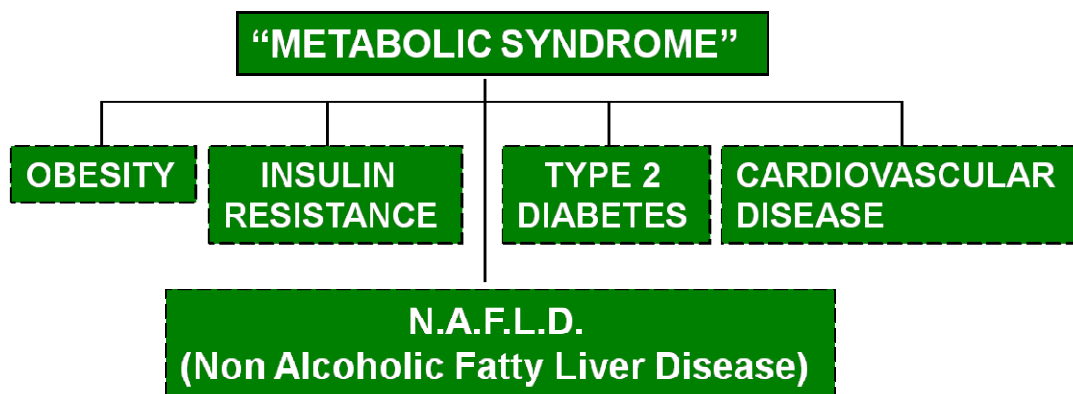
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παχυσαρκία και Μεταβολικό Σύνδρομο

“ Η λαιμαργία είναι η πηγή όλων των αδυναμιών μας και αιτία όλων των ασθενειών. Όπως ο φανός πνίγεται από την περίσσεια λαδιού και η φωτιά σβήνει από την αφθονία καυσίμου έτσι και η φυσική υγεία του σώματος καταστρέφεται από την άκρατη δίαιτα. ”

Robert Burton 1621, Συγγραφέας και Φιλόσοφος.

Οι συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες από τα πρώτα στάδια εξέλιξης των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών οδήγησαν στην εμφάνιση προσαρμοστικών μηχανισμών απαραίτητων για την επιβίωσή τους. Μία από τις σημαντικότερες στρατηγικές επιβίωσης αποτέλεσε η ικανότητα προσαρμογής σε περιόδους έλλειψης τροφής. Αυτό έγινε δυνατό με την αποθήκευση της πλεονάζουσας ενέργειας κατά τη διάρκεια «εύφορων» τροφικά διαστημάτων και, κατόπιν, με την χρησιμοποίηση αυτής της αποθήκης σε περιόδους αντίξοων συνθηκών. Αυτή η διαχείριση της ενέργειας από τους οργανισμούς απαίτησε την ανάπτυξη πολύπλοκων ομοιοστατικών μηχανισμών, οι οποίοι εξελίχθηκαν απουσία των πιέσεων που βιώνει ο σύγχρονος άνθρωπος, όπως η πληθώρα και η περίσσεια θρεπτικών συστατικών και η έλλειψη σωματικής άσκησης. Το σημερινό δυτικό μοντέλο ζωής, συνεχούς θερμιδικής κατανάλωσης χωρίς την αντίστοιχη ενεργειακή αξιοποίηση, οδήγησε στην εμφάνιση πολλαπλών μεταβολικών ασθενειών, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, ο διαβήτης τύπου II, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος. Οι ασθένειες αυτές σήμερα εντάσσονται σε ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων γνωστό ως Μεταβολικό Σύνδρομο (Despres et al., 2008; Sauerwein, 2006). Κοινή συνισταμένη όλων αυτών η ύπαρξη παχυσαρκίας και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό του αίματος (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Το Μεταβολικό Σύνδρομο. Παρά τις διαφωνίες που υπάρχουν ως προς τον ακριβή ορισμό του, ο όρος Μεταβολικό σύνδρομο περιγράφει ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων που χαρακτηρίζονται από κάποια μεταβολική διαταραχή. Κοινό χαρακτηριστικό τους στις περισσότερες περιπτώσεις, η κεντρική παχυσαρκία και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος (Chavez and Summers; Sauerwein, 2006).

Τις τελευταίες δεκαετίες τα περιστατικά παχυσαρκίας σε όλο τον κόσμο έχουν αυξηθεί δραματικά. Η παθολογική αυτή κατάσταση και οι σχετικές με αυτήν διαταραχές αποτελούν πλέον σοβαρότατη απειλή για την παγκόσμια υγεία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζεται ότι περισσότεροι από 1,6 δισεκατομμύρια ενήλικες είναι υπέρβαροι, τετρακόσια εκατομμύρια από αυτούς είναι κλινικά παχύσαρκοι και 180 εκατομμύρια είναι διαβητικοί (Chavez and Summers). Μόνο στις Η.Π.Α. σήμερα, το 30-35% του ενήλικου πληθυσμού υποφέρει από παχυσαρκία (Gentile and Pagliassotti, 2008). Επιπλέον, ιδιαίτερα ανησυχητικό φαινόμενο αποτελεί το γεγονός της κατακόρυφης αύξησης των περιστατικών και στις παιδικές ηλικίες (Ogden et al.; Rocchini, 2002).

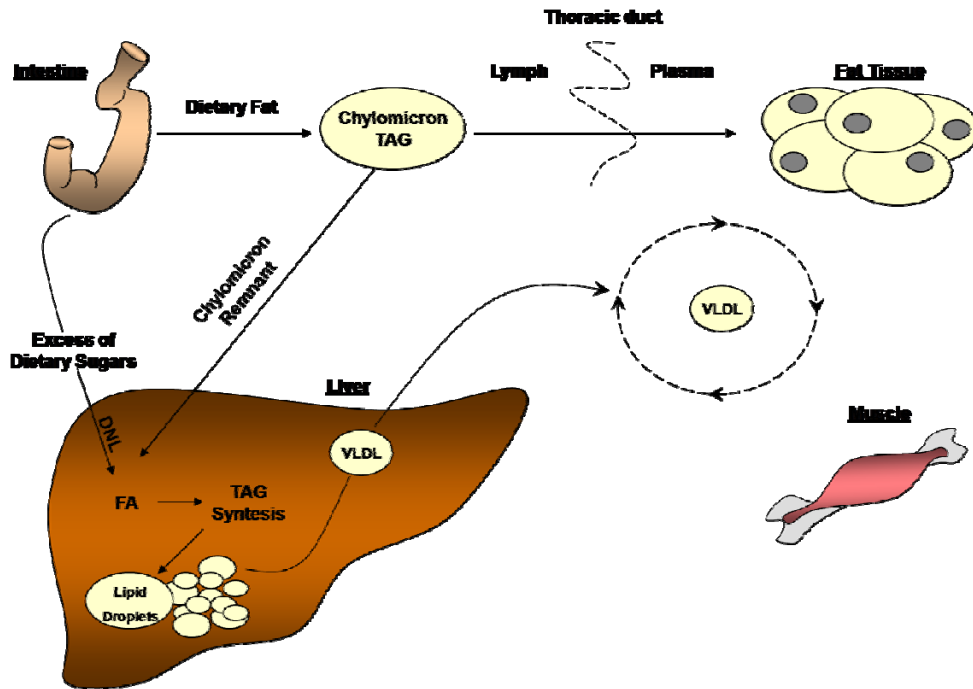
1.2 Ήπαρ και λιπώδης ιστός. Τα δύο κύρια όργανα για τον μεταβολισμό του λίπους.

Το λίπος που καταναλώνεται με την τροφή εισέρχεται στον πεπτικό σωλήνα με τη μορφή των τριγλυκεριδίων. Στο λεπτό έντερο, με τη βοήθεια παγκρεατικών λιπασών και χολικών αλάτων από το ήπαρ, τα τριγλυκερίδια διασπώνται σε 2-μονοάκυλο γλυκερόλες και λιπαρά οξέα, τα οποία απορροφώνται από τα εντεροκύτταρα. Εκεί εστεροποιούνται και πάλι σε τριακυλογλυκερόλες, σχηματίζοντας σωματίδια λιποπρωτεϊνικής φύσεως που

καλούνται χυλομικρά. Τα σωματίδια αυτά εκκρίνονται από τα εντεροκύτταρα στη λέμφο και, στο ύψος του θωρακικού πόρου, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα κυκλοφορούντα χυλομικρά στη συνέχεια, με τη βοήθεια λιπασών στα τριχοειδή αγγεία του λιπώδους ιστού και του ήπατος, αποδίδουν το λιπιδιακό τους φορτίο. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν απορροφώνται από τα λιποκύτταρα και αποθηκεύονται σε σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή και πάλι των τριακυλογλυκερολών (Mansbach and Gorelick, 2007). Ο λιπώδης ιστός αποτελεί την κύρια αποθήκη ενέργειας για τον οργανισμό και, όταν οι ανάγκες το απαιτήσουν, πραγματοποιείται απελευθέρωση αυτής της ενέργειας στη μορφή των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Εικόνα 2).

Παρά το γεγονός ότι τα λιπαρά οξέα αποτελούν τα υψηλότερα από άποψη απόδοσης ενεργειακά μόρια, το βασικό καύσιμο των κυττάρων είναι η γλυκόζη. Στην περίπτωση που η παροχή γλυκόζης ξεπερνά τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων, η οξειδωσή της στο ήπαρ παρέχει του δομικούς λίθους για την ενδογενή (*De novo lipogenesis*) σύνθεση λιπαρών οξέων. Εκεί, μαζί με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προέρχονται από την υδρόλυση του λιπώδους ιστού και τα υπολείμματα των χυλομικρών, εστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια και είτε αποθηκεύονται σε σταγονίδια λίπους (Lipid Droplets) στο κυτταρόπλασμα είτε σχηματίζουν πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) (Yen et al., 2008). Έπειτα, οι λιποπρωτεΐνες εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και καταλήγουν, κυρίως, στο λιπώδη ιστό αποδίδοντας το περιεχόμενό τους (Εικόνα 2).

Από τα παραπάνω λοιπόν, αναδεικνύεται ότι ο συστηματικός μεταβολισμός του λίπους είναι μια συνεχής διαδικασία υδρόλυσης και εστεροποίησης, στην οποία τον κύριο ρόλο διαδραματίζουν το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός. Απώτερος στόχος είναι η αποθήκευση της επιπρόσθετης ενέργειας στα εξειδικευμένα λιποκύτταρα και η απελευθέρωσή της όποτε χρειαστεί.



Εικόνα 2: Ο Συστηματικός μεταβολισμός του λίπους. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που καταλήγουν στο ήπαρ από την υδρόλυση του λιπώδους ιστού, τα υπολείμματα των χυλομικρών και το μεταβολισμό των υδαταθράκων (*de novo lipogenesis*, DNL) εστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια και σχηματίζουν πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), με σκοπό την απόδοσή τους και πάλι στον λιπώδη ιστό.

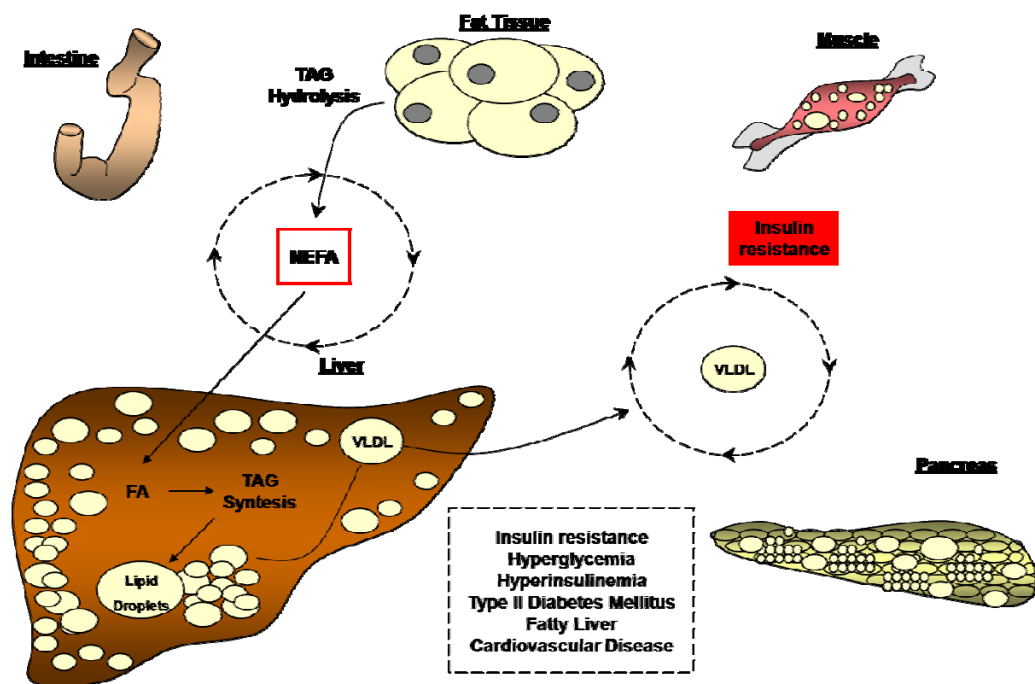
1.3 Λιποτοξικότητα και Αντίσταση στην Ινσουλίνη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο λιπώδης ιστός αποτελεί την κύρια αποθήκη ενέργειας για τον οργανισμό. Για το, λόγο αυτό, τα κύτταρά του έχουν εξειδικευτεί στην αποθήκευση μεγάλων ποσοτήτων τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμά τους, στην μορφή σταγονιδίων λίπους. Αυξημένη παροχή τροφής για μεγάλα χρονικά διαστήματα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεϊνών στο αίμα, με αποτέλεσμα την διόγκωση τόσο του λιπώδους ιστού όσο και των λιποκυττάρων προκαλώντας παχυσαρκία. Ο βασικός ρυθμός υδρόλυσης στα λιποκύτταρα είναι ανάλογος του μεγέθους του λιπώδη ιστού. Επέκταση αυτού οδηγεί σε αυξημένη λιπόλυση (Te Sligte et al., 2004). Στην κατάσταση αυτή φαίνεται ότι η εξαιρετική ικανότητα αποθήκευσης περιορίζεται και οδηγείται κάποια στιγμή σε κορεσμό, προκαλώντας απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα

(Unger et al., 1999). Το φαινόμενο μπορεί να παραλληλιστεί με την υπερχειλίση μιας δεξαμενής καυσίμων, όπου τα καύσιμα αυτά στη συνέχεια οδηγούνται με την κυκλοφορία του αίματος στα υπόλοιπα όργανα του σώματος (ήπαρ, πάγκρεας, σκελετικοί μύες). Σε αντίθεση όμως με τα κύτταρα του λιπώδους ιστού, τα υπόλοιπα όργανα εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα αποθήκευσης λίπους. Η υπέρβαση του ορίου αυτού οδηγεί σε μια κατάσταση κυτταρικής δυσλειτουργίας ή ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο, η οποία ονομάζεται «λιποτοξικότητα» (Schaffer, 2003).

Συνεκτικός κρίκος μεταξύ των διαταραχών του μεταβολικού συνδρόμου και μία από τις σημαντικότερες αιτίες επιτάχυνσης της εκδήλωσης λιποτοξικών φαινομένων στους περιφερικούς ιστούς αποτελεί η εμφάνιση του φαινομένου της αντίστασης στην ινσουλίνη (Tilg and Moschen, 2008). Η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα των περιφερικών ιστών και του ήπατος μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Κατανάλωση τροφών πλούσιων σε υδατάνθρακες οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και επακόλουθη έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη συνδέεται στους αντίστοιχους υποδοχείς των κυττάρων και ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη που οδηγεί στη μετατόπιση των κυστιδίων του υποδοχέα GLUT4 (Glucose Transporter 4), από το κυτταρόπλασμα, στην πλασματική μεμβράνη και στην πρόσληψη της γλυκόζης (Taniguchi et al., 2006).

Η ινσουλίνη είναι η κύρια αναβολική ορμόνη στο σώμα και παρουσιάζει αντιλιπολυτική δράση στο λιπώδη ιστό, αναστέλλοντας την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων μειώνοντας την ενεργότητα της Ορμονοευαίσθητης λιπάσης (Hormone-sensitive lipase) και της λιπάσης των τριγλυκεριδίων του λιπώδους ιστού (Adipose triglyceride lipase) (Duncan et al., 2007). Η αναστολή του σήματος της ινσουλίνης που προκαλείται από διάφορες αιτίες ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη (Insulin Resistance). Η αντίσταση αυτή εμποδίζει την πρόσληψη της γλυκόζης από το αίμα, οδηγώντας σε υπεργλυκαιμία, και προκαλεί την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό με επακόλουθη υπερλιπιδαιμία. Καταστάσεις μακροχρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη οδηγούν στην συνεχή απορρόφηση ελεύθερων λιπαρών οξέων από τους μη λιπώδεις ιστούς (όπως το ήπαρ και το πάγκρεας) οδηγώντας σε λιπώδη εκφύλιση των κυττάρων τους και εμφάνιση λιποτοξικότητας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αντίσταση στην ινσουλίνη και Μεταβολικό σύνδρομο. Σε συνθήκες αντίστασης στην ινσουλίνη, η συνεχής υδρόλυση που λαμβάνει χώρα στο λιπώδη ιστό οδηγεί στη συσσώρευση λίπους στα περιφερικά όργανα και στην εμφάνιση πληθώρας μεταβολικών διαταραχών.

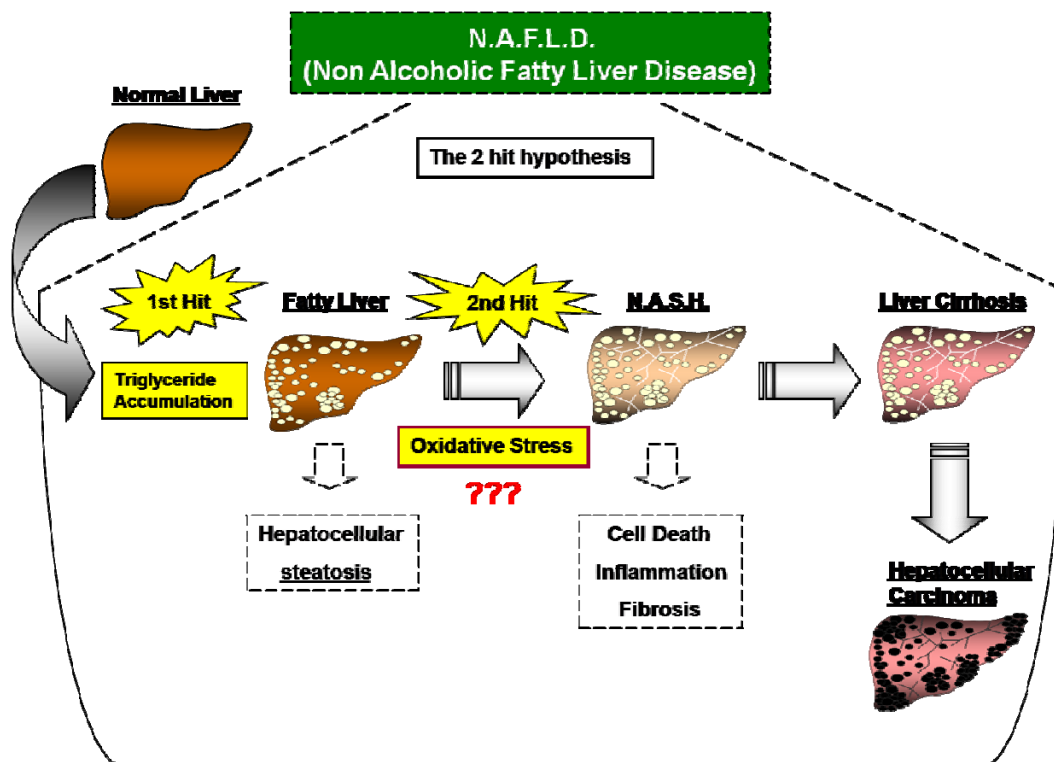
1.4 Μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ή NAFLD)

Μία από τις πιο χαρακτηριστικές περιπτώσεις λιποτοξικότητας και προέκταση του μεταβολικού συνδρόμου στο ήπαρ αποτελεί η μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος (NAFLD). Η ονομασία της ασθένειας δόθηκε αρχικά από τους Ludwig και τους συνεργάτες το 1980, στην προσπάθεια να χαρακτηρίσουν την εμφάνιση των τυπικών συμπτωμάτων της αλκοολικής λιπώδους εκφύλισης του ήπατος σε ασθενείς που παρουσίαζαν ελαχίστη κατανάλωση αλκοόλ (Ludwig et al., 1980). Αποτελεί ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων του ήπατος που κυμαίνεται από την απλή συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στα ηπατοκύτταρα (ηπατοκυτταρική στεάτωση), στην ανάπτυξη μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (Non alcoholic steatohepatitis, NASH) που με την σειρά της

μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση ακόμα και καρκινογένεση (Εικόνα 5). Η NAFLD χαρακτηρίζεται πλέον ως ένα ταχύτατα εξελισσόμενο παγκόσμιο πρόβλημα υγείας αποτελώντας την πιο κοινή ηπατική ασθένεια στις Η.Π.Α. Σύγχρονες εκτιμήσεις εμφανίζουν περίπου το 20% του γενικού πληθυσμού να πάσχει από NAFLD. Η επικράτηση της ασθένειας στον νοσηρά παχύσαρκο πληθυσμό αγγίζει το 75-92% και στις παιδικές ηλικίες το 13-14%. Υπολογίζεται, σήμερα, ότι περίπου 6 εκατομμύρια άνθρωποι στις Η.Π.Α έχουν αναπτύξει μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα και περίπου 600.000 έχουν παρουσιάσει, σχετική με αυτή, κίρρωση (Erickson, 2009; Gentile and Pagliassotti, 2008).

1.4.1 Η υπόθεση των « δύο χτυπημάτων »

Η αιτιολογία της παθογένεσης της NAFLD και η εξέλιξή της σε πιο σοβαρές κλινικά μορφές δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Το σημερινό μοντέλο εργασίας που χρησιμοποιείται για την εξέλιξη της ασθένειας περιγράφηκε από τους Day και James το 1998, με βάση την υπόθεση των « δύο χτυπημάτων » (Day and James, 1998). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, ως πρώτο χτύπημα θεωρείται η αθρόα εισροή ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Αυτή μπορεί να προκληθεί από τρεις κυρίως αιτίες. (Α) Από την παρατεταμένη υδρόλυση του λιπώδους ιστού κυρίως της κοιλιακής κοιλότητας, (Β) από τα αυξημένα επίπεδα χυλομικρών από τη διατροφή και (γ) από τα αυξημένα επίπεδα ενδογενούς σύνθεσης στα ηπατοκύτταρα (Postic and Girard, 2008). Η αύξηση της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων οδηγεί στη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας ηπατοκυτταρική στεάτωση. Το στάδιο αυτό θεωρείται καλοήθης μιας και μόνο το 3-5% των ασθενών προχωρούν στην ανάπτυξη μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH). Έχει προταθεί ότι, για την εξέλιξη της ασθένειας σε στεατοηπατίτιδα και έπειτα σε κίρρωση, απαιτείται ένα δεύτερο χτύπημα ικανό να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και ίνωση. Παρόλο που η φύση του χτυπήματος δεν είναι γνωστή, θεωρείται πως το πιθανό δεύτερο χτύπημα διαμεσολαβείται από την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στο λιπώδες ήπαρ (Εικόνα 4).



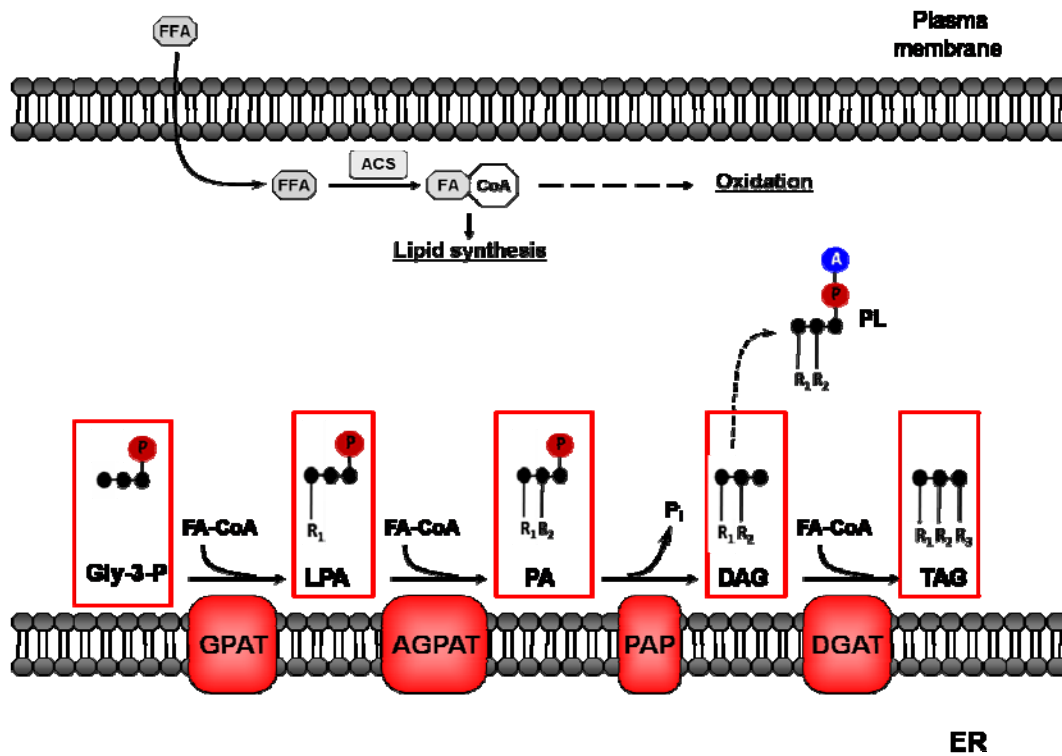
Εικόνα 4: Τα στάδια εξέλιξης της Μη-αλκοολικής Λιπώδους Εκφύλισης του Ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD). Σύμφωνα με την υπόθεση των δύο χτυπημάτων από τους Day και James, ένα δεύτερο χτύπημα στο λιπώδες ήπαρ είναι απαραίτητο για την εξέλιξη της ασθένειας σε στεατοηπατίδα (Non Alcoholic Steatohepatitis, NASH), κίρρωση ακόμα και καρκινογένεση.

1.5 Μεταβολισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα κύτταρα του ήπατος – Αποθήκευση σε τριγλυκερίδια και σχηματισμός σταγονιδίων λίπους (Lipid Droplets).

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ή αλλιώς μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα είναι αδιάλυτα σε υδατικό περιβάλλον και, για αυτό το λόγο, συνδέονται με την αλβουμίνη για την μεταφορά τους στους ιστούς. Η πρόσληψή τους από τα κύτταρα περιλαμβάνει τρόπους όπως η παθητική διάχυση καθώς και η σύνδεση με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η καβεολίνη, οι FATPs (Fatty Acid Transport Proteins), η FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase) και οι FABPs (Fatty Acid Binding Proteins) (Musso et al., 2009). Μόλις τα λιπαρά οξέα

εισέλθουν στα ηπατοκύτταρα, το πρώτο στάδιο για τον μεταβολισμό τους είναι η σύνδεσή τους με το συνέζυμο A (Coenzyme A; CoA), μέσω του ενζύμου άκυλο-συνένζυμο A συνθετάση (Acyl-CoA Synthetase; ACS) (Coleman et al., 2002). Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί τα λιπαρά οξέα, τα οποία στη συνέχεια είτε οξειδώνονται κυρίως στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας είτε χρησιμοποιούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως δομικοί λίθοι για την σύνθεση φωσφολιπιδίων, τριγλυκεριδίων και εστέρων της χοληστερόλης. Σε συνθήκες μειωμένης ζήτησης και όταν η παροχή υπερβαίνει το ρυθμό οξείδωσης, τα λιπαρά οξέα κατευθύνονται προς τη σύνθεση τριγλυκεριδίων.

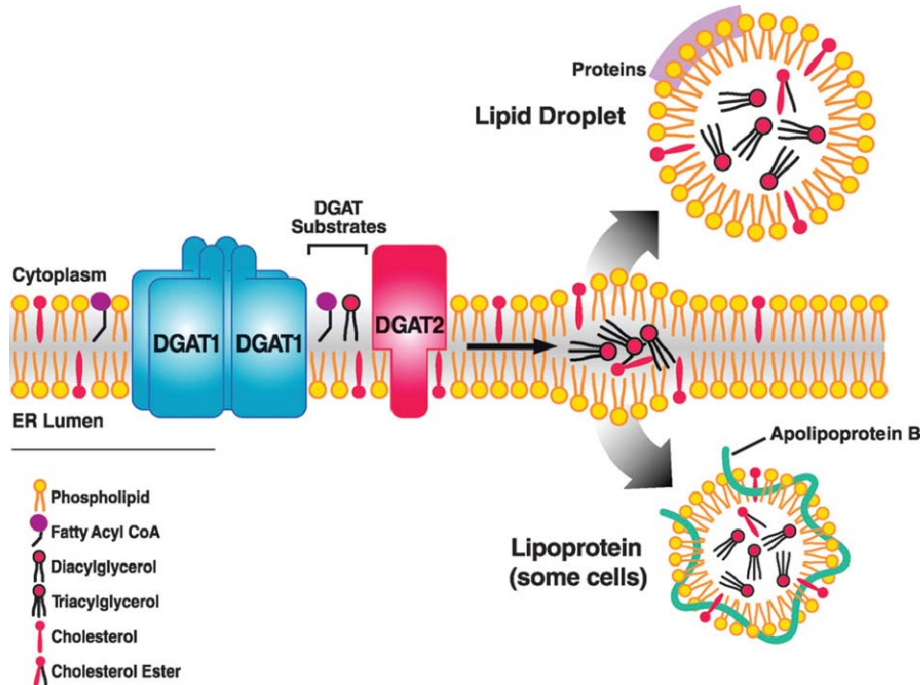
Δύο είναι τα κύρια μονοπάτια για την σύνθεση τριγλυκεριδίων στα κύτταρα και έγιναν γνωστά τις δεκαετίες του 1950 και 1960. Το μονοπάτι της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και το μονοπάτι της μονοακυλογλυκερόλης. Το δεύτερο χρησιμοποιείται ως βασικό μονοπάτι στα εντεροκύτταρα ενώ το πρώτο, αλλιώς και μονοπάτι του Kennedy, αποτελεί τη βασική οδό σύνθεσης στα περισσότερα κύτταρα καθώς και στα ηπατοκύτταρα (Yen et al., 2008). Η πορεία του Kennedy ξεκινά στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου με πρώτο βήμα την μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (η οποία παράγεται στο στάδιο της γλυκόλυσης) σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA). Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη ενός άκυλο-CoA (ενεργοποιημένο λιπαρό οξύ) από την δράση του ενζύμου GPAT. Προσθήκη ενός δεύτερου άκυλο-CoA παρουσία του ενζύμου AGPAT σχηματίζει το φωσφατιδικό οξύ (PA). Έπειτα, αποφωσφορυλίωση του φωσφατιδικού από την αντίστοιχη φωσφατάση οδηγεί στην σύνθεση της διάκυλο-γλυκερόλης (DAG). Ο σχηματισμός αυτός στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση των φωσφολιπιδίων (PL). Στο τελευταίο στάδιο, η εισαγωγή ενός τρίτου άκυλο-CoA ολοκληρώνει την σύνθεση των τριγλυκεριδίων (TAG) από την διάκυλο-γλυκερόλη με την βοήθεια του ενζύμου DGAT (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σύνθεση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα – Το μονοπάτι του Kennedy. Η 3-φωσφορική γλυκερόλη που παράγεται από την γλυκόλυση μετατρέπεται μέσω τριών εστεροποιήσεων και μιας αποφωσφορυλίωσης, σε ένα μόριο τριάκυλο-γλυκερόλης. FFA, ελεύθερα λιπαρά οξέα; ACS, συνθετάση του άκυλο-CoA; FA-CoA, λιπαρό άκυλο-CoA; Gly-3-P, 3-φωσφορική γλυκερόλη; GPAT, ακυλτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης; LPA, λυσοφωσφατιδικό οξύ; AGPAT, ακυλτρανσφεράση της άκυλο-3-φωσφορικής γλυκερόλης; PA, φωσφατιδικό οξύ; PAP, φωσφατάση του φωσφατιδικού οξέος; DAG, διάκυλο-γλυκερόλη; DGAT, ακυλτρανσφεράση της διάκυλο-γλυκερόλης; TAG, τριάκυλο-γλυκερόλη.

Στη συνέχεια, τα νεοσυντιθέμενα τριγλυκερίδια μαζί με εστέρες της χοληστερόλης αποθηκεύονται σε σταγονίδια λίπους ή στις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL). Ο ακριβής μηχανισμός δημιουργίας αυτών των σωματιδίων δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Το επικρατέστερο μοντέλο τοποθετεί τα νεοσυντιθέμενα λίπη στο εσωτερικό της διλοστοιβάδας του ενδοπλασματικού δικτύου, μεταξύ των δύο φύλλων (Kraemer et al., 2009; Yen et al., 2008). Αυτά δημιουργούν ένα σταγονίδιο το οποίο αυξάνει τις διαστάσεις του και κάποια στιγμή αποσχίζεται και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα (Lipid droplet). Στην περίπτωση των ηπατοκυττάρων το αποσχισμένο σωματίδιο μπορεί να εισέλθει στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου όπου με την

προσθήκη πρωτεϊνών και την μεταφορά του στο οργανίδιο Golgi μετατρέπεται σε λιποπρωτεΐνη (Εικόνα 6).



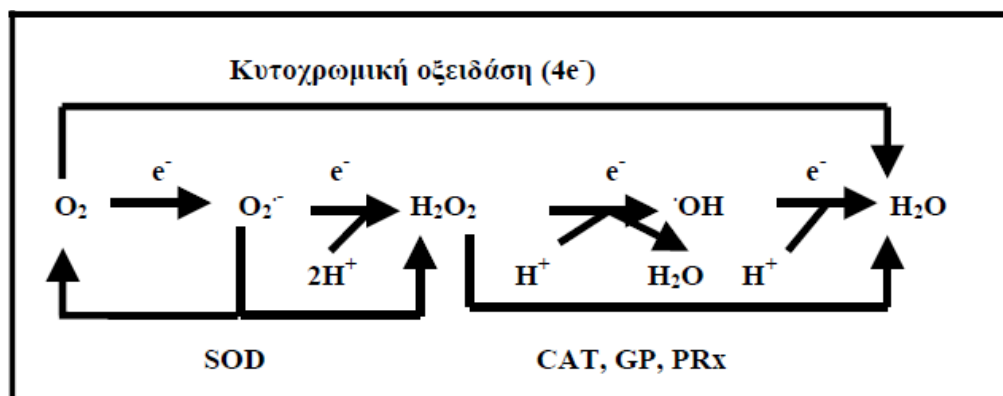
Εικόνα 6: Παραγωγή σταγονιδίων λίπους (Lipid Droplets) και λιποπρωτεϊνών. Σύμφωνα με το επικρατέστερο μοντέλο τα παραγόμενα τριγλυκερίδια και εστέρες της χοληστερόλης συγκροτούν ένα πυρήνα λίπους μεταξύ των δύο φύλων της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας. Το αυξανόμενο σωματίδιο κάποια στιγμή αποκόπτεται και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ή εισέρχεται στον αυλό για περαιτέρω τροποποίηση και μετατροπή σε λιποπρωτεΐνη (Yen et al., 2008).

1.6 Δραστικές μορφές οξυγόνου και κατάσταση οξειδωτικού στρες των κυττάρων.

Το οξυγόνο αποτέλεσε και αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες εξέλιξης της ζωής. Η ζωή όπως την ξέρουμε σήμερα, είναι αποτέλεσμα εξελικτικών διαδικασιών και προσαρμογών εκατομμυρίων ετών, που χωρίς την ύπαρξη του οξυγόνου θα ήταν σίγουρα διαφορετική και ίσως λιγότερο εξελικτικά αναπτυγμένη. Η χρησιμοποίηση του οξυγόνου από τους οργανισμούς, ως τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, έκανε εφικτή την αποδέσμευση και

ταυτόχρονα την εκμετάλλευση πολύ μεγαλύτερων ποσοτήτων ενέργειας από τον καταβολισμό των τροφών κατά την κυτταρική αναπνοή.

Παρόλα αυτά όμως, το ίδιο το οξυγόνο, στο εσωτερικό των κυττάρων, μπορεί και ανάγεται από μονά ηλεκτρόνια δίνοντας μια σειρά από παραπροϊόντα. Τα προϊόντα αυτά, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$), αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες μέσα στο περιβάλλον του κυττάρου και για αυτό το λόγο ονομάζονται και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο). Οι Δ.Μ.Ο. (Reactive Oxygen Species, ROS) σχηματίζονται συνεχώς, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα βιολογικά μακρομόρια είτε άμεσα είτε έμμεσα και να έχουν οξειδωτικές επιδράσεις σε αυτά. Έτσι κατά την αργή πορεία της εξέλιξης από τις αναερόβιες στις αερόβιες συνθήκες, το μεγαλύτερο μέρος των μορφών ζωής προσαρμόστηκε, εκφράζοντας ειδικά αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία προστατεύουν από τις τοξικές επιδράσεις του οξυγόνου (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με μονά ηλεκτρόνια σε H₂O και οι δράσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT, GP και PRx.

Τα ένζυμα δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) και οι περόξυ ρεδοξίνες (PRx) χρησιμοποιούνται ως η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις Δ.Μ.Ο. Παρά την παρουσία όμως των αμυντικών αυτών ενζύμων, κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες, οι Δ.Μ.Ο. μπορούν να διαφύγουν και να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις νεοσχηματιζόμενων ελεύθερων ριζών και αύξηση των επιπέδων τους. Όταν τα επίπεδα των προοξειδωτικών παραγόντων αυξηθούν πέρα από

τα φυσιολογικά, είτε λόγω επιτάχυνσης του ρυθμού δημιουργίας τους, είτε λόγω μείωσης της ικανότητας απομάκρυνσής τους, τότε λέμε ότι το κύτταρο εισέρχεται σε μια κατάσταση την οποία ονομάζουμε “οξειδωτικό στρες”. Στην κατάσταση αυτή η οξειδοαναγωγική ισορροπία έχει μετατοπιστεί στο εσωτερικό περιβάλλον των κυττάρων και έτσι τα κυτταρικά τους συστατικά είναι ευάλωτα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις. (Sies and Cadenas, 1985).

Η πρώτη Δ.Μ.Ο. που δημιουργείται στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το $O_2^{\cdot-}$, το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 μέσω των ενζύμων SODs. Ωστόσο, ούτε το $O_2^{\cdot-}$ ούτε το H_2O_2 είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και επομένως από μόνοι τους δεν μπορούν να οξειδώσουν, παρά μόνο ελάχιστα, μικρού μοριακού βάρους ενδοκυττάρια συστατικά. Το 1894 ο H.J.H. Fenton περιέγραψε την αντίδραση ενός μείγματος H_2O_2 με άλατα δισθενούς σιδήρου τα προϊόντα της οποίας μπορούσαν να οξειδώσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών μορίων (Fenton, 1894). Αν και είναι πιθανό να εμπλέκονται αρκετοί ενδιάμεσοι παράγοντες, η αντίδραση καταλήγει στη δημιουργία της υψηλότερα δραστικής ρίζας του υδροξυλίου ($\cdot OH$) (αντίδραση 1) :



Οι $\cdot OH$, λόγω της μεγάλης δραστικότητάς τους, δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν και αντιδρούν με οτιδήποτε βρίσκεται δίπλα τους κατά τη στιγμή της δημιουργίας τους. Μπορούν να οξειδώσουν οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό και να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA των κυττάρων, λιπιδιακή υπεροξείδωση σε λιπίδια μεμβρανών, αλλοιώσεις στην δομή πρωτεϊνών και βλάβες σε υδατάνθρακες (Chevion, 1988; Gutteridge and Halliwell, 1982; Halliwell and Aruoma, 1991; Halliwell and Gutteridge, 1990; Henle et al., 1999; Meneghini, 1997; Stohs and Bagchi, 1995). Συνθήκες έντονου και παρατεταμένου οξειδωτικού στρες μπορούν να οδηγήσουν σε μη αντιστρεπτές βλάβες των κυτταρικών συστατικών προκαλώντας κυτταρικό θάνατο είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση (Antunes and Cadenas, 2001; Chandra et al., 2000).

Μολονότι υπάρχουν και άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός, που μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση Fenton, μακροχρόνια έρευνα στο πεδίο του οξειδωτικού στρες, από την ερευνητική μας ομάδα, έχει αναγνωρίσει τον ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο ως το βασικό καταλύτη της παραπάνω αντίδρασης στα βιολογικά συστήματα. Επιπλέον, δέσμευση της ενεργής αυτής ενδοκυττάριας δεξαμενής ιόντων

σιδήρου, με ισχυρά σιδηροδεσμευτικά μέσα όπως η δεσφερριζαμίνη (DFO), προστατεύει τα κύτταρα από τις δυσμενείς συνέπειες του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Melidou et al., 2005).

1.6.1 Οξειδωτικό στρες και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα – Το πιθανό δεύτερο χτύπημα.

Σύμφωνα με την υπόθεση των δύο χτυπημάτων, για την εξέλιξη της ασθένειας σε στεατοηπατίτιδα απαιτείται ένα δεύτερο χτύπημα ικανό να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και ίνωση. Ένα τέτοιο πιθανό δεύτερο χτύπημα θεωρείται πως είναι η ανάπτυξη έντονου και μακροχρόνιου οξειδωτικού στρες στα ηπατοκύτταρα του λιπώδους ήπατος. Η δημιουργία αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδισώματα του λιπώδους ήπατος (Malhi and Gores, 2008b). Μια τέτοια κατάσταση μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη απελευθέρωση Δ.Μ.Ο. από την αναπνευστική αλυσίδα και υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα υπεροξειδισώματα, σε επίπεδα που ξεπερνούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων. Η υπόθεση αυτή βασίζεται κυρίως σε μελέτες ασθενών με στεατοηπατίτιδα, όπου ερευνήθηκαν διάφοροι μάρτυρες οξειδωτικού στρες στο πλάσμα και το ήπαρ. Σημαντική αύξηση οξειδωμένων κυτταρικών συστατικών από την εμφάνιση 3-νιτροτυροσίνης (δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης) παρατηρήθηκε σε ασθενείς τόσο με απλή στεατώση όσο και με στεατοηπατίτιδα. Στην δεύτερη περίπτωση όμως οι ασθενείς επέδειξαν υψηλότερα επίπεδα οξείδωσης (Sanyal et al., 2001). Παρομοίως, τα επίπεδα της 4-υδρόξυ-2-ενενάλης (δείκτης λιπιδιακής υπεροξείδωσης) και της 8-υδρόξυ γουανοσίνης (δείκτης οξειδωτικής βλάβης στο DNA) αυξήθηκαν προοδευτικά από ασθενείς με απλή στεατώση σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα (Seki et al., 2005). Οι ενεργές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) ή η μηλόνυλοδιαλδεΰδη, επίσης δείκτες λιπιδιακής υπεροξείδωσης, παρουσίασαν αύξηση σε ηπατικά δείγματα ασθενών με NAFLD (Madan et al., 2006; Yesilova et al., 2005). Επιπλέον, σε μια μεγάλη μελέτη 167 ασθενών, τα επίπεδα αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων λιπιδιακής υπεροξείδωσης αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Σε αυτή τη μελέτη όμως, στο πλαίσιο του φάσματος της NAFLD, δεν υπήρξε κάποια

συσχέτιση των επιπέδων των αντισωμάτων με τον βαθμό στεάτωσης ή τον βαθμό φλεγμονής (Albano et al., 2005).

Παρόλο που τα παραπάνω αποτελέσματα θέτουν το οξειδωτικό στρες ως μέρος του προβλήματος της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, εντούτοις δεν διευκρινίζουν το ρόλο του ως γενεσιουργό αιτία μιας, και η δημιουργία του θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα άλλων διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός θάνατος και η δημιουργία φλεγμονής στην στεατοηπατίτιδα.

1.7 Προγραμματισμένος κυτταρικό θάνατος – Απόπτωση και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

Η ανακάλυψη ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι μία διαδικασία η οποία ελέγχεται βιοχημικά και είναι τόσο πολύπλοκη όσο άλλες σημαντικές βιολογικές διαδικασίες έχει προκαλέσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον. Οι Wyllie και Kerr διαπίστωσαν το 1970 την ύπαρξη ενός τύπου κυτταρικού θανάτου, διακριτού από τη νέκρωση, τον οποίο ονόμασαν απόπτωση. Έτσι, ενώ η νέκρωση είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης και αποτελεί παθητική διαδικασία, η απόπτωση πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα και είναι ενεργητική διαδικασία. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη μορφολογία των νεκρωτικών κυττάρων η οποία χαρακτηρίζεται από διόγκωση, διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης και έκχυση των κυτταρικών συστατικών τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η αποπτωτική διαδικασία διακρίνεται από κυτταρική συρρίκνωση και εξωτερίκευση ενός φωσφολιπιδίου της πλασματικής μεμβράνης, της φωσφατιδυλοσερίνης, προς τον εξωκυττάριο χώρο. Επίσης, στον πυρήνα πραγματοποιείται συμπύκνωση της χρωματίνης καθώς και πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του DNA σε κλάσματα πολλαπλάσια των 180 ζευγών βάσεων. Ο κατακερματισμένος πυρήνας και τα κυτταροπλασματικά κατάλοιπα σχηματίζουν κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια, στη συνέχεια, απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995).

Ο φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης, τόσο στην ανάπτυξη του οργανισμού όσο και στην ενήλικη ζωή του, αποτελεί αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας.

Φαίνεται πως η επιλεκτική κυτταρική «αυτοκτονία» είναι ένα γεγονός κεντρικής σημασίας για τη μορφοποίηση του εμβρύου, τον τερματισμό ανοσολογικών αποκρίσεων, τον περιορισμό εξάπλωσης των μολύνσεων και γενικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας στους ιστούς (Jacobson et al., 1997; Meier et al., 2000; Vaux and Korsmeyer, 1999). Η επιβίωση ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από τη διατήρηση και την ανανέωση των κυττάρων διαφορετικών ιστών, μια διεργασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απομάκρυνσης των κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης. Απορρύθμιση της απόπτωσης δύναται να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι αυξημένα ή συσσώρευση των ανεπιθύμητων κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι ανεπαρκή. Η αυξημένη απόπτωση έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Αλτσχάϊμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Hass, 2003), ενώ, η παρεμπόδιση της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να είναι σημαντική για την ανάπτυξη όγκων και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Thompson, 1995).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στο λιπώδες ήπαρ αποτελεί μορφολογικό και παθογενετικό χαρακτηριστικό για την ανάπτυξη μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Κατά την εξέλιξη της ασθένειας η εμφάνιση ηπατοκυτταρικής στεάτωσης προηγείται της εκδήλωσης αποπτωτικού θανάτου και, για τον λόγο αυτό, ο θάνατος που προκύπτει έχει χαρακτηριστεί και ως «λιποαπόπτωση» (Unger and Orci, 2002). Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς με NASH μετά από βιοψία ηπατικών δειγμάτων (Feldstein et al., 2003; Susca et al., 2001). Το μέγεθος της ηπατοκυτταρικής απόπτωσης συσχετίζεται με την βαθμό βλάβης στο ήπαρ σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα αμινοτρασφερασών. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός απόπτωσης συσχετίζεται ιστολογικά και με την εμφάνιση φλεγμονής και ίνωσης (Feldstein et al., 2003).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί κομβικό παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό της ανθρώπινης NASH. Οι υπεύθυνοι παράγοντες για την μετάβαση από την απλή συσσώρευση λίπους στην ηπατίτιδα δεν είναι γνωστοί, αλλά η απόπτωση συσχετίζεται με την ανάπτυξή της.

1.8 Μοριακοί μηχανισμοί αποπτωτικού θανάτου.

Τα κύτταρα του ήπατος μπορούν και αποπίπτουν μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι. Το πρώτο περιλαμβάνει ερεθίσματα θανάτου, όπως οι παράγοντες Fas και TRAIL. Το δεύτερο μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαταραχές των ενδοκυττάρων οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα λυσοσωμάτια (Malhi and Gores, 2008a).

1.8.1 Ο καταρράκτης των κασπασών.

Η διαδικασία της απόπτωσης προκαλείται από μια σειρά σημάτων που ενεργοποιούνται ως απόκριση των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα σήματα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, ο οποίος αποτελεί το τελικό στάδιο της εκτέλεσης της απόπτωσης. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών με υψηλή ομολογία και είναι όλες κυστεϊνικές πρωτεάσες εξειδικευμένες να υδρολύουν πεπτίδια σε σημεία που υπάρχουν κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, ενώ περιέχουν μια συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων Gln-Ala-Cys-X-Gly (το X μπορεί να είναι R, Q ή D). Πριν την ενεργοποίησή τους βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων, τα οποία ονομάζονται προκασπάσες. Η ενεργοποίηση των προκασπασών περιλαμβάνει πρωτεολυτική σχάση στο καρβοξυτελικό άκρο συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέος. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή, που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης και μικρής υπομονάδας (Liang and Fesik, 1997).

Οι κασπάσες διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δομική τους ομολογία και τη λειτουργία τους. Στους ενεργοποιητές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10 (εναρκτήριες κασπάσες), στους εκτελεστές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -3, -6 και -7 (εκτελεστικές κασπάσες), και στους μεσολαβητές της φλεγμονής, που είναι οι κασπάσες -1, -4, -5, -11, -12, -13 και -14. Οι ενεργοποιητές της απόπτωσης φέρουν ιδιαίτερα μεγάλα τμήματα, τα οποία περιέχουν την περιοχή DED (death effector domain, DED), ή την περιοχή στρατολόγησης των κασπασών (caspase recruitment domain, CARD). Οι περιοχές DED και CARD εμπλέκονται στη ρύθμιση των κασπασών μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

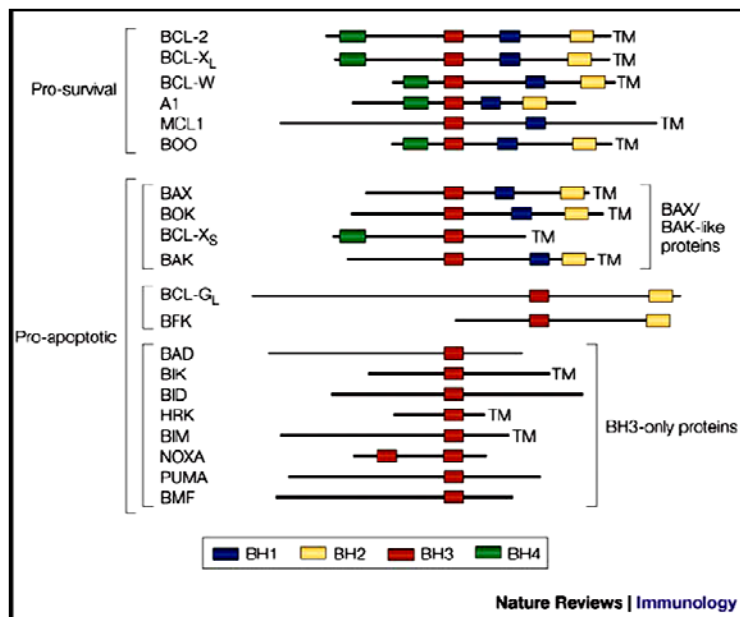
1.8.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο στο οποίο συγκλίνουν τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση αποτελώντας την κύρια οδό μέσω της οποίας ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών. Έτσι, όταν υπάρχει κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, επηρεάζονται τα μιτοχόνδρια και προκαλείται διάνοιξη πόρων διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Mitochondrion Permeability Transition Pores, MPTPs). Άμεσο αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται συνήθως απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων ($\Delta\Psi_m$), διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας, διακοπή του αερόβιου μεταβολισμού και αύξηση της συγκέντρωσης των Δ.Μ.Ο.

Επακόλουθο της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι η απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών που, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι αυστηρά περιορισμένες στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα C (cyt-C). Το κυτόχρωμα C είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III (UQH₂-αναγωγή του κυτοχρώματος C) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος C) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έχει φυσιολογικό ρόλο ανεξάρτητο από την αποπτωτική του δράση. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα C παίρνει μέρος στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου που καλείται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα Araf-1 (apoptotic-protease activating factor), από το κυτόχρωμα C και από την προκασπάση-9, ενώ ο σχηματισμός του εξαρτάται από την παρουσία ATP. Τόσο το αμινοτελικό άκρο του παράγοντα Araf-1 όσο και η προπεριοχή της προκασπάσης-9 περιέχουν τις περιοχές στρατολόγησης των κασπασών CARDs, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και έχουν σαν αποτέλεσμα την αυτοενεργοποίηση της προκασπάσης-9. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, με την σειρά της σχάζει και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές προκασπάσες -3, -6 και -7, ενώ η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να λειτουργήσει ενισχυτικά στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης του φαινομένου (Jiang and Wang, 2000).

1.8.3 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2.

Κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από αντι-αποπτωτικά μέλη που εμποδίζουν την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς και από προ-αποπτωτικά μέλη που επάγουν την διάνοιξη πόρων όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 8 (Youle and Strasser, 2008). Ο ρόλος και η δράση αυτών των πρωτεϊνών, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο κατά ποσό το κύτταρο θα επιβιώσει ή θα οδηγηθεί σε αποπτωτικό θάνατο. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 25 συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες μοιράζονται τουλάχιστον μία συντηρημένη Bcl-2 ομόλογη περιοχή (BH). Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών μπορεί να εμπεριέχουν έως και 4 συντηρημένες ομόλογες περιοχές (BH), οι οποίες χαρακτηρίζονται ως BH1, BH2, BH3 και BH4 (Cory and Adams, 2002; Youle and Strasser, 2008).



Εικόνα 8: Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Cory and Adams, 2002)

Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

Ο ρόλος των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι να συντελούν στη σταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά μεμβρανών, όπως η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και η μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου, όπου συνδέονται με τη βοήθεια του υδρόφοβου καρβοξυτελικού τους άκρου. Τα πιο αντιπροσωπευτικά αντιαποπτωτικά μέλη είναι η Bcl-2 και η Bcl-X_L (Muchmore et al., 1996; Petros et al., 2001). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, αναστέλλοντας έτσι τον ολιγομερισμό τους και την επακόλουθη διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια.

Προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

BH3- only πρωτεΐνες

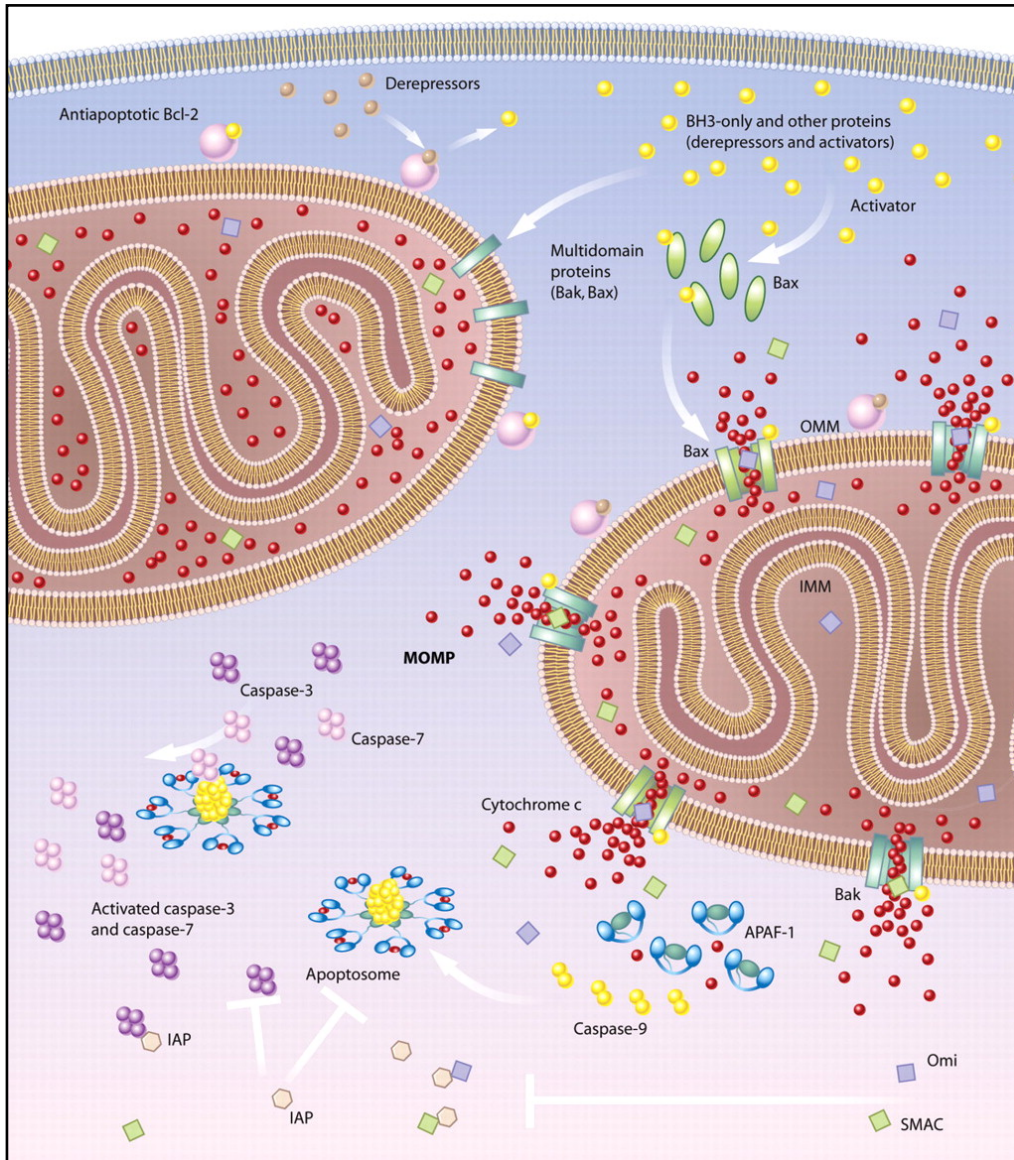
Οι BH3-only πρωτεΐνες περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 και μπορούν να εκκινήσουν την αποπτωτική διαδικασία ως απόκριση σε κάποιο ενδοκυττάριο σήμα. Παρά την προαποπτωτική τους δράση, οι BH3-only πρωτεΐνες δεν μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, όταν απουσιάζουν η Bax είτε η Bak (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001)

Bax-like πρωτεΐνες

Από τις πρωτεΐνες αυτής της υποομάδας η Bax και η Bak είναι οι πιο διαδεδομένες. Τόσο η Bax όσο και η Bak θεωρείται ότι λειτουργούν κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ αρκετό ενδιαφέρον εμφανίζει η δράση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ειδικότερα για την πρωτεΐνη Bax είναι γνωστό ότι, ενώ σε ανέπαφα κύτταρα βρίσκεται υπό την μορφή κυτταροπλασματικού μονομερούς, όταν δεχθεί κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα αλλάζει διαμόρφωση, εισέρχεται στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ολιγομερίζεται (Antonsson et al., 2001; Hsu and Youle, 1998; Mikhailov et al., 2001) και με τον τρόπο αυτό ενισχύει στη διάνοιξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης και μετατόπισης της πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, μια άποψη είναι ότι η οικογένεια των MAP κινασών, και πιο συγκεκριμένα οι κινάσες JNK και p38, φωσφορυλιώνοντας ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165) στην αμινοτελική περιοχή της Bax,

προκαλούν την ενεργοποίηση και την άμεση μετατόπιση της πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια (Kim et al., 2006). Παρόλα αυτά, αρκετές άλλες BH3-only πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τις Bax και Bak, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυττοχρώματος c, δημιουργία του αποπτωσώματος, ενεργοποίηση των κασπασών και τελικά σε αποπτωτικό θάνατο όπως απεικονίζεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Μιτοχονδριακός αποπτωτικός θάνατος.

1.9 Η οικογένεια των MAPK

Οι MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) συνθέτουν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε μονοπάτια μεταγωγής διαφόρων σημάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που οδηγούν στην απόπτωση. Οι MAPKs φωσφορυλιώνοντας ειδικά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος κ.ά (Chang and Karin, 2001). Η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων των MAPKs λειτουργεί ως διακόπτης διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη δραστηριότητα των καθοδικών πρωτεϊνών-στόχων τους. Επιπλέον, η διάρκεια και η ένταση φωσφορυλίωσης των ίδιων των MAPKs επηρεάζεται καθοριστικά από τη δράση των αντίστοιχων φωσφατασών τους.

Το μονοπάτι των MAPKs αποτελεί μέρος ενός καταρράκτη, που ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα, και περιλαμβάνει τρία διαδοχικά βήματα ενεργοποίησης (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, οι MAPKs, φωσφορυλιώνονται από τις MAP2K (Mitogen Activated Kinases Kinases), οι οποίες με την σειρά τους φωσφορυλιώνονται από τις MAP3K, που αποτελούν την τρίτη συνιστώσα του σηματοδοτικού καταρράκτη. Στα θηλαστικά, οι MAP κινάσες διαχωρίζονται σε τέσσερις βασικές υποοικογένειες ως εξής: 1) Κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα (ERK 1/2, Extracellular signal Regulated Kinases), 2) c-Jun N-terminal Kinases (JNK1, JNK2, JNK3,) 3) p38 κινάσες (p38α, p38β, p38γ και p38δ) και 4) ERK5 ή αλλιώς BMK1.

Για την πλήρη ενεργοποίηση των MAPK απαιτείται η διπλή φωσφορυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr) που χωρίζονται από ένα μόνο αμινοξύ, ορίζοντας ένα τριπεπτιδικό μοτίβο, Thr-X-Tyr. Για παράδειγμα, η JNK παρουσιάζει το μοτίβο Thr-Pro-Tyr, ενώ στην p38 παρεμβάλλεται γλυκίνη (Gly). Η ικανότητα των MAP2Ks να αναγνωρίζουν διαφορετικές MAPKs εξαρτάται εν μέρει από αυτό το τριπεπτιδικό μοτίβο, συνεισφέροντας στην εξειδίκευση των μηχανισμών με τους οποίους ενεργοποιούνται οι MAPKs (Pearson et al., 2001).

Οι MAPKs ενεργοποιούνται από πληθώρα διεγερτών. Ειδικότερα, οι κινάσες p38 και JNK, οι οποίες αναφέρονται και ως SAPKs (Stress-Activator Protein Kinases) θεωρείται ότι ανταποκρίνονται κυρίως σε στρεσογόνες καταστάσεις (Matsuzawa and Ichijo, 2005) ενώ οι ERKs ενεργοποιούνται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες. Βέβαια

αυτή η κατηγοριοποίηση φαίνεται να είναι υπεραπλουστευμένη, μιας και η δράση των MAP κινασών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και το εκάστοτε ερέθισμα (Chang and Karin, 2001).

1.9.1 c-Jun N-terminal Kinases (JNK)

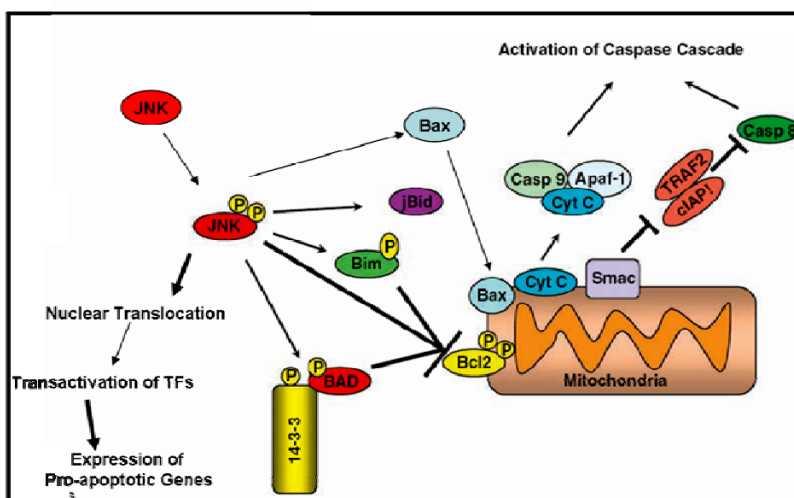
Υπάρχουν τρία μέλη στην οικογένεια των JNKs πρωτεϊνικών κινασών, η JNK1, JNK2 και η JNK3 (Johnson and Nakamura, 2007). Οι δύο πρώτες εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα και τους ιστούς σε αντίθεση με την JNK3 που ανιχνεύεται κυρίως στον εγκέφαλο και λιγότερο στην καρδιά και τους όρχεις. Ο ρόλος τους περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1991 από την ερευνητική ομάδα του Pulverer, η οποία διαπίστωσε ότι η JNK κινάση είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης c-Jun (μέρος του AP-1 μεταγραφικού παράγοντα) σε δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser-63,-73), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων (Pulverer et al., 1991). Σήμερα είναι ευρέως γνωστό ότι οι JNKs ενεργοποιούνται από διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η ιονίζουσα ακτινοβολία, το θερμικό σοκ, η αναστολή της πρωτεϊνολύσεως, η διέγερση από κυτοκίνες (π.χ TNF-α) (Guyton et al., 1996; Jordanov and Magun, 1999; Verheij et al., 1996) και θεωρείται ότι κατέχουν αποφασιστικό ρόλο, μεταξύ άλλων, και στη διαδικασία της απόπτωσης (Cano and Mahadevan, 1995; Chen and Tan, 2000; Chen et al., 1996; Sluss et al., 1994).

1.9.2 JNK και απόπτωση

Οι JNKs ενεργοποιούνται μέσω διπλής φωσφορυλίωσης από τις MKK4 και MKK7 MAP2K, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιηθούν από 14 διαφορετικές MAP3K, εκ των οποίων η πιο καλά χαρακτηρισμένη και αναγνωρισμένη για την συμμετοχή και τον ρόλο της στην απόπτωση είναι η ASK-1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1) (Matsuzawa and Ichijo, 2001; Nagai et al., 2007). Η πρώτη παρατήρηση που τεκμηρίωσε ξεκάθαρα τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζουν οι JNKs στη διαδικασία της απόπτωσης έγινε το 1996 από την ερευνητική ομάδα του Chen Y.R., η οποία έδειξε ότι η έκθεση Jurkat κυττάρων σε γ-ακτινοβολία οδήγησε στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση

της JNK1 και τελικά στην απόπτωση των κυττάρων (Chen et al., 1996). Εν συνεχεία, ακολούθησαν πολλές παρόμοιες μελέτες που επιβεβαίωναν τον ρόλο των JNKs στην απόπτωση (Verheij et al., 1996; Wilson et al., 1996; Zanke et al., 1996). Χρησιμοποιώντας τεχνικές απαλοιφής των JNK1 και JNK2 γονιδίων σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) που εκτέθηκαν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, διαπιστώθηκε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσίαζαν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στην απόπτωση (Tournier et al., 2000)

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, οι JNKs μπορούν να δράσουν μέσω δύο κατευθύνσεων χωρίς να αναιρεί η μια την άλλη. Μπορούν είτε να μετακινηθούν στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων είτε να φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών που επηρεάζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, οδηγώντας στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C, στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 10) (Bogoyevitch and Kobe, 2006; Davis, 2000; Dhanasekaran and Reddy, 2008).



Εικόνα 10: Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών αποτελούν υποστρώματα της JNK (Dhanasekaran and Reddy, 2008)

Πιο συγκεκριμένα, ως προς την δράση της JNK στο επίπεδο των μιτοχονδρίων, έχει αναφερθεί ότι η JNK μπορεί να έχει ως υποστρώματά της τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Aoki et al., 2002; Chauhan et al., 2003; Kharbanda et al., 2000; Schroeter et al., 2003). Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι η φωσφορυλίωση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL από την JNK οδηγεί σε καταστολή της

δράσης τους με αποτέλεσμα η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax να μπορεί να δρα χωρίς περιορισμό προκαλώντας τη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Deng et al., 2001; Kharbanda et al., 2000; Yamamoto et al., 1999). Αντίστοιχα, έχει αναφερθεί ότι προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως το Bim, το Bad και το jBid μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από την JNK. Οι ενεργοποιημένες αυτές προαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες μπορούν εν συνεχεία να ενισχύσουν τη δράση του Bax για την διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Donovan et al., 2002; Lei and Davis, 2003; Putcha et al., 2003).

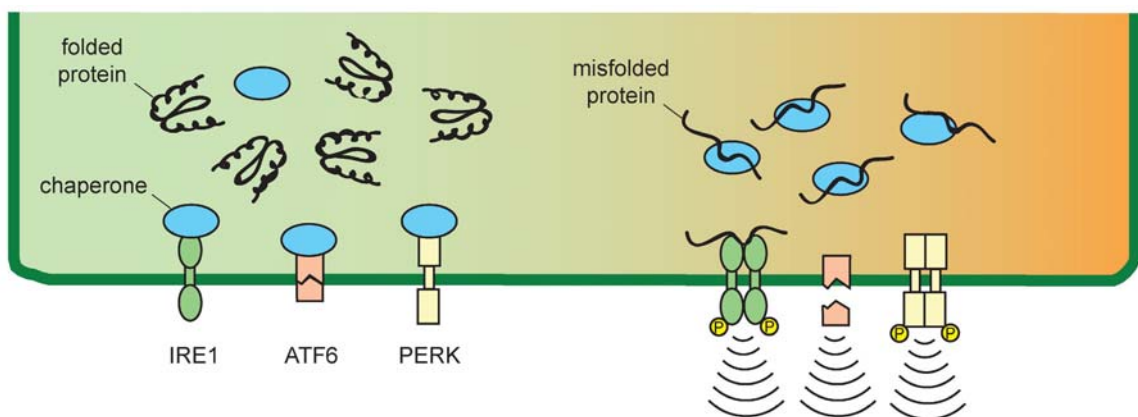
Ωστόσο, στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά, και μερικές φορές, αντιφατικά αποτελέσματα σε σχέση με τον ακριβή μηχανισμό μέσω του οποίου η JNK ενεργοποιεί την οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών, η κυρίαρχη άποψη που επικρατεί είναι ότι η JNK έχει ως βασικό της στόχο την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax. Σε μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη αποδείχθηκε ότι η JNK μπορεί να φωσφορυλιώσει άμεσα το Bax σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165), προκαλώντας την ενεργοποίησή και την άμεση μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση (Kim et al., 2006).

1.10 «Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου».

Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί ένα εξειδικευμένο μεμβρανικό δίκτυο στο εσωτερικό του κυττάρου όπου πολλαπλά μεταβολικά σήματα συγκεντρώνονται για την ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου, του μεταβολισμού των λιπιδίων και, κυρίως, της σύνθεσης των πρωτεϊνών του ενδομεμβρανικού συστήματος, της πλασματικής μεμβράνης και των προς έκκριση πρωτεϊνών. Μαζί με το οργανίδιο Golgi φροντίζει για την σωστή αναδίπλωση αυτών των πρωτεϊνών και πραγματοποιεί τη μεταφορά και την απελευθέρωσή τους. Επειδή αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των παραπάνω λειτουργιών, γίνεται κατανοητό ότι η ικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου να προσαρμόζει τη συνθετική και μεταβολική του δραστηριότητα, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες, είναι μείζονος σημασίας για τη σωστή λειτουργία και ομοιοστασία ολόκληρου του κυττάρου.

Συνθήκες κάτω από τις οποίες, η εύρυθμη λειτουργία του οργανιδίου διαταράσσεται και ιδιαίτερα επηρεάζεται η σωστή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του, οδηγούν σε μια κατάσταση γνωστή ως «Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου» (ER stress) (Ron and Walter, 2007). Σε αυτές τις συνθήκες, η

ανάγκη για επαναφορά και διατήρηση της ομοιοστασίας στο εσωτερικό του οργανιδίου οδήγησε εξελικτικά τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στην ανάπτυξη ενός εκλεπτυσμένου μηχανισμού αποκατάστασης που ονομάζεται UPR (Unfolded Protein Response). Σκοπός η διακοπή του εισερχόμενου πρωτεϊνικού φορτίου, ενίσχυση του συστήματος αναδίπλωσης και αποικοδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Ο μηχανισμός αυτός απαρτίζεται από τρεις βραχίονες επιτήρησης του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου στους οποίους επιτελικό ρόλο κατέχουν τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αντίστοιχα: 1) Η IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1), 2) η ATF6 (Activating Transcription Factor 6) και 3) η PERK (PKR-like eukaryotic translation initiation factor 2α kinase). Απουσία στρεσογόνων συνθηκών, οι αισθητήριες αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες στον αυλό του οργανιδίου με την πρωτεΐνη συνοδό BiP/GRP78 (Glucose Regulated Protein 78), σε ανενεργή κατάσταση (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002). Κύρια λειτουργία της συνοδού (chaperone) BiP είναι η αλληλεπίδρασή της με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες βοηθώντας στο μηχανισμό αναδίπλωσής τους. Συσσώρευση όμως, μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και αυξημένο πρωτεϊνικό φορτίο οδηγεί στην στρατολόγηση της BiP και απομάκρυνσή της από τους τρεις αισθητήρες. Η απομάκρυνση αυτή προκαλεί τον ολιγομερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση των IRE1 και PERK και τη μετατόπιση του ATF6 στο οργανίδιο Golgi. Τα γεγονότα αυτά ενεργοποιούν τελικά τρία πολύπλοκα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σκοπό την γρήγορη αποκατάσταση της ομοιοστασίας στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ενεργοποίηση των τριών βραχιόνων του UPR (Rutkowski and Hegde).

1.10.1 Ενεργοποίηση του βραχίονα PERK.

Η πιο άμεση απάντηση του UPR στο στρες ενδοπλασματικού δικτύου είναι η αντιστρεπτή, παροδική αναστολή της μετάφρασης των mRNAs, εμποδίζοντας την είσοδο νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων στο ήδη στρεσαρισμένο οργανίδιο. Η απόκριση αυτή πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση του βραχίονα της πρωτεϊνικής κινάσης PERK. Απομάκρυνση της πρωτεΐνης-συνοδού BiP οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση της PERK και στην ενεργοποίησή της. Η ενεργοποίηση της κινάσης οδηγεί στην φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2 α (eukaryotic translation initiation 2 α) οδηγώντας σε επιλεκτική αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης μειώνοντας το εισερχόμενο πρωτεϊνικό φορτίο στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η αναστολή αυτή είναι επιλεκτική μιας και οδηγεί παράλληλα στην εναλλακτική μετάφραση του μεταγραφικού παράγοντα ATF4 (Activating Transcription Factor 4). Ο ATF4 στη συνέχεια είναι υπεύθυνος για την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος του οργανιδίου (ERO1, Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin), του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (CHOP, C/EBP Homologous Protein) και του ανατροφοδοτικού μηχανισμού αποφωσφορυλίωσης του eIF2 α από την πρωτεΐνη Gadd34 (Gadd34, Growth Arrest and DNA damage-inducible protein 34) (Hotamisligil, 2010). Ταυτόχρονα με τον παράγοντα ATF4 η φωσφορυλίωση της PERK πυροδοτεί και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2). Οι ATF4 και Nrf2 μαζί είναι υπεύθυνοι για την ενορχήστρωση ενός αντιοξειδωτικού προγράμματος που περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων της HO-1 (Heme Oxygenase -1), της TXNRD1 (Thioredoxin Reductase 1) και διάφορων GSTPs (Glutathione S-Transferases) (Cullinan and Diehl, 2006).

1.10.2 Ενεργοποίηση του βραχίονα IRE1.

Από εξελικτικής άποψης ο πιο συντηρημένος βραχίονας του UPR, από τις ζύμες μέχρι τους ανθρώπους, είναι ο βραχίονας της κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης IRE1 (Patil and Walter, 2001). Με την ενεργότητα ενδοριβονουκλεάσης που κατέχει, η IRE1 προκαλεί εναλλακτικό μάτισμα στο mRNA του παράγοντα XBP1 (X-box binding protein-1). Αυτό οδηγεί σε ένα εναλλακτικό μήνυμα, η έκφραση του οποίου οδηγεί στην ενεργή μορφή του

μεταγραφικού παράγοντα XBP1s (spliced) (Sidrauski and Walter, 1997). Η XBP1s μόνη ή σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του βραχίονα ATF6 πυροδοτεί ένα μεταγραφικό πρόγραμμα υπεύθυνο για την παραγωγή συνοδών πρωτεϊνών (όπως η BiP) και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του ενδοπλασματικού δικτύου, στη σύνθεση φωσφολιπιδίων, στη έκκριση των πρωτεϊνών και στην αποικοδόμησή τους μέσω ERAD (ER Associated protein Degradation). Με βάση τα παραπάνω παρατηρείται ότι η XBP1s ενεργοποιεί ένα από τα κύρια μονοπάτια για την αντιμετώπιση του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Lee et al., 2003). Η XBP1 αποτελούσε το μόνο γνωστό υπόστρωμα της IRE1 μέχρι πρόσφατα, όπου αναγνωρίστηκαν και άλλα mRNAs ως στόχοι, με διαφορετικό όμως μηχανισμό. Ο μηχανισμός αυτός ονομάστηκε RIDD (Regulated IRE1-Dependent Decay) και προκαλεί την αποικοδόμηση διαφόρων mRNAs, εμποδίζοντας την μετάφρασή τους. Ο μηχανισμός RIDD αποτελεί ένα επιπλέον μέτρο για την αποσυμφόρηση του ενδοπλασματικού δικτύου (Hollien et al., 2009; Hollien and Weissman, 2006).

1.10.3 Ενεργοποίηση του βραχίονα ATF6.

Αποσύνδεση της BiP από τον ATF6 οδηγεί στην μετατόπιση του παράγοντα στο σύμπλοκο Golgi, όπου υπόκειται σε διαδοχική επεξεργασία από δύο πρωτεάσες. Τις S1P (Site 1 Protease) και S2P (Site 2 Protease) (Haze et al., 1999). Η επεξεργασία αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση της αμινοτελικής περιοχής ATF6-N, η οποία αποτελεί ενεργό πλέον μεταγραφικό παράγοντα. Σε στρεσογόνες συνθήκες για το ενδοπλασματικό δίκτυο, ο ATF6 ανάγεται και μόνο η ανηγμένη, μονομερής μορφή του μπορεί να μετατοπιστεί στο Golgi για την ενεργοποίησή του (Nadanaka et al., 2007). Στην συνέχεια ο ενεργός ATF6 μεταφέρεται στον πυρήνα και διεγείρει την έκφραση γονιδίων που φέρουν στοιχεία ERSE (ER Stress Elements), UPR (UPR Elements) και CRE (cAMP Response Elements) στους υποκινητές τους (Hotamisligil, 2010). Η διέγερση αυτή ενεργοποιεί τον μηχανισμό αποικοδόμησης ERAD και αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης EDEM (ER-degradation-enhancing α -mannosidase-like protein), απομακρύνοντας τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες από τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (Kokame et al., 2001). Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του ATF6 ρυθμίζει θετικά την έκφραση του mRNA της

XBP1 και μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη για την διέγερση συγκεκριμένων γονιδίων του UPR (Hotamisligil, 2010).

1.10.4 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και Απόπτωση.

Η ενεργοποίηση των τριών κλάδων του UPR έχει ως στόχο την επιτυχή αποσυμφόρηση του στρες ενδοπλασματικού δικτύου και την επανεγκαθίδρυση της λειτουργικής ισορροπίας στον αυλό του οργανιδίου. Μη επιτυχής αποκατάσταση της ισορροπίας λόγω έντονων και παρατεταμένων στρεσογόνων ερεθισμάτων εκτρέπει το UPR από σήμα επιβίωσης σε μηχανισμό επαγωγής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης (Rao et al., 2004). Το αποπτωτικό αυτό σήμα στα κύτταρα του ανθρώπου διέρχεται κυρίως από τα μιτοχόνδρια. Ουσιαστικά, το ενδοπλασματικό δίκτυο στην περίπτωση αυτή φαίνεται να αποτελεί το χώρο όπου αποπτωτικά σήματα δημιουργούνται και όλα μαζί ενοποιούνται στα μιτοχόνδρια, τα οποία έχουν τον ρόλο του ενισχυτή του αποπτωτικού σήματος. Τρία είναι τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια που εκκινούν από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον άνθρωπο. 1) Η μεταγραφική επαγωγή του προαποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα CHOP από το σηματοδοτικό βραχίονα της PERK, 2) η εξαρτώμενη από την IRE1, ενεργοποίηση του μονοπατιού ASK1/JNK και 3) η ρυθμιζόμενη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax/Bak (Malhotra and Kaufman, 2007).

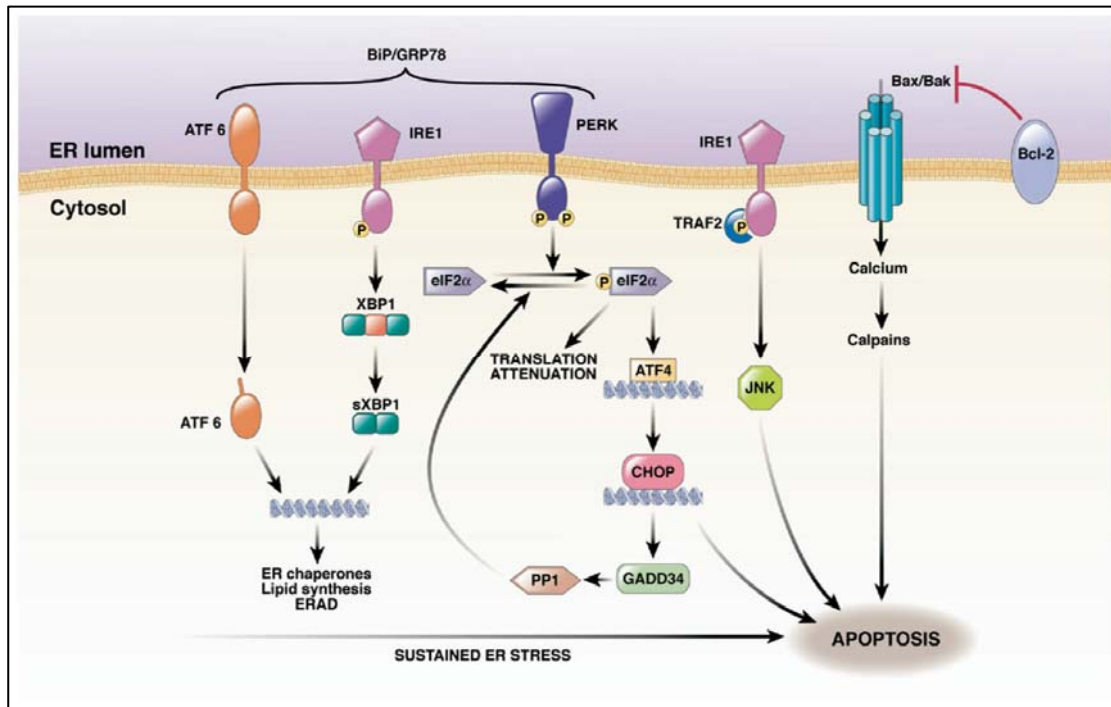
Ίσως, η πιο σημαντική συνιστώσα στην πρόκληση αποπτωτικού θανάτου από το ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι η έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι γνωστός, η CHOP διεγείρει την μεταγραφή πολλών γονιδίων που δύναται να προκαλούν απόπτωση, όπως το GADD34, ERO1, DR5 (Death Receptor 5), TRB3 και το γονίδιο της καρβονικής αφυδρογονάσης VI. Η GADD34 κωδικεύει μια υπομονάδα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2C (PP1), η οποία αυξάνει την αποφωσφορυλίωση του eIF2α με επακόλουθη αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Novoa et al., 2001). Παρατεταμένη πρωτεϊνοσύνθεση σε συνθήκες στρες ενδοπλασματικού δικτύου οδηγεί σε συνεχή και μακροχρόνια ενεργοποίηση του UPR και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον η πρωτεΐνη CHOP έχει εμπλακεί στην καταστολή της μεταγραφικής έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (McCullough et al., 2001). Πρόσφατα η ικανότητα της CHOP στην πρόκληση απόπτωσης συνδέθηκε με τη διάρκεια και την

ένταση των στρεσογόνων σημάτων. Συνεχή ερεθίσματα μικρής έντασης μπορούν να οδηγήσουν σε προσαρμογή, μέσω επιλεκτικής αποικοδόμησης του mRNA και της πρωτεΐνης CHOP, οδηγώντας στην επικράτηση πρωτεϊνών με μεγαλύτερο χρόνο ζωής και πιο ανθεκτικά mRNAs, όπως η BiP (Malhotra and Kaufman, 2007).

Ταυτόχρονα με την πρόκληση εναλλακτικού ματισματος στην XBP1, η ενεργοποίηση της IRE1 μεταφέρει σήματα και στον καταρράκτη των MAP κινασών. Η κυτταροπλασματική περιοχή της ενεργής IRE1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TRAF2 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2) και μαζί στρατολογούν την MAP3 κινάση ASK1, σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Στο σύμπλοκο αυτό η MAP3 κινάση ενεργοποιείται και οδηγεί στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της MAP κινάσης JNK (Hotamisligil, 2010). Η JNK στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με πολλούς τρόπους όπως αναφέρονται στην ενότητα 1.9.2.

Ο τρίτος τρόπος πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου εμπλέκει μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών απευθείας στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε συνθήκες στρες ενοπλασματικού δικτύου οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak βρίσκονται στην μεμβράνη του οργανιδίου και ολιγομερίζονται δημιουργώντας πόρους, ενώ η παρουσία της αντιαποπτωτικής Bcl-2 αναστέλλει το φαινόμενο. Η δημιουργία πόρων προκαλεί απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στα μιτοχόνδρια με επακόλουθη κατάρρευση του διαμεμβρανικού δυναμικού και απελευθέρωση του κυττοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Malhotra and Kaufman, 2007).

Οι κυριότερες σηματοδοτικές πορείες που πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των τριών βραχιόνων του UPR, σε σχέση με την ένταση και την χρονική διάρκεια των στρεσογόνων ερεθισμάτων απεικονίζεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Οι σηματοδοτικές πορείες του UPR (Unfolded Protein Response) σχετικά με την ένταση και την διάρκεια του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε πρώτη φάση η φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α από την πρωτεΐνη PERK προκαλεί επιλεκτική αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης ενώ η ενεργοποίηση των IRE1 και ATF6 οδηγεί στην έκφραση πρωτεϊνών συνοδών (chaperones) και στην ενεργοποίηση του συστήματος αποικοδόμησης (ERAD). Σκοπός είναι η αποσυμφόρηση του οργανιδίου. Αδυναμία επίτευξης αυτού του στόχου, πυροδοτεί την έναρξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-απόπτωσης (Malhi and Gores, 2008a).

1.11 Ελεύθερα λιπαρά οξέα και λιποτοξικότητα.

Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας, έχουν δείξει ότι διαφορετικές κατηγορίες ελεύθερων λιπαρών οξέων παρουσιάζουν εκ διαμέτρου αντίθετες επιδράσεις στα κύτταρα. Έκθεση πολλαπλών κυτταρικών σειρών σε αυξημένα επίπεδα κορεσμένου παλμιτικού οξέος (16:0), οδήγησε στην έκφραση κυτταροκινών που εμπλέκονται στη φλεγμονή, ανέστειλε το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και προκάλεσε στρες ενδοπλασματικού δικτύου οδηγώντας σε απόπτωση (Akazawa et al.; Borradaile et al., 2006; Coll et al., 2008; Li et al., 2008; Wang et al., 2006). Αντίθετα έκθεση σε μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1 cis), στις ίδιες συγκεντρώσεις, δεν οδήγησε στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων ενώ η παρουσία του

ανέστειλε την τοξική δράση του κορεσμένου (Akazawa et al.; Jung et al., 2009; Lai et al., 2008). Επίσης, ο προστατευτικός ρόλος της ενδογενούς παραγωγής μονοακόρεστων λιπαρών οξέων έγινε εμφανής σε πειράματα με φαρμακολογική ή γενετική τροποποίηση του ενζύμου SCD1 (Stearoyl-CoA Desaturase 1). Το ένζυμο αυτό προκαλεί την μετατροπή του στεατικού (18:0) και του παλμιτικού οξέος (16:0) στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ελαϊκό (18:1) και παλμιτελαϊκό οξύ (16:1) αντίστοιχα. Αναστολή του ενζύμου προκάλεσε της αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων στην τοξική δράση του παλμιτικού οξέος (Li et al., 2009).

Παρά την έντονη ερευνητική προσπάθεια τα τελευταία χρόνια, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα όσο και στην προσφερόμενη προστασία από τα μονοακόρεστα λιπαρά είναι ελάχιστα κατανοητοί. Πολλές φορές τα δεδομένα των αποτελεσμάτων και οι παρεχόμενες ερμηνείες είναι διαφορετικές και συνήθως αντικρουόμενες, οδηγώντας σε αντιφάσεις. Για παράδειγμα, έχει προταθεί πως τα κορεσμένα λιπαρά μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, προκαλώντας την παραγωγή Δ.Μ.Ο. (Listenberger et al., 2003), την παραγωγή κεραμιδίων (Lupi et al., 2002) ή την συσσώρευση κορεσμένων τριγλυκεριδίων (Moffitt et al., 2005). Από την άλλη πλευρά η προστατευτική δράση των μονοακόρεστων λιπαρών διερευνάται ως προς την άμεση ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης (Diakogiannaki et al., 2007; Morgan et al., 2008). Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι τα κομβικά σημεία στη δράση των ελεύθερων λιπαρών οξέων δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα και απομένει να αποσαφηνιστούν.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μη αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος αποτελεί ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων που κυμαίνεται από την απλή δημιουργία του λιπώδους ήπατος, στην ανάπτυξη πιο σοβαρών σταδίων όπως η στεατοηπατίτιδα, η κίρρωση, ακόμα και η καρκινογένεση. Σύμφωνα με την προτεινόμενη υπόθεση, η εξέλιξη της ασθένειας σε στεατοηπατίτιδα απαιτεί δύο χτύπηματα. Το πρώτο χτύπημα θεωρείται ότι είναι η αθρόα προσέλευση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, η οποία οδηγεί σε ηπατοκυτταρική στεάτωση. Η συσσώρευση σταγονιδίων λίπους αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας, το οποίο όμως δεν φαίνεται να είναι αρκετό να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και ίνωση. Παρόλο που το δεύτερο χτύπημα δεν είναι γνωστό, ένα πιθανό δεύτερο χτύπημα υπεύθυνο για την εξέλιξη της ασθένειας, θεωρείται ότι είναι η ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στο λιπώδες ήπαρ.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της υπόθεσης των δύο χτυπημάτων σε μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας, με σκοπό τη μελέτη του ρόλου των ελεύθερων λιπαρών οξέων και του οξειδωτικού στρες στον μηχανισμό πρόκλησης λιποτοξικότητας. Οι επιμέρους στόχοι της εργασίας ήταν :

- Να διερευνηθούν οι επιπτώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων, διαφορετικού βαθμού κορεσμού, στην βιωσιμότητα των ηπατοκυττάρων.
- Να μελετηθεί η επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην δημιουργία κυτταρικής στεάτωσης.
- Να εξεταστεί η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στον μηχανισμό πρόκλησης λιποτοξικότητας και,
- Να αναγνωριστούν και να εντοπιστούν τα κύρια μοριακά γεγονότα, υπεύθυνα για την εμφάνιση λιποτοξικών φαινομένων στα κύτταρα του ήπατος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England

Μονοκλωνικά αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού και έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθεϊκό αμμώνιο (APS), αντιδραστήριο Bio-Rad για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)

BD Biosciences Pharmigen (USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για την κασπάση-3 συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (CPP32:HRPO) (#610325), Αννεξίνη-V συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη

Boehringer Mannheim Company, Mannheim, Germany

RNAαση-A

Cell Signaling Technology, Inc. R&D System

Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της κινάσης SARK/JNK (#9252) και έναντι της φωσφορυλιωμένης της μορφής (Thr183/Tyr185, #9251). Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής του παράγοντα eIF2α (#9721).

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός από έμβρυο βοός (FBS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, PMSF, πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και πρωτεΐνάση K.

Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

Merck Company, Darmstadt, Germany

Βρωμιούχο αιθίδιο, κυανούν του τροπανίου (trypan blue) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Ιωδιούχο Προπίδιο(PI) και H₂DCFDA (C-2938)

Novartis Company, Basle, Switzerland

Δεσφεριοξαμίνη (DFO)

Roche Diagnostics Company, Mannheim, Germany

Απροτινίνη

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του κυττοχρώματος C (sc-13156), της πρωτεΐνης Bax (2D2, sc-20067), της πρωτεΐνης Bcl-2(100) (sc-509), μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της πρωτεΐνης ATF4 (sc-200) και πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της πρωτεΐνης CHOP/GADD153 (R-20, sc-793)

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)

Sigma Company, St. Louis, MO, USA

Καλλιεργητικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, λευκωματίνη ορού βοός (BSA), δωδεκυλοθειϊκό νάτριο SDS, Triton X-100, διθειοθρεϊτόλη (DTT), πεπσατίνη A, λευπεπτίνη, χρωστική Hoechst 33342, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της β-ισομορφής της ακτίνης, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της βρωμο-δεόξυ ουριδίνης (BrdU), πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Silica gel / TLC)

Για την παρασκευή διαλυμάτων, όλα τα χημικά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

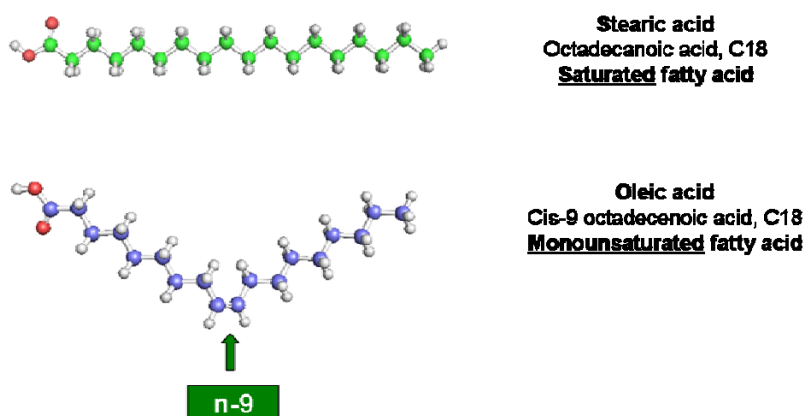
Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Ο ανθρώπινες ηπατοκυτταρικές σειρές HepG2 και Huh7 προέρχονται από κύτταρα δύο διαφορετικών ασθενών με καρκίνο του ήπατος. Τα κύτταρα στρώθηκαν σε τρυβλία και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με L-γλουταμίνη το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37 °C, επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 6.

Έκθεση των κυττάρων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα

Μετά την προσκόλλησή τους, τα κύτταρα αφέθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες για 24 ώρες πριν την έκθεσή τους σε διάλυμα ελεύθερων λιπαρών οξέων. Σε όλα τα κύρια πειράματα χρησιμοποιήθηκαν το κορεσμένο στεατικό οξύ (18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1, cis) και ο συνδυασμός τους. Και τα δύο είδη αποτελούν δύο από τα πιο πλούσια λιπαρά οξέα της δυτικής διαίτας. Το στεατικό οξύ συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις τροφές ζωικής προέλευσης και το ελαϊκό οξύ αποτελεί την κύρια λιπιδιακή συνιστώσα του ελαιολάδου. Για λόγους σύγκρισης, συμπληρωματικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (16:0) και με το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ (18:2, cis). Η δομή των δύο λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν στα περισσότερα πειράματα παρουσιάζεται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13: Τα δύο λιπαρά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Λιπαρά οξέα των 18 ατόμων άνθρακα με μόνη διαφορά έναν διπλό δεσμό στη θέση εννέα.

Φρέσκα διαλύματα των λιπαρών οξέων, αρχικής συγκέντρωσης 100 mM, παρασκευάστηκαν σε ισοπροπανόλη με θέρμανση στους 70 °C. Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις ετοιμάστηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με αλβουμίνη από ορό βοός (BSA) σύμφωνα με τον Karaskov και τους συνεργάτες του (40). Συγκεκριμένα, διάλυμα αλβουμίνης 5% (w/v) σε θρεπτικό υλικό, αφού διαπεράστηκε από φίλτρο 0,25μm, αναμίχθηκε με τα αρχικά διαλύματα λιπαρών οξέων δίνοντας συγκέντρωση 5mM λιπαρού

οξέος. Η σχέση σύνδεσης λιπαρού οξέος και αλβουμίνης ήταν 6,6 προς 1. Το διάλυμα αυτό αφέθηκε για 20 λεπτά στους 50 °C και αραιώθηκε εκ νέου σε θρεπτικό υλικό δίνοντας τις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα, η οποία δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,4% (w/v) χρωστικής σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, 1x). Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα νεκρά μπλε κύτταρα αποκλείστηκαν από την καταμέτρηση του κυτταρικού αριθμού κάθε δείγματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο αριθμός των κυττάρων κάθε δείγματος εκφράστηκε ως ποσοστό του αριθμού των κυττάρων μαρτύρων.

2.3.2 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Κύτταρα HepG2 τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm και σε συγκέντρωση 50.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη μέρα, εκτέθηκαν σε ελεύθερα λιπαρά οξέα για 24 ή 48 ώρες. Τις τελευταίες 8 ώρες προστέθηκε βρωμοδεόξυ ουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100μM. Στο τέλος της 8ωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% και η εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης πραγματοποιήθηκε με 50mM χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl). Στην συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0.1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1.5M υδροχλωρικό οξύ (HCl) με σκοπό την αποδιάταξη του DNA, ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών με PBS και κάλυψη των μη

ειδικών θέσεων για 30 λεπτά με 10% FCS. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επωάσεις πρώτα με αντίσωμα έναντι στην βρωμοδεόξυ ουριδίνη σε αραιώση 1:100 και έπειτα με αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε 5% FCS. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS. Οι πυρήνες των κυττάρων ανιχνεύτηκαν με χρώση Hoechst 33342. Περισσότερα από 300 κύτταρα ανά δείγμα καταμετρήθηκαν και τα κύτταρα θετικά σε βρωμοδεόξυ ουριδίνη εκφράστηκαν ως ποσοστό του συνολικού αριθμού.

2.3.3 Χρώση πυρήνων με Hoechst 33342

Για τη μορφολογική παρατήρηση των πυρήνων, κύτταρα HepG2 τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm και σε αριθμό 50.000 κύτταρα ανά φρεάτιο. Μετά την έκθεσή τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3,7% παραφολμαδεΰδη για 10 λεπτά. Αφού ξεπλήθηκαν, ουδετεροποιήθηκαν με 50 mM διαλύματος NH_4Cl και ακολούθησε χρώση με 0,33 mg/ml διαλύματος Hoechst 33342 για 10 λεπτά. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol και η πυρηνική μορφολογία παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με φίλτρο UV (Axiovert S 100; Zeiss). Περισσότερα από 300 κύτταρα ανά δείγμα καταμετρήθηκαν και πυρήνες με αποπτωτικά χαρακτηριστικά (συμπύκνωση και κατακερματισμός) εκφράστηκαν ως ποσοστό του συνόλου των κυττάρων.

2.3.4 Ανίχνευση υποδιπλοειδών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής

Η ανάλυση του περιεχόμενου κυτταρικού DNA μη συγχρονισμένων κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής οδηγεί στην εμφάνιση πληθυσμών που βρίσκονται σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου. Στη φάση G1 τα κύτταρα φέρουν διπλοειδές (2N) DNA και προετοιμάζονται να εισέλθουν στη φάση διπλασιασμού. Η S φάση περιλαμβάνει κύτταρα που διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό ($2N \leq S_{DNA} \leq 4N$) και στη G2 φάση τα κύτταρα φέρουν τετραπλοειδές (4N) DNA καθώς ετοιμάζονται να εισέλθουν σε διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης. Κατάλληλη επεξεργασία απομάκρυνσης των μικρότερων θραυσματοποιημένων τμημάτων DNA από αποπτωτικά κύτταρα οδηγεί στην εμφάνιση πληθυσμών με υποδιπλοειδές ($SubG1_{DNA} \leq 2N$) DNA. Η εμφάνιση υποδιπλοειδών πληθυσμών έγινε με βάση το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε από τον Darzynkiewicz και τους συνεργάτες (Darzynkiewicz et al., 1992). Αναλυτικότερα, κύτταρα HepG2 (3×10^5 /φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε ελεύθερα λιπαρά οξέα για 24 και 48 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, πλύθηκαν με PBS και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 70% αιθανόλης για 45 λεπτά στον πάγο. Αφού ξεπλύθηκαν μια φορά, επανεωρήθηκαν σε PBS για 20 λεπτά στους 37 °C για την απομάκρυνση των θραυσμάτων DNA. Στην συνέχεια ακολούθησε χρώση με Hoechst 33342 για 30 min στους 37°C και 20000 κύτταρα για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (CyFlow ML, Partec).

2.3.5 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση του κυτταρικού DNA

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των σχάσεων στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την εκχύλιση το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης και εμφανίζονται οι ζώνες του. Σε αντίθεση με το DNA των φυσιολογικών κυττάρων, που δεν μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρηση λόγω του υψηλού του μοριακού βάρους, το DNA των αποπτωτικών κυττάρων, το οποίο σχάζεται από ειδικές ενδονουκλεάσες (Enari et al., 1998), εμφανίζει μια χαρακτηριστική μορφή με ευδιάκριτες ζώνες (ladder pattern) και οι οποίες είναι τμήματα DNA πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων. Αντίθετα, στο DNA των νεκρωτικών κυττάρων προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση και κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα αυτά μετατοπίζονται στην

πηκτή και εμφανίζουν μια συνεχή ζώνη (smear). Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστεί η ενδονουκλεοσωμική σχάση, που είναι χαρακτηριστική του αποπτωτικού θανάτου, από την τυχαία σχάση στο DNA, που είναι αποτέλεσμα του νεκρωτικού θανάτου.

Απομόνωση του DNA

Μετά την επώαση τους περίπου 10^7 κύτταρα συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS (450 x g, 4°C), επαναιωρήθηκαν σε 500 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 1% SDS, 0,1% NaCl), προστέθηκε διάλυμα 0,6 mg/ml πρωτεΐνάσης K και ακολούθησε ολονύκτια πέψη στους 37° C υπό ανάδευση. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου και αναδεύτηκαν ήπια για 1 ώρα. Το γαλάκτωμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στα 16000 x g για 10 λεπτά με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση, η οποία περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα από την οργανική φάση, ενώ η ενδιάμεση στοιβάδα περιέχει τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Η αποπρωτεϊνωμένη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη. Συγκεκριμένα επώαστηκαν ολονύκτια στους -20° C με 2 όγκους ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 15 λεπτά στους 4° C και η στοιβάδα που κατακρημνίστηκε ξεπλύθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες με 70 % ψυχρής αιθανόλης για την απομάκρυνση αλάτων και μικρών οργανικών μορίων. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η στοιβάδα που περιείχε το DNA και το RNA, αφού ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Τέλος για την απομάκρυνση του RNA τα δείγματα επώαστηκαν στους 37° C για 2 ώρες με 50 μg απενεργοποιημένης RNάσης.

Ποσοτικοποίηση του DNA

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (φωτόμετρο MBA 2000, PERKIN ELMER) στην περιοχή του υπεριώδους. Τα νουκλεϊκά οξέα επιδεικνύουν μέγιστη απορρόφηση στα 260 nm, η οποία είναι περίπου ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA. Έχει οριστεί ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50 μg/ml, έχει A_{260} ίση με 1. Επιπλέον το πηλίκιο A_{260}/A_{280} είναι χαρακτηριστικό για την καθαρότητα του DNA. Υψηλής καθαρότητας DNA απαλλαγμένο από προσμίξεις

πρωτεϊνών ή έχει A_{260}/A_{280} 1,8 έως 2,1. Μικρότερο πηλίκο αντιστοιχεί σε παρασκεύασμα που περιέχει ανάλογες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, ενώ, όταν το πηλίκο είναι ~ 2 , το δείγμα περιέχει RNA.

Ηλεκτροφόρηση του DNA

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA 20 μg αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 5:1 (v/v). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.02 % μπλε της βρωμοφαινόλης και 40 % γλυκερόλη σε TBE (89 mM Tris, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 μM EDTA pH 8,0). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του DNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,4 % σε TBE, στην οποία προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE σε συνθήκες 5 Volts/cm για περίπου 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα του DNA με το βρωμιούχο αιθίδιο.

2.3.6 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα κύτταρα μετά την έκθεσή τους επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM DTT, 1mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πεψατίνης και απροτινίνης και 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ λευπεπτίνης. Μετά από επώαση στον πάγο για 30 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g στους 4° C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο, που αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό έκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Απομόνωση μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών κλασμάτων

Ο διαχωρισμός των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του (Yang et al., 1997). Τα κύτταρα κάθε δείγματος επαναιωρήθηκαν σε πενταπλάσιο όγκο ισοτονικού διαλύματος με τα μιτοχόνδρια, που περιείχε 20 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 5 mM DTT, 250 mM σουκρόζη, 1 mM PMSF και 10 μg/ml aprotinin, pepstatin και leupeptin. Διαβιάστηκαν 20 φορές μέσα από θραυσματοποιητή κυττάρων (EMBL, Mechanical Workshop), μέχρι το 60% τουλάχιστον των κυττάρων να γίνουν θετικά σε Trypan blue. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 700 x g, για 6 λεπτά στους 4° C, ώστε να απομακρυνθούν τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 10000 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Τα μιτοχόνδρια, που καταβυθίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες, ξεπλύθηκαν δύο φορές με το ίδιο ισοτονικό διάλυμα και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων, όπως αναφέρεται στην συνέχεια. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτεϊνών του υδατοδιαλυτού μέρους του κυτταροπλάσματος.

Στην συνέχεια τα μιτοχόνδρια, που απομονώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, λύθηκαν με επαναιώρηση για 15 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 % Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) και τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του της πρωτεΐνης Bax με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στο υδατοδιαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος, το υπερκείμενο των 10000 x g από την απομόνωση των μιτοχονδρίων (~0,5 ml) φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 100000 x g για 1 ώρα στους 4° C (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman). Στις συνθήκες αυτές καθιζάνουν άλλα οργανίδια του κυττάρου (όπως τα λυσοσωμάτια, τα ριβοσωμάτια, τα πολυσωμάτια αλλά και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες) και το υπερκείμενο που προέκυψε (S-100 κλάσμα) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C και της πρωτεΐνης Bax.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο “protein microassay” της Bio-Rad, που βασίζεται στη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 μl υδατικού διαλύματος από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

2.3.7 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Scheicher & Schuell), σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0.1 % σε οξικό οξύ) για ένα λεπτό και ακολούθησε πλύση με νερό. Η μεμβράνη επώαστηκε με το διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 και 0.1 % Tween 20 (PBS-T 0,1%) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες με ήπια ανακίνηση προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες, μη ειδικές θέσεις επάνω στη νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανατάραξη με αντισώματα έναντι της κάθε πρωτεΐνης, σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4° C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1%. Τέλος, η μεμβράνη επώαστηκε με αντίσωμα συζευγμένο με ραφινική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP, Jackson Immunoresearch.) για μία ώρα σε 5 % άπαχο γάλα σε PBS-T 0,1% με ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1% και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το

εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL)

Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση, παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον, οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση :



Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της κατάσταση, εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωση της σε φιλμ.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR). Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτησή του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak AL 4, X-ray fixer).

2.3.8 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis ή comet assay)

Κύτταρα HepG2 (1×10^5 / φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και αφήθηκαν να ηρεμήσουν για 24h. Αμέσως μετά την έκθεση των κυττάρων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα δείγματα επώαστηκαν παρουσία ή απουσία 200 μ M H_2O_2 για 10 λεπτά. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα

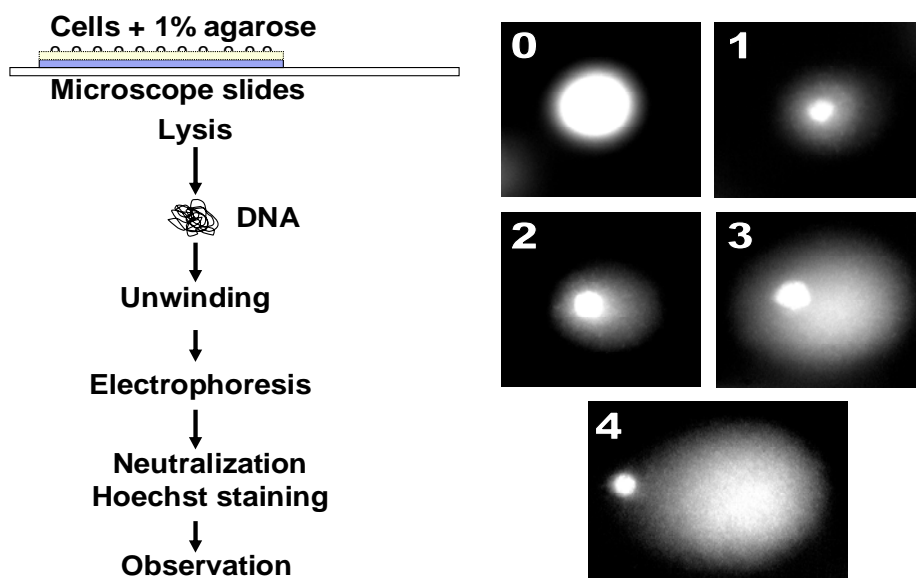
400 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και καλύφθηκε με καλυπτρίδες 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά ώστε να σχηματισθεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris σε pH 10 και 1% Triton-X100 κατά όγκο) στους 4 °C. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά, όπως οι μεμβράνες και οι πρωτεΐνες και παραμένει μόνο το πυρηνικό DNA. Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μια οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (Unwinding, 0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) για 30 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30V, 300mA) για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS, τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε μια (Panayiotidis et al., 1999). Τέλος το DNA υποβλήθηκε σε χρώση με 50 μl διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (25 μg/ml σε PBS) και παραμονή στο σκοτάδι για 10 λεπτά.

Οπτική παρατήρηση και εκτίμηση της βλάβης.

Μετά τη χρώση του DNA, οι πλάκες είναι έτοιμες για οπτική παρατήρηση και καταμέτρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400x. Η βλάβη δεν είναι ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα, βασίζεται στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Οι σχηματισμοί του πυρηνικού DNA που έχουν υποστεί βλάβη παρουσιάζουν χαρακτηριστική μορφολογία η οποία μοιάζει με την κεφαλή και την ουρά ενός κομήτη. Κάθε σχηματισμός κατατάχθηκε σε μια από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (Εικόνα 14).

Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε αθροιστικά, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών με τον αριθμό της αντίστοιχης τάξης και έκφραση της βλάβης σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA μπορεί να λάβει τιμές από 0 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 0) έως 400 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 4) (Panayiotidis et al., 1999). Η οπτική καταμέτρηση συσχετίζεται σχεδόν γραμμικά με άλλες παραμέτρους, όπως το επί τοις εκατό ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην “ουρά”, το οποίο καθορίζεται με ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση εξειδικευμένου προγράμματος (Jornot et al., 1998; Ross et al., 1995).

Single cell gel electrophoresis (comet assay)



Εικόνα 14: (A) Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνικής comet assay και (B) οπτική απεικόνιση των πέντε τάξεων, βλάβης του DNA.

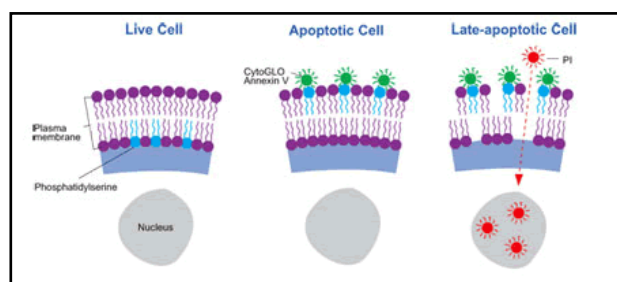
2.3.9 Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.)

Κύτταρα HepG2 και Huh7 (3×10^5 /φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε ελεύθερα λιπαρά οξέα για διάφορα χρονικά διαστήματα από 0 έως 48 ώρες. Μετά από κάθε έκθεση τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα με $0,5 \mu\text{M}$ H_2DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) (C-2938, Molecular Probes). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επανεωρήθηκαν σε διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου συγκέντρωσης $4 \mu\text{g/ml}$, για 10 λεπτά. Αφού ξεπλύθηκαν, επανεωρήθηκαν σε διάλυμα 0,1% BSA, 20mM HEPES σε PBS, προτού οδηγηθούν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (ML CyFlow, Partec). Ο φθορισμός της ουσίας DCF μετρήθηκε σε 1×10^4 κύτταρα ανά δείγμα. Η ουσία H_2DCFDA διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, υδρολύεται από μη ειδικές εστεράσες σε H_2DCF και μετά την οξείδωσή της, από Δ.Μ.Ο., μετατρέπεται στο ισχυρά

φθορίζον προϊόν DCF. Ο μέσος φθορισμός των κυττάρων κάθε δείγματος εκφράστηκε σε σχέση με το φθορισμό των κυττάρων μαρτύρων κάθε χρονικού διαστήματος.

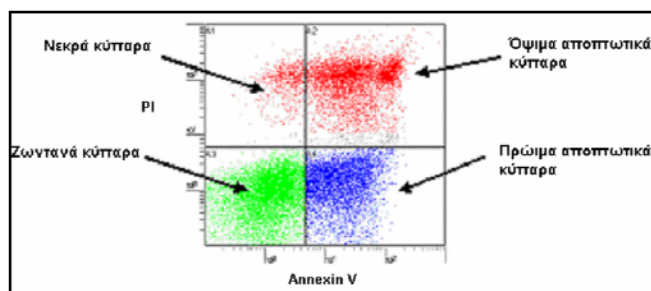
2.3.10 Σήμανση με Αννεξίνη και Ιωδιούχο προπίδιο

Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidylserine, PS) στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αντί της εσωτερικής που βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Η αννεξίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 35-36 kDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην φωσφατιδυλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση όταν η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 15). Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca^{+2} .



Εικόνα 15 : Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο.

Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη (Annexin-FITC) αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου. Λόγω του γεγονότος ότι η φωσφατιδυλοσερίνη γίνεται προσβάσιμη και στην περίπτωση της νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε και ένας δεύτερος δείκτης, το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), το οποίο δένεται πάνω σε νουκλεϊκά οξέα μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες. Ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 : Διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

Κύτταρα HepG2 (3×10^5 /φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και μετά τις αντίστοιχες επωάσεις συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν. Σε κάθε δείγμα 1×10^5 κύτταρα επανεωρήθηκαν σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (0,1 M HEPES / NaOH pH=7.4, 140 mM NaCl, 25 mM CaCl₂) και επωάστηκαν με 1.0 μg/ml Annexin-V-FITC και 4.0 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 20 min, στους 4°C, στο σκοτάδι (Vermes et al., 1995). Ακολούθησε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής (CyFlow ML, Partec).

2.3.11 Ανίχνευση σταγονιδίων λίπους (Lipid Droplets)

Ο σχηματισμός σταγονιδίων λίπους στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκε με την ισχυρά φθορίζουσα, λιπόφιλη χρωστική ερυθρό του Νείλου (Nile red), σύμφωνα με τον Gubern και τους συνεργάτες του (Gubern et al., 2008). Η απεικόνιση των σταγονιδίων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscope). Οι κατανομές του φθορισμού στους πληθυσμούς των κυττάρων κάθε δείγματος ελήφθησαν μέσω ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HepG2 (1×10^5 / φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων πάνω σε καλυπτρίδες των 11 mm, για την μικροσκοπία συνεστιασμού ή σε τρυβλία 6 φρεατίων (3×10^5 κύτταρα/ φρεάτιο) για την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Μετά το τέλος κάθε επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3,7% παραφορμαλδεΰδη για 10 λεπτά. Αφού ξεπλύθηκαν δύο φορές, τα κύτταρα επωάστηκαν σε 0,5 ml διαλύματος ερυθρού του Νείλου, συγκέντρωσης 2μg/ml. Τα δείγματα επωάστηκαν για 45 λεπτά στους 37 °C για να επέλθει ισορροπία με την χρωστική. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες

πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS. Η ανάλυση του φθορισμού 15.000 κυττάρων ανά δείγμα πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρητή ροής CyFlow ML (Partec) εξοπλισμένο με λέιζερ Αργού, στην λογαριθμική κλίμακα του καναλιού FL1. Η επεξεργασία και απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού FCS Express.

2.3.12 Απομόνωση Τριγλυκεριδίων με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Κύτταρα HepG2 (3×10^5 /φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και μετά την έκθεσή τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, συλλέχθηκαν (6 φρεάτια ανά δείγμα) και η εξαγωγή των λιπιδίων τους πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bligh-Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Συγκεκριμένα, ίδιος αριθμός κυττάρων ανά δείγμα επανεωρήθηκε σε 2,9 ml διαλύματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{ddH}_2\text{O}$ (1:1:0,9) σε γυάλινους σωλήνες. Μετά την πάροδο 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και ισχυρή ανακίνηση, το γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε, φυγοκεντρήθηκε (3×10^3 rpm για 10 λεπτά) δίνοντας τρεις διαφορετικές φάσεις. Την υπερκείμενη υδατική, την ενδιάμεση λευκή φάση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και την βαρύτερη οργανική φάση που περιείχε τα κυτταρικά λιπίδια. Η οργανική φάση αφαιρέθηκε προσεκτικά με την χρήση πιπέτας Pasteur και η διαδικασία επαναλήφθηκε για ακόμη μία φορά δίνοντας περίπου 2 ml οργανικής φάσης. Στην συνέχεια κάθε δείγμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, με την βοήθεια ροής αζώτου και το ίζημα επαδιαλυτοποιήθηκε σε 160 μl διαλύματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην αφητηρία της πλάκας TLC (Silica gel / TLC, 20 x 20 cm), με την βοήθεια τριχοειδών σωληναρίων, πραγματοποιώντας διαδοχικές εμποτίσεις των 5-10 μl , στο ίδιο σημείο της σίλικας για κάθε δείγμα. Το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε ειδικό θάλαμο κορεσμένο με τους ατμούς διαλύματος εξανίου/ διεθυλαιθέρα/οξικού οξέος (hexane/diethyl ether/acetic acid) σε αναλογία 70:30:1. Μόλις το μέτωπο του διαλύτη έφτασε στην άκρη περίπου της πλάκας, αυτή απομακρύνθηκε και τοποθετήθηκε σε θερμό θάλαμο (37°C) για 15 λεπτά. Για την εμφάνιση των λιπιδίων η πλάκα εμποτίστηκε ολόκληρη σε υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος (8% H_3PO_4 , v/v) με 10% (w/v) θειϊκό χαλκό (CuSO_4). Στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και

έπειτα πυρακτώθηκε στους 150 °C για 10 λεπτά. Οι κηλίδες των τριγλυκεριδίων αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπο δείγμα τριπαλμυτοϋλογλυκερόλης (Sigma).

2.3.13 Στατιστική Ανάλυση

Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αναλύθηκαν με ANOVA (one way analysis of variance) και επακόλουθα με post hoc Bonferroni correction test για σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων, με τη χρήση λογισμικού OriginPro 8 (OriginLab). Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με τιμή $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

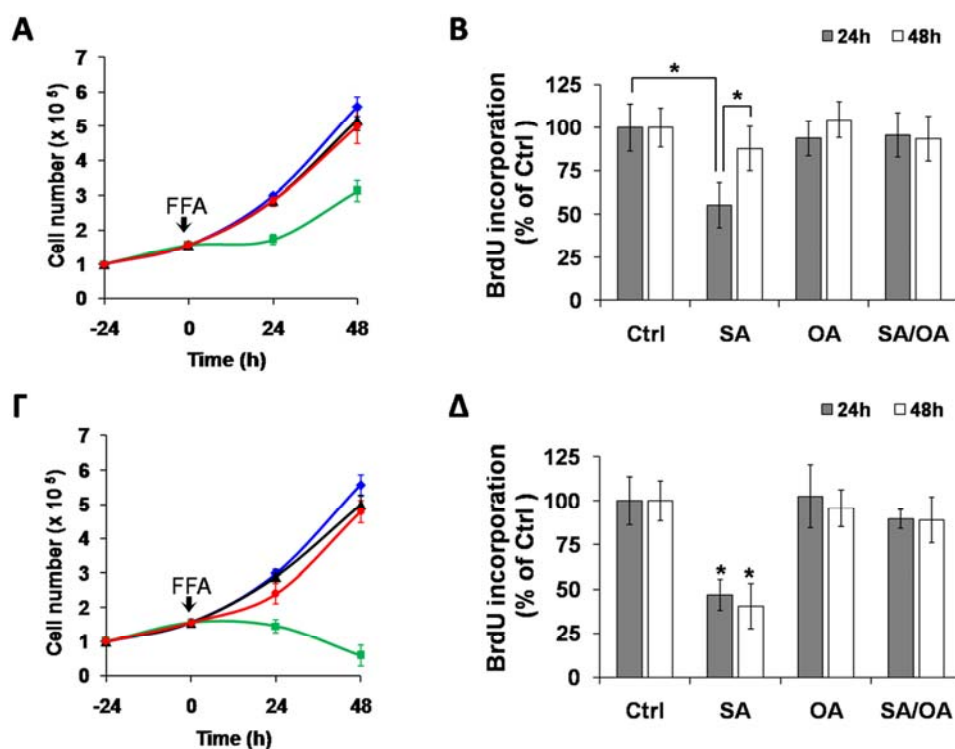
3.1 Έκθεση των κυττάρων σε κορεσμένα και όχι σε ακόρεστα λιπαρά οξέα προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

Σε συνθήκες νηστείας, οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορρό του αίματος, κυμαίνονται μεταξύ 200 και 600 μM . Σε παθολογικές συνθήκες όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου II, τα επίπεδά τους μπορούν να αυξηθούν κατακόρυφα, από 1 έως 2 mM (Mu et al., 2001). Την πλειοψηφία στον ορρό του αίματος αποτελούν κυρίως τα τρία βασικά λιπαρά οξέα των περισσοτέρων τροφών που είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παλμιτικό (16:0) και στεατικό οξύ (18:0) και το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις βρίσκονται το παλμιτελαϊκό (16:1), το λινελαϊκό (18:2), το λινελενικό (18:3) και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Σε αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση που έχουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, διαφορετικού βαθμού κορεσμού, στη βιωσιμότητα και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Έκθεση της ηπατοκυτταρικής σειράς HepG2 σε 0.3 mM κορεσμένου στεατικού οξέος (18:0), προκάλεσε μείωση του αριθμού των κυττάρων στις πρώτες 24 ώρες, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η επίδραση αυτή ήταν παροδική καθώς τα κύτταρα ανέκαμψαν μετά την πάροδο μεγαλύτερων χρονικών διαστημάτων έκθεσης (Εικόνα 17A). Αντίθετα, επώαση των κυττάρων με 0.3 mM μονοακόρεστου ελαϊκού οξέος (18:1, cis) δεν είχε κάποια επίδραση στον αριθμό τους, ενώ η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (0,3 mM έκαστο) ανέστειλε την μείωση που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του κορεσμένου στεατικού οξέος (Εικόνα 1A). Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης (BrdU), στις ίδιες συνθήκες, αποκάλυψε ότι η μείωση του αριθμού των κυττάρων στην περίπτωση του στεατικού οξέος, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 17B).

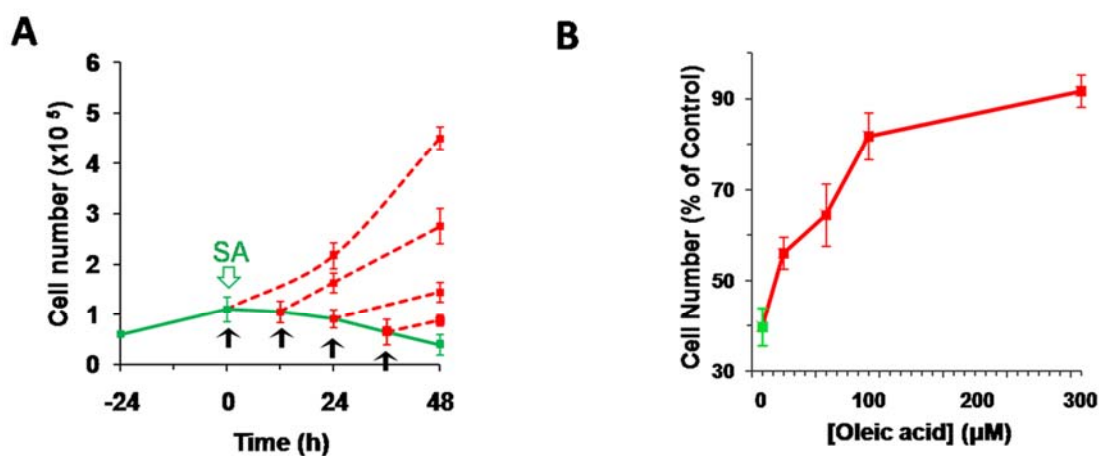
Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων. Στην περίπτωση αυτή όμως, έκθεση των κυττάρων σε 0,6 mM στεατικού οξέος προκάλεσε την εμφάνιση τοξικών φαινομένων,

οδηγώντας τα κύτταρα σε θάνατο σε διαστήματα έκθεσης μεγαλύτερα των 24 ωρών. (Εικόνες 17Γ και 17Δ). Και πάλι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ δεν είχε κάποια επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων ενώ παράλληλα, η συνεπώασή του με το κορεσμένο στεατικό επέδειξε προστατευτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, συνδυασμός των δύο λιπαρών στα 0,6 mM έκαστο (συνολική συγκέντρωση 1,2 mM) προστάτευσε πλήρως τα κύτταρα από την κυτταροτοξική δράση του στεατικού οξέος.



Εικόνα 17: Το κορεσμένο στεατικό οξύ προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η παρουσία ελαϊκού οξέος αναστέλλει την κυτταροτοξική του δράση. (A) Κύτταρα HepG2 (1.0×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (-◆-), στεατικό οξύ (-■-), ελαϊκό οξύ (-▲-) ή στον συνδυασμό τους (-●-), σε συγκέντρωση 300 μ M το καθένα. Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε με την μέθοδο αποκλεισμού του κυανού του τροπανίου. (B) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε λιπαρά οξέα όπως στο (A), αλλά τις τελευταίες 8 ώρες της έκθεσης χορηγήθηκαν 100 μ M βρωμοδεόξυ ουριδίνης (BrdU). Η ενσωμάτωση της BrdU στο DNA των κυττάρων ανιχνεύτηκε με εξειδικευμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό ενσωμάτωσης σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες ($P < 0.05$). (Γ και Δ) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε λιπαρά οξέα όπως στο (A) και το (B) αντίστοιχα, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 600 μ M για κάθε λιπαρό οξύ.

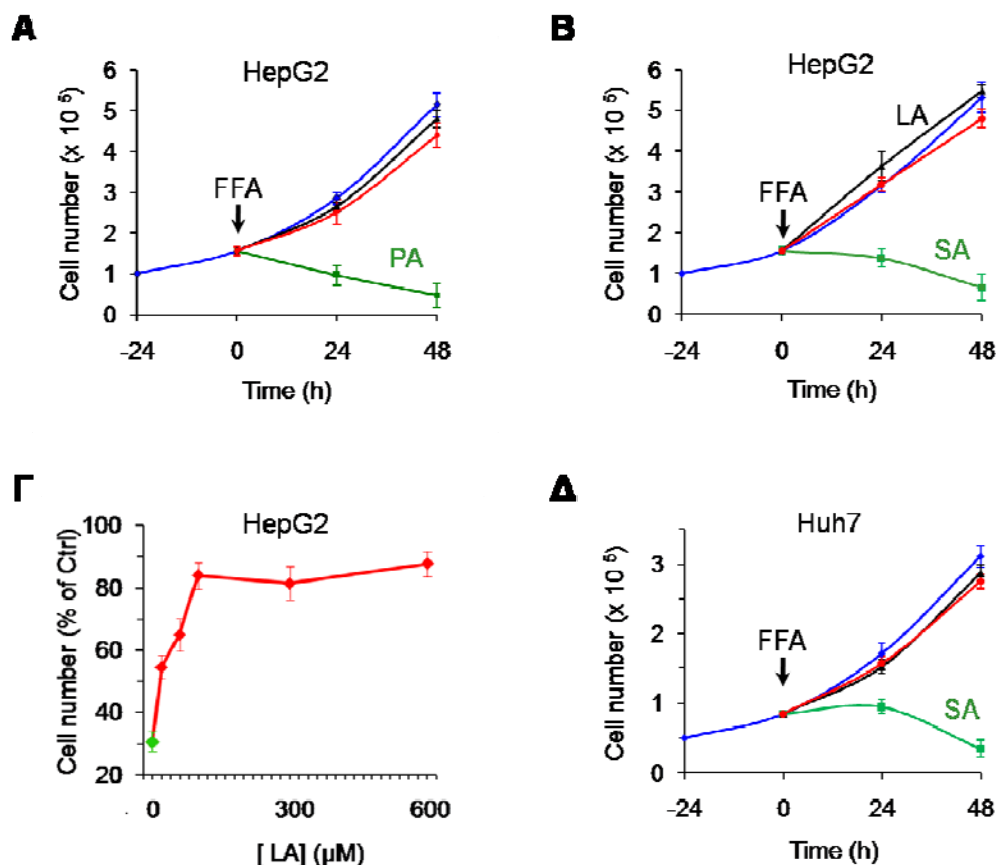
Για να μελετήσουμε περαιτέρω τη δράση του ελαϊκού οξέος πραγματοποιήσαμε χρονο- και δοσο-εξαρτώμενα πειράματα. Η παρεχόμενη προστασία του ελαϊκού οξέος ήταν εμφανής ακόμα και όταν χορηγήθηκε 12, 24 ή και 36 ώρες μετά την προσθήκη του κορεσμένου στεατικού (Εικόνα 18Α), καθώς επίσης και σε αναλογίες συγκέντρωσης, μικρότερες του 1:1 (OA:SA). Όπως φαίνεται στην εικόνα 18Β, σημαντική προστατευτική δράση παρατηρήθηκε, ήδη από την αναλογία 1:30, επιδεικνύοντας μέγιστη προστασία σε αναλογία 1:2.



Εικόνα 18: Η προστατευτική ικανότητα του μονοακόρεστου ελαϊκού οξέος . (Α) Κύτταρα HepG2 (1.0×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 600μM στεατικού οξέος (SA). Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε με την μέθοδο αποκλεισμού του κυανού του τροπανίου (συνεχόμενη πράσινη καμπύλη). Ελαϊκό οξύ (600 μM) προστέθηκε 0, 12, 24 ή 36 ώρες μετά την έκθεση σε στεατικό οξύ (μαύρα βέλη) και ο αριθμός των κυττάρων καταμετρήθηκε (διακεκομμένες κόκκινες καμπύλες). **(Β)** Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε στεατικό οξύ (600μM), απουσία (πράσινο χρώμα) ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ελαϊκού οξέος (0, 20, 60, 100 και 300 μM). Μετά από 48 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε.

Για να μελετήσουμε αν οι διαφορές αυτές, μεταξύ κορεσμένων και ακορεστων λιπαρών οξέων αποτελούν γενικότερο φαινόμενο, επαναλάβουμε ενδεικτικά πειράματα χρησιμοποιώντας το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (Εικόνα 19Α), το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ (Εικόνες 19Β και 19 Γ) και την ανθρώπινη ηπατοκυτταρική σειρά Huh7 (Εικόνα 19Δ). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, η τοξικότητα των κορεσμένων λιπαρών

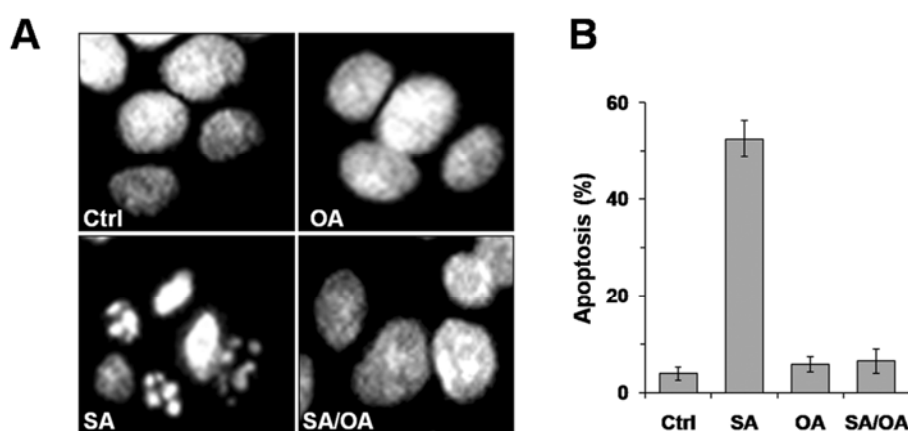
αποτελεί γενικότερο φαινόμενο, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά δεν οδηγούν στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων. Αντίθετα ταυτόχρονη χορήγηση ακόρεστων λιπαρών οξέων αναστέλει πλήρως την τοξική δράση των κορεσμένων.



Εικόνα 19: Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα προστατεύουν τα κύτταρα από την τοξική επίδραση των κορεσμένων. (Α) Κύτταρα HepG2 (1.0×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (-♦-), παλμιτικό οξύ (-■-, PA), ελαϊκό οξύ (-▲-) ή στον συνδυασμό τους (-●-), σε συγκέντρωση 600 μM το καθένα. Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε με την μέθοδο αποκλεισμού του κυανού του τροπανίου. **(Β)** Τα κύτταρα εκτέθηκαν με στεατικό (-■-, SA) και λινελαϊκό οξύ (-▲-, LA) στη θέση του παλμιτικού και ελαϊκού οξέος αντίστοιχα, όπως στο (Α). **(Γ)** Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε στεατικό οξύ (600 μM), απουσία (πράσινο χρώμα) ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων λινελαϊκού οξέος (0, 20, 60, 100, 300 και 600 μM). Μετά από 48 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε. **(Δ)** Κύτταρα Huh7 (0.5×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (-♦-), στεατικό οξύ (-■-, SA), ελαϊκό οξύ (-▲-) ή στον συνδυασμό τους (-●-), σε συγκέντρωση 600 μM το καθένα. Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε με την μέθοδο αποκλεισμού του κυανού του τροπανίου.

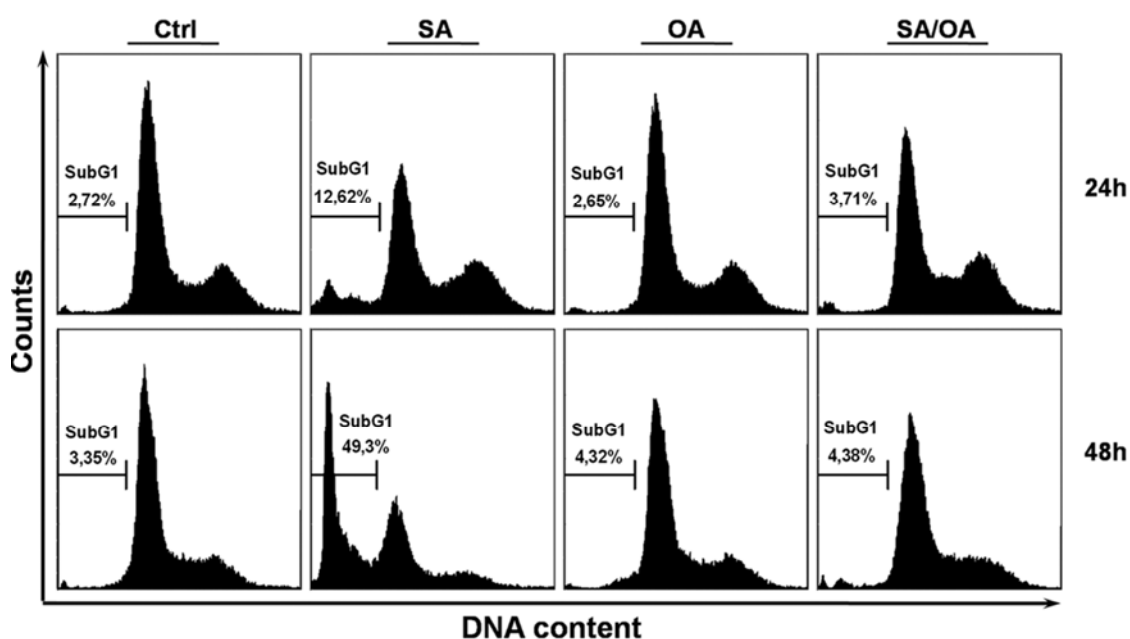
3.2 Έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).

Παρατεταμένη έκθεση σε 0,6 mM κορεσμένου λιπαρού οξέος προκάλεσε το θάνατο των κυττάρων. Για να ερευνησουμε το μηχανισμό και το είδος του κυτταρικού θανάτου μελετήσαμε συγκεκριμένους αποπτωτικούς δείκτες. Ένα από τα χαρακτηριστικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που τον διαχωρίζει από την νέκρωση είναι η συμύκνωση και ο κατακερματισμός του πυρηνικού DNA. Ο κατακερματισμός αυτός είναι αποτέλεσμα ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων σε πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20A, επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με στεατικό οξύ, προκάλεσε την συμύκνωση και τον κατακερματισμό της χρωματίνης. Περίπου το 55% των κυττάρων παρουσίασαν μορφολογικά χαρακτηριστικά αποπτωτικού θανάτου, ενώ ταυτόχρονη έκθεση με το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ ανέστειλε πλήρως την εμφάνιση των χαρακτηριστικών αυτών (Εικόνα 20B).



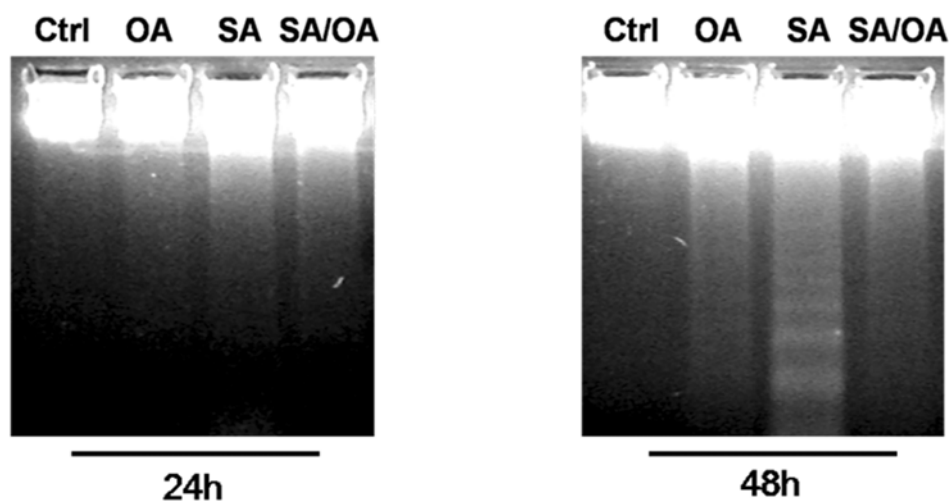
Εικόνα 20: Το κορεσμένο στεατικό οξύ προκαλεί συμύκνωση και κατακερματισμό της χρωματίνης. (A) Κύτταρα HepG2 (5×10^4) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων σε καλυπτρίδες 11 mm και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό τους (SA/OA), σε συγκέντρωση 600 μ M το καθένα. Μετά από 48 ώρες έκθεσης, πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων με Hoechst 33342 και η μορφολογία τους παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού. (B) Περισσότερα από 300 κύτταρα ανά δείγμα καταμετρήθηκαν και πυρήνες με αποπτωτικά χαρακτηριστικά (συμύκνωση και κατακερματισμός) εκφράστηκαν ως ποσοστό του συνόλου.

Κατάλληλη επεξεργασία απόρριψης των θραυσμάτων DNA από τον πυρήνα αποπτωτικών κυττάρων και επακόλουθη χρώση του γενετικού υλικού, εμφανίζει υποδιπλοειδείς (SubG1) πληθυσμούς κατά την ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής. Σχηματισμός τέτοιων πληθυσμών παρατηρήθηκε ήδη από τις 24 ώρες έκθεσης σε στεατικό οξύ, αποτελώντας περίπου το 50% των κυττάρων μετά από 48 ώρες (Εικόνα 21). Ταυτόχρονη χορήγηση ελαϊκού οξέος εμπόδισε την εμφάνιση τέτοιων πληθυσμών.



Εικόνα 21: Το κορεσμένο στεατικό οξύ οδηγεί στην εμφάνιση υποδιπλοειδών πληθυσμών. Κύτταρα HepG2 (3×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό τους (SA/OA), σε συγκέντρωση 600 μM το καθένα. Μετά από 24 και 48 ώρες έκθεσης, η εμφάνιση υποδιπλοειδών πληθυσμών ανιχνεύτηκε με κυτταρομετρία ροής όπως αναφέρεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ». Σε κάθε δείγμα καταμετρήθηκαν 2×10^4 κύτταρα. Η περιοχή SubG1 επιδεικνύει το ποσοστό των κυττάρων με υποδιπλοειδές περιεχόμενο DNA.

Ηλεκτροφόρηση των κατακεραματισμένων τμημάτων του γενετικού υλικού σε πηκτική αгарόζης, οδηγεί στην εμφάνιση ενός μοτίβου που θυμίζει κλίμακα (DNA laddering). Η χαρακτηριστική αυτή εικόνα έγινε εμφανής μετά από 48 ώρες έκθεσης σε στεατικό οξύ, ενώ και πάλι η προσθήκη του ελαϊκού οξέος ανέστειλε πλήρως αυτή την δημιουργία ενδοноклеωσωμικών σχάσεων στο πυρηνικό DNA (Εικόνα 22).



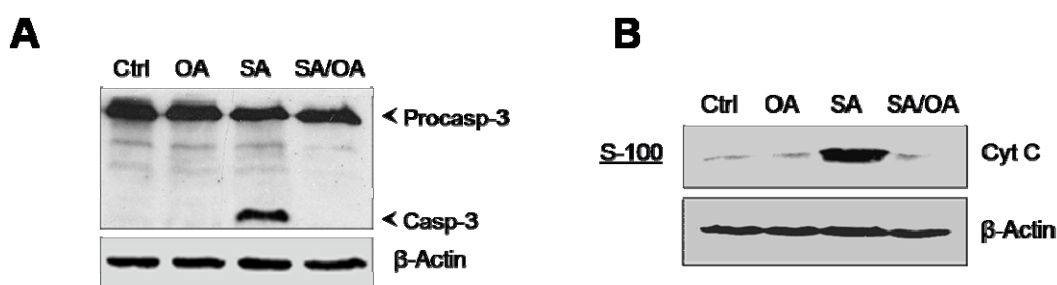
Εικόνα 22: Το κορεσμένο στεατικό οξύ οδηγεί στην εμφάνιση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων. Κύτταρα HepG2 ($1,5 \times 10^6$) στρώθηκαν σε τρυβλία 10 cm² και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό τους (SA/OA), σε συγκέντρωση 600 μ M το καθένα. Μετά από 24 και 48 ώρες έκθεσης, το DNA των κυττάρων απομονώθηκε και τη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε σε 1,4% πηκτή αγαρόζης όπως πειγράφεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ».

3.3 Το στεατικό οξύ προκαλεί ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων.

Για τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων, κατά την διαδικασία της απόπτωσης, απαραίτητη είναι η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Ένα από τα πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας των κασπασών είναι η εκτελεστική κασπάση-3, η οποία ενεργοποιεί ενδονουκλεάσες που με τη σειρά τους προκαλούν νουκλεοσωμικές σχάσεις. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23A, το κορεσμένο λιπαρό οξύ προκάλεσε σχάση της προκασπάσης-3 και ενεργοποίησή της. Αντίθετα το ελαϊκό οξύ δεν είχε κάποια επίδραση από μόνο του ενώ ταυτόχρονη προσθήκη των δύο λιπαρών οξέων οδήγησε σε πλήρη αναστολή της σχάσης της προκασπάσης-3.

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C (cyt-C) από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Εκεί μαζί με τον παράγοντα Araf-1 και την προκασπάση-9 σχηματίζει το αποπτώσωμα, το

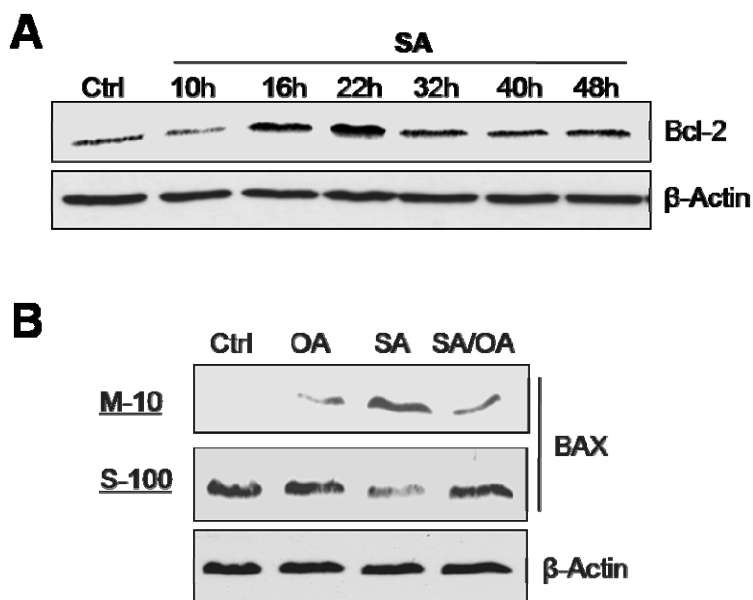
οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης-9. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η απελευθέρωση του cyt-C στο κυτταρόπλασμα μετά την έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ. Πράγματι επώαση για 48 ώρες προκάλεσε την εμφάνιση του cyt-C στο κυτταροπλασματικό εκχύλισμα ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση ελαϊκού οξέος ανέστειλε καθολικά την απελευθέρωση αυτή (Εικόνα 23B). Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την εμπλοκή των μιτοχονδρίων στο μηχανισμό πρόκλησης αποπτωτικού θανάτου από το κορεσμένο στεατικό οξύ.



Εικόνα 23: Το κορεσμένο στεατικό οξύ προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και απελευθέρωση του κυττοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. Κύτταρα HepG2 ($1,5 \times 10^6$) στρώθηκαν σε τρυβλία 10 cm² και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό τους (SA/OA), σε συγκέντρωση 600 μ M το καθένα. Μετά από 48 ώρες έκθεσης, (A) ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και ησχάση της προκασπάσης-3 ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (B) Κυτταροπλασματικά (S-100) εκχυλίσματα απομονώθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και η απελευθέρωση του κυττοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Κεντρικό ρόλο στη δημιουργία πόρων στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στην μετέπειτα απελευθέρωση του cyt-C, διαδραματίζουν τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από αντι-αποπτωτικά και προ-αποπτωτικά μέλη που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Όπως φαίνεται στο εικόνα 24A, έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ προκάλεσε την σταδιακή αύξηση των επιπέδων της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, στις πρώτες 22 ώρες. Στη συνέχεια όμως, η έκφραση αυτή μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα. Επιπλέον, 48 ώρες έκθεσης σε κορεσμένο λιπαρό οξύ οδήγησε στην μετατόπιση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από

το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, υποδηλώνοντας την εμπλοκή της πρωτεΐνης αυτής στην αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Και πάλι, το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ δεν είχε κάποια επίδραση, ενώ ο συνδυασμός του με το στεατικό οξύ ανέστειλε την μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 24B).

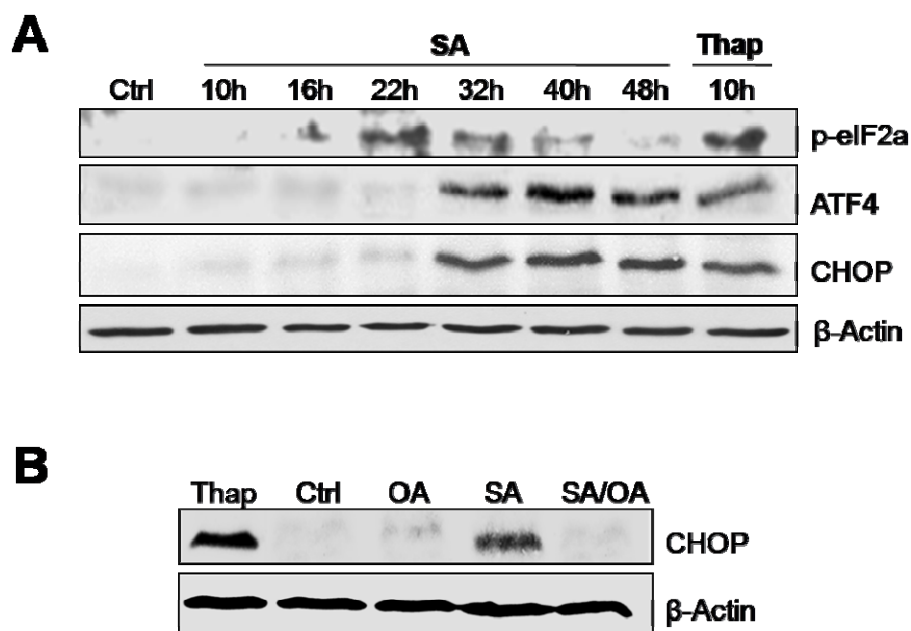


Εικόνα 24: Το κορεσμένο στεατικό οξύ μεταβάλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2 και προκαλεί την μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια. (A) Κύτταρα HepG2 (1,5 x 10⁶) στρώθηκαν σε τρυβλία 10 cm² και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 600μM στεατικού οξέος για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. **(B)** Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό τους (SA/OA), σε συγκέντρωση 600 μM το καθένα. Μετά από 48 ώρες έκθεσης, κυτταροπλασματικά (S-100) και μιτοχονδριακά (M-10) εκχυλίσματα απομονώθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και η παρουσία της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax σε αυτά, ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα οδηγούν τα κύτταρα σε θάνατο μέσω ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Επιπρόσθετα, η αναστολή όλων των ανωτέρω γεγονότων από την παρουσία ελαϊκού οξέος, τοποθετεί το σημείο δράσης των δύο λιπαρών οξέων σε ένα επίπεδο πριν από αυτό των μιτοχονδρίων.

3.4 Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν "Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου"

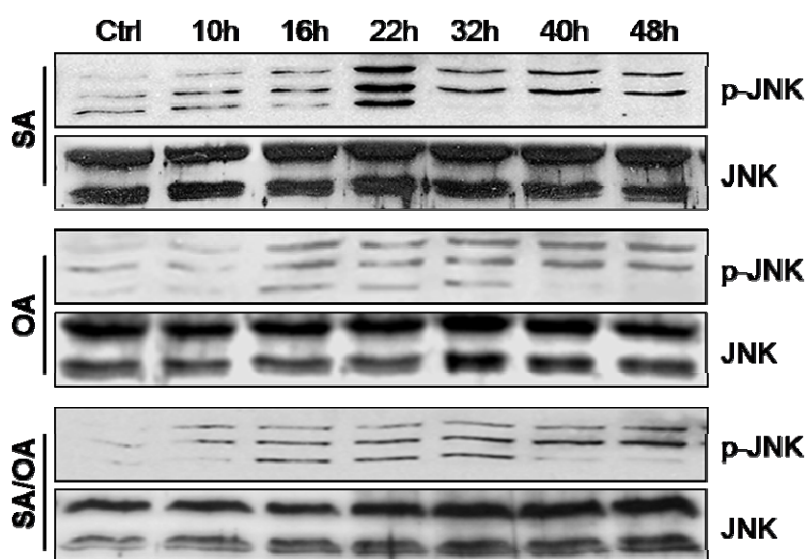
Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί το χώρο σύνθεσης όλων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών καθώς και των πρωτεϊνών του ενδομεμβρανικού συστήματος. Κάθε διαταραχή στην ικανότητα του οργανιδίου για την σωστή αναδίπλωσή τους, προκαλεί μια κατάσταση γνωστή ως στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστή η ύπαρξη διαφόρων μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, αγκυροβολημένων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η αναγνώριση αυτή αποκάλυψε ένα δίαυλο επικοινωνίας μεταξύ του οργανιδίου αυτού και των μιτοχονδρίων, σε συνθήκες στρεσογόνων ερεθισμάτων που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση. Με βάση λοιπόν τη σύνδεση αυτή καθώς και την ύπαρξη πρόσφατων ερευνητικών μελετών θελήσαμε να διερευνήσουμε, λεπτομερώς, την ρύθμιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-μαρτύρων της εμφάνισης στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 25A, φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α παρατηρήθηκε ήδη από τις 16 ώρες έκθεσης σε στεατικό οξύ, κορυφώθηκε στις 22 ώρες και στη συνέχεια μειώθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα. Παράλληλα με την φωσφορυλίωση αυτή, η έκφραση των καθοδικών πρωτεϊνών στόχων, ATF4 και CHOP, παρουσίασε έντονη αύξηση στις 32 ώρες έκθεσης, υποδηλώνοντας την έναρξη αποπτωτικής διαδικασίας με αφετηρία το ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα, η παρουσία ελαϊκού οξέος δεν είχε κάποια επίδραση στην έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP, ενώ ο συνδυασμός των δύο λιπαρών οξέων ανέστειλε πλήρως την έκφρασή της (Εικόνα 25B). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του βραχίονα της πρωτεϊνικής κίνησης PERK.



Εικόνα 25: Έκθεση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλεί « Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου». (A) Κύτταρα HepG2 ($1,5 \times 10^6$) στρώθηκαν σε τρυβλία 10 cm^2 και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε συγκέντρωση $600 \mu\text{M}$ στεατικού οξέος για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και η φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2a καθώς και η έκφραση των πρωτεϊνών ATF4 και CHOP ανιχνεύτηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (B) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA). Μετά από 36 ώρες έκθεσης, ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και η έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP σε αυτά, ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η έκθεση των κυττάρων με $2 \mu\text{M}$ θαμγικαργκίνης (Thap) για 24 ώρες, ενός κλασσικού στρεσογόνου παράγοντα για το ενδοπλασματικό δίκτυο, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για την φωσφορυλίωση/έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών.

Παράλληλα με την ενεργοποίηση του βραχίονα της PERK, θελήσαμε να μελετήσουμε την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης JNK. Μεταξύ πολλών ερεθισμάτων που ενεργοποιούν αυτή την κινάση, η JNK αποτελεί καθοδικό στόχο του βραχίονα της πρωτεΐνης IRE1a. Η ενεργοποίηση της JNK μπορεί να οδηγήσει σε αποπτωτικό θάνατο, μέσω ρύθμισης της λειτουργίας των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Πραγματοποιώντας λοιπόν χρονοεξαρτώμενα πειράματα, παρατηρήθηκε

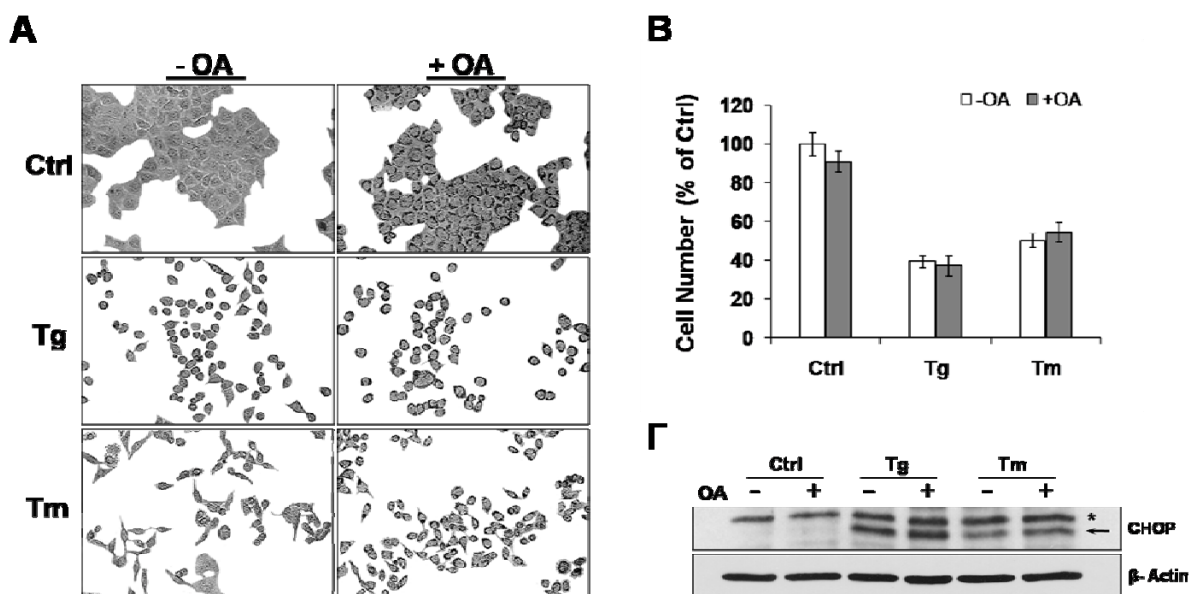
φωσφορυλίωση της JNK από τις 16 ώρες έκθεσης σε στεατικό οξύ, η οποία κορυφώθηκε στις 22 ώρες. Αντίθετα έκθεση των κυττάρων σε ελαϊκό οξύ ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων, οδήγησε σε διαφορετικό μοτίβο φωσφορυλίωσης. Τα χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης που παρατηρήθηκαν στις 16 ώρες δεν ακολουθήθηκαν από την κατακόρυφη αύξηση που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του στεατικού οξέος, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 26)



Εικόνα 26: Έκθεση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα οδηγεί σε ενεργοποίηση την πρωτεϊνικής κινάσης JNK. Κύτταρα HepG2 ($1,5 \times 10^6$) στρώθηκαν σε τρυβλία 10 cm^2 και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA). Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα, ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και η φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης JNK καθώς και η έκφραση της ολικής πρωτεΐνης ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Προκειμένου να ερευνήσουμε αν η προστατευτική δράση του ελαϊκού οξέος περιορίζεται μόνο έναντι των κορεσμένων λιπαρών οξέων ή αποτελεί γενικότερο φαινόμενο, χρησιμοποιήσαμε δύο κλασικούς στρεσογόνους παράγοντες που έχουν ως στόχο το ενδοπλασματικό δικτύο. Την χημική ουσία θαψιγκαργκίνη (thapsigargin, Tg), η οποία αναστέλλει τις αντλίες ιόντων ασβεστίου και την τουνικαμικίνη (tunicamycin, Tm) που αναστέλλει την γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Akazawa

et al.). Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 11, η παρουσία ελαϊκού οξέος δεν ήταν ικανή να αναστείλει τις αλλαγές που προκλήθηκαν από τους δύο παράγοντες, στην μορφολογία των κυττάρων (Εικόνα 27Α), στον αριθμό τους (Εικόνα 27Β), ή στην έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 27Γ).

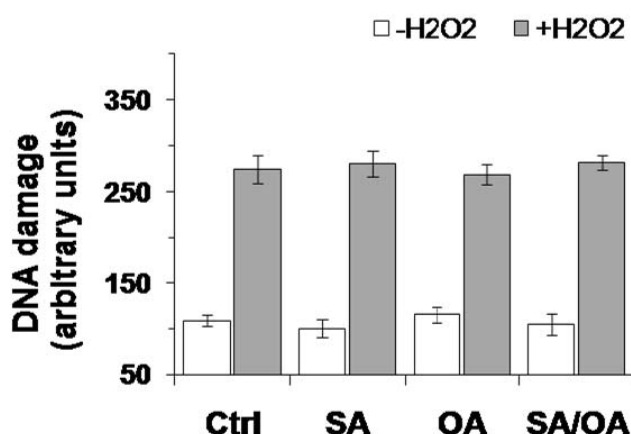


Εικόνα 27: Το ελαϊκό οξύ δεν αποτελεί γενικό αναστολέα του «Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου». Κύτταρα HepG2 (3×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε 2μM θαμικαργκίνης (Tg) ή τουνικαμυκίνης (Tm) παρουσία ή απουσία ελαϊκού οξέος (OA). Μετά από 24 ώρες έκθεσης, **(Α)** η κυτταρική μορφολογία παρατηρήθηκε με οπτική μικροσκοπία και **(Β)** ο αριθμός των κυττάρων καταμετρήθηκε με αποκλεισμό της χρωστικής κυανού του τροπανίου. **(Γ)** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν στις ίδιες συνθήκες και η έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP σε αυτά, ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

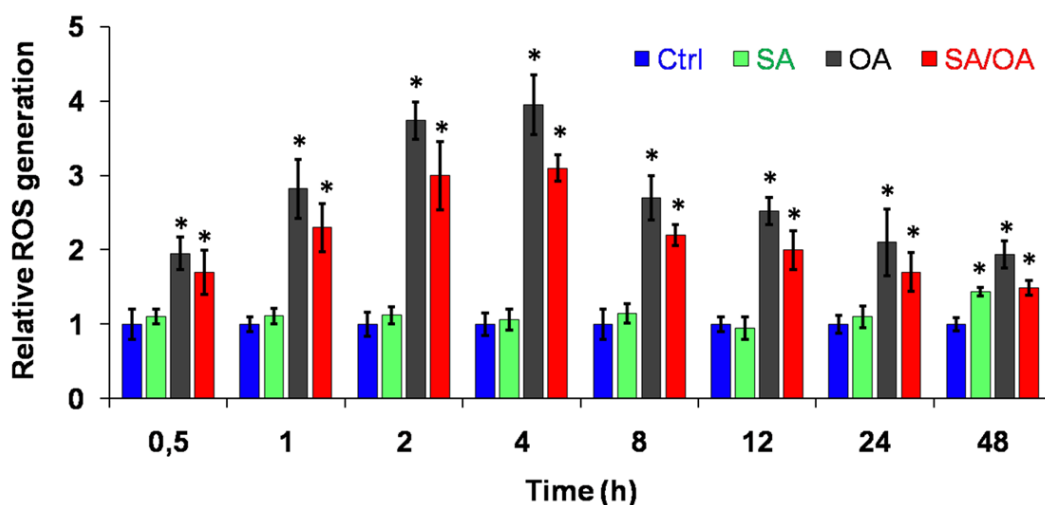
Τα παραπάνω αποτελέσματα επιδεικνύουν, την ικανότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων να προκαλούν στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η παρουσία ελαϊκού οξέος είναι ικανή να αναστείλει το φαινόμενο αυτό. Επιπλέον, η προστατευτική ικανότητα το ελαϊκού οξέος φαίνεται να περιορίζεται μόνο στον μηχανισμό δράσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων, δείχνοντας ότι δεν αποτελεί γενικό αναστολέα άλλων στρεσογόνων παραγόντων που έχουν ως στόχο το ενδοπλασματικό δίκτυο.

3.5 Μελέτη του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην κυτταροτοξική δράση των κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Σύμφωνα με το μοντέλο των δύο χτυπημάτων η εξέλιξη της ασθένειας σε στεατοηπατίτιδα προϋποθέτει ένα δεύτερο χτύπημα. Ένα πιθανό δεύτερο χτύπημα για τη μετάβαση από την απλή λιπώδη εκφύλιση των ηπατοκυττάρων, στην κατάσταση όπου παρατηρείται κυτταρικός θάνατος, φλεγμονή και ίνωση, θεωρείται ότι είναι η δημιουργία οξειδωτικού στρες στο λιπώδες ήπαρ. Προκειμένου να μελετήσουμε αυτή την υπόθεση, αναλύσαμε την ευαισθησία του πυρηνικού DNA στην εξωγενή προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, μετά από την έκθεση των κυττάρων σε λιπαρά οξέα. Όπως φαίνεται όμως, στην εικόνα 28, τα κύτταρα επέδειξαν την ίδια ευαισθησία στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανεξάρτητα με το αν εκτέθηκαν ή όχι σε λιπαρά οξέα.



Εικόνα 28: Ευαισθησία του κυτταρικού DNA μετά την έκθεση σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Κύτταρα HepG2 (1×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA) για 24 ώρες, παρουσία ή απουσία 150μM H₂O₂ για 10 λεπτά. Η βλάβη στο κυτταρικό DNA αναλύθηκε με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ».



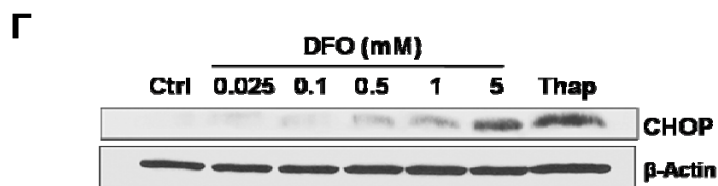
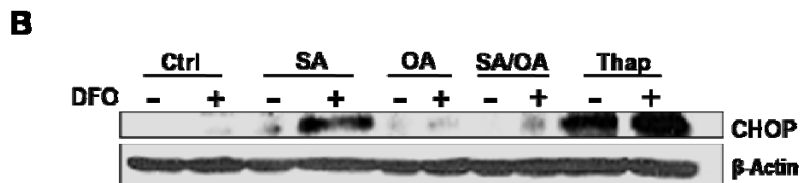
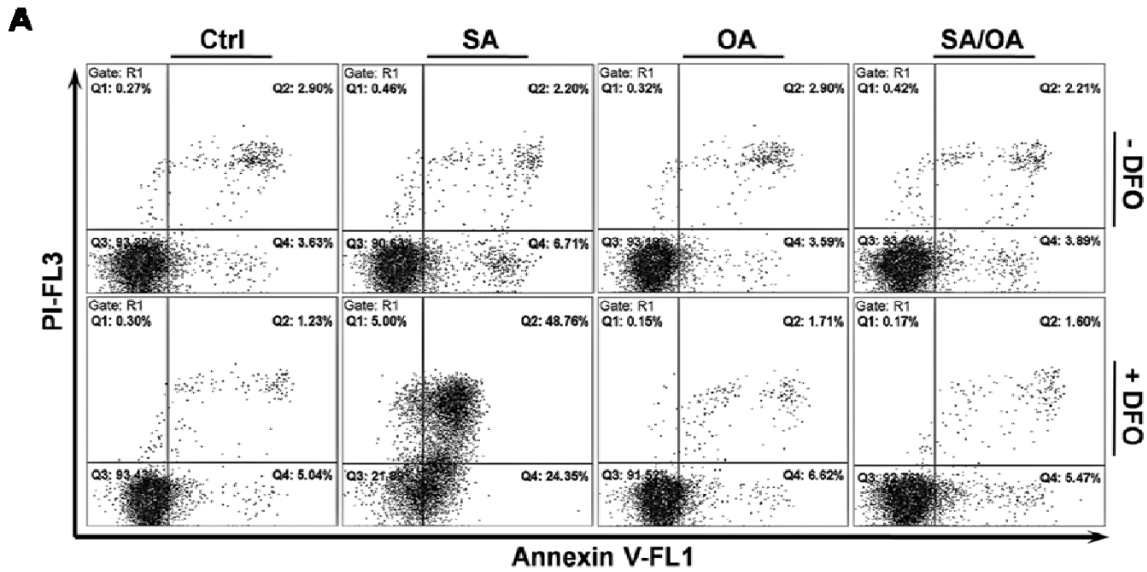
Εικόνα 29: Προσδιορισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.). Κύτταρα HepG2 (3×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (**Ctrl**), στεατικό οξύ (**SA**), ελαϊκό οξύ (**OA**) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (**SA/OA**). Στις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές τα κύτταρα επώαστηκαν με $0,5\mu\text{M}$ της ουσίας H_2DCFDA η οποία φθορίζει κατόπιν οξείδωσης από Δ.Μ.Ο. Η σχετική αύξηση του φθορισμού κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής όπως περιγράφεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ». Οι μπάρες εκφράζουν την μέση τιμή διπλών καταμετρήσεων για κάθε δείγμα από δύο διαφορετικά πειράματα, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες κάθε χρονικού διαστήματος ($*P < 0,05$).

Έχει προταθεί, ότι αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.), μπορούν να προκαλέσουν στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Xue et al., 2005). Επιπλέον, παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων τους, μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση της JNK και επακόλουθο κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Για να ερευνησουμε λοιπόν περαιτέρω, την πιθανή εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην πρόκληση λιποτοξικότητας, αναλύσαμε τα ενδοκυττάρια επίπεδα Δ.Μ.Ο. σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε λιπαρά οξέα, μέσω κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 29). Με έκπληξη παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή Δ.Μ.Ο. μετά την έκθεση των κυττάρων σε ελαϊκό και όχι σε στεατικό οξύ. Η παραγωγή αυτή ήταν εμφανής ήδη από την πρώτη μισή ώρα, κορυφώθηκε στο χρονικό διάστημα μεταξύ 2 και 4 ωρών επώασης και μειώθηκε βαθμιαία σε χαμηλότερα επίπεδα με το πέρασμα του χρόνου. Η ίδια κινητική παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του συνδυασμού των δύο λιπαρών οξέων, μειώνοντας ελαφρά τον ρυθμό παραγωγής Δ.Μ.Ο. στα

αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (Εικόνα 29). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι, τα κύτταρα που παρουσίασαν παροδική αύξηση Δ.Μ.Ο., πολλαπλασιάστηκαν κανονικά και δεν εμφάνισαν χαρακτηριστικά τοξικότητας. Αντίθετα, έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο παρά την απουσία παραγωγής Δ.Μ.Ο.

Είναι γνωστό ότι ο κύριος διαμεσολαβητής της τοξικότητας που παρατηρείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος. Δέσμευση της ενεργής αυτής ενδοκυττάριας δεξαμενής ιόντων σιδήρου με ισχυρά σιδηροδεσμευτικά μέσα, όπως η δεσφερριόξαμίνη (ДФO), προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Galaris and Pantopoulos, 2008). Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν ταυτόχρονα με ДFO (25μM) και ελεύθερα λιπαρά οξέα και διερευνήθηκε αν η δέσμευση των ιόντων σιδήρου αναστέλλει την κυταροτοξική δράση του κορεσμένου στεατικού οξέος. Το χρονικό διάστημα έκθεσης που επιλέχτηκε ήταν οι 24 πρώτες ώρες και σε αυτή την χρονική στιγμή το 90% περίπου των κυττάρων είναι ακόμα ζωντανά. Προς μεγάλη έκπληξη, παρόλο που η δέσμευση σιδήρου δεν είχε κάποια τοξική επίδραση από μόνη της, ούτε επηρέασε τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ελαϊκό οξύ, αύξησε δραματικά την ευαισθησία των κυττάρων στην τοξική δράση του στεατικού οξέος (Εικόνα 30Α). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και στο επίπεδο έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 30Β), δείχνοντας ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου αυξάνει την στρεσογόνο ικανότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Χρησιμοποιώντας όμως, αυξανόμενες συγκεντρώσεις μόνο δεσφερριόξαμίνης, παρατηρήθηκε ότι απαιτείται 200 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδηροδεσμευτικής ουσίας (5mM) για να προκαλέσει την έκφραση της πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 30Γ), δείχνοντας ότι η συνεργιστική της δράση στην τοξικότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων, πιθανά να οφείλεται σε διαφορετική αιτία.

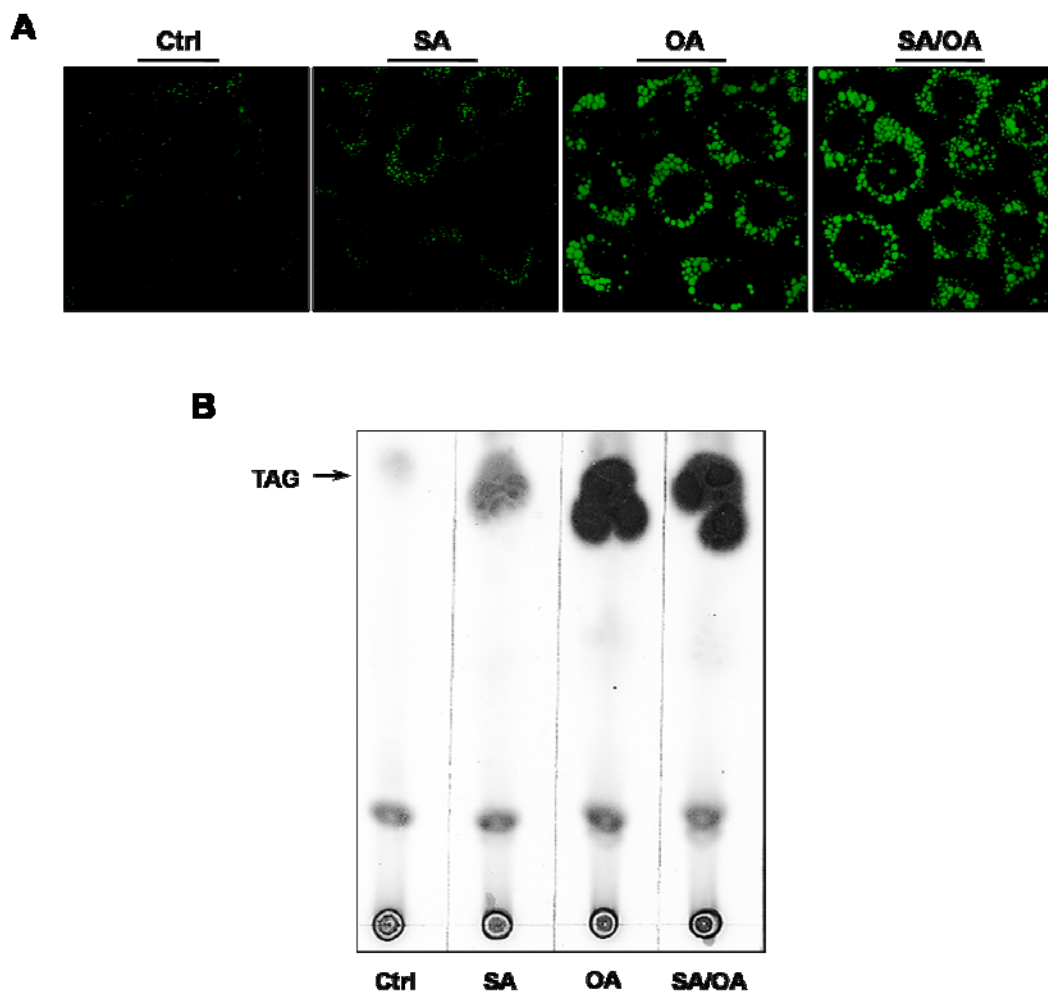
Συγκεντρωτικά τα παραπάνω αποτελέσματα αποκλείουν την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες, ως γενεσιουργό αιτία της λιποτοξικής δράσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Αντίθετα, η αναγνώριση του ρόλου της παροδικής αύξησης των Δ.Μ.Ο. στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ελαϊκό οξύ, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.



Εικόνα 30: Δέσμευση των ενδοκυττάρων ιόντων σιδήρου αυξάνει την κυτταροτοξική δράση των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Κύτταρα HepG2 (3×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA), παρουσία ή απουσία 25μM δεσφερριοξαμίνης (DFO). Έπειτα από 24 ώρες έκθεσης, (A) τα κύτταρα σημάνθηκαν με Αννεξίνη-V και ιωδιούχο προπίδιο (PI) και η εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής ($1,5 \times 10^4$ κύτταρα ανά δείγμα). (B) Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν στις ίδιες συνθήκες και η έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP σε αυτά, ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (Γ) Τα κύτταρα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DFO (25,100,500,1000 και 5000μM) για 24 ώρες και ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης CHOP. Η έκθεση των κυττάρων με 2μM θαπιγκαργκίνης (Thap) για 24 ώρες, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

3.6 Έκθεση των κυττάρων σε στεατικό οξύ προκαλεί διακοπή της σύνθεσης τριγλυκεριδίων στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.

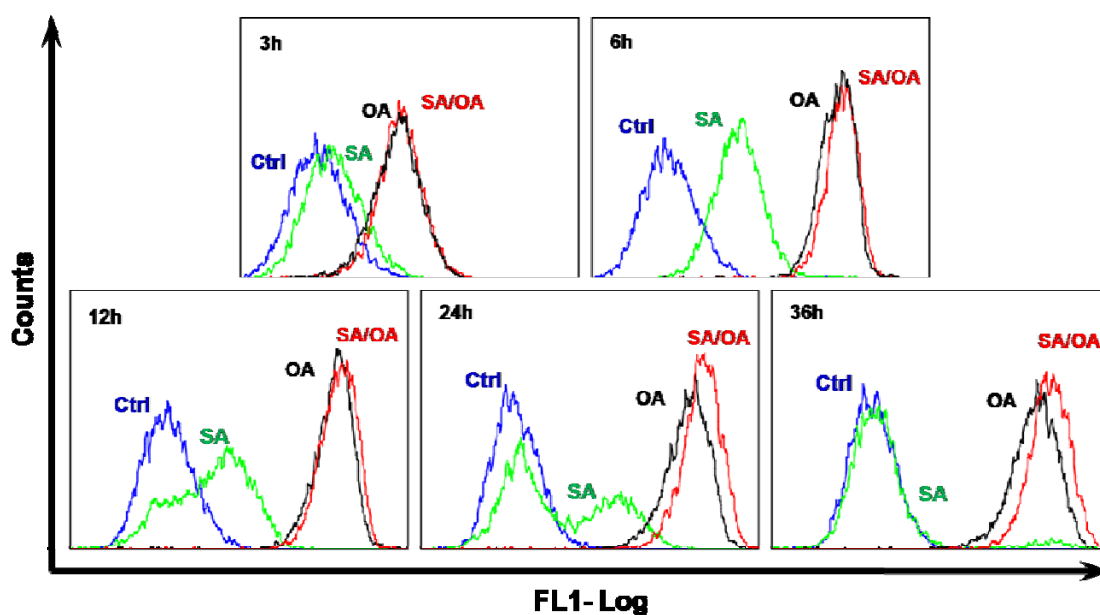
Εκτός από τον ρόλο τους στην σύνθεση πρωτεϊνών, οι μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου αποτελούν και το χώρο σύνθεσης των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένη πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση τριγλυκεριδίων (TAG). Τα νεοσυντιθέμενα αυτά ουδέτερα λίπη, είτε εκκρίνονται ως λιποπρωτεΐνες (VLDL) είτε αποθηκεύονται στο κυτταρόπλασμα ως σταγονίδια λίπους (Lipid Droplets). Αθρόα συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στο κυτταρόπλασμα οδηγεί σε ηπατοκυτταρική στεάτωση, η οποία θεωρείται ότι αποτελεί και το πρώτο χτύπημα για την δημιουργία στεατοηπατίτιδας. Προκειμένου να ερευνήσουμε την ικανότητα των δύο λιπαρών οξέων στην πρόκληση κυτταρικής στεάτωσης, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε χρώση με την λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική, ερυθρό του Νείλου (Nile Red) και παρατηρήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 31A, παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε ελαϊκό οξύ για 24 ώρες προκάλεσε μεγάλη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους και κυτταρική στεάτωση. Αντίθετα, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε στεατικό οξύ περιείχαν πολύ λιγότερα και μικρότερα σε μέγεθος, σταγονίδια λίπους. Επιπλέον, ταυτόχρονη χορήγηση ελαϊκού και στεατικού οξέος προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό στεάτωσης στα κύτταρα. Διαχωρίζοντας την λιπιδιακή συνιστώσα των κυττάρων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), στις ίδιες συνθήκες, επιβεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε στεατικό οξύ περιείχαν πολύ λιγότερα τριγλυκερίδια συγκριτικά με αυτά που εκτέθηκαν σε μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (Εικόνα 31B). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν, πως ο βαθμός κυτταρικής στεάτωσης αυτός κάθε αυτός, δεν είναι υπεύθυνος για την πρόκληση λιποτοξικότητας. Αντίθετα, η αποθήκευση των λιπαρών οξέων στην αδρανή μορφή των τριγλυκεριδίων φαίνεται να διατηρεί τις κυτταρικές λειτουργίες και να συνεισφέρει στην επιβίωση των κυττάρων.



Εικόνα 31: Έκθεση σε ελαϊκό οξύ προκαλεί έντονη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και κυτταρική στεάτωση, σε αντίθεση με το κορεσμένο στεατικό οξύ. Κύτταρα HepG2 (1×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων πάνω σε καλυπτρίδες 11 mm και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA), για 24 ώρες. **(A)** Τα κύτταρα επώαστηκαν με την λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική ερυθρό του Νείλου και ο σχηματισμός σταγονιδίων λίπους παρατηρήθηκε με μικροσκοπία συνεστιασμού όπως αναφέρεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ». **(B)** Τα κύτταρα (3×10^5) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων στις ίδιες συνθήκες και τα λιπίδιά τους απομονώθηκαν και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όπως περιγράφεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ». Ο εντοπισμός της ζώνης των τριακυλογλυκερολών (TAG) έγινε με τη χρήση πρότυπου δείγματος τριπαλμιτίνης.

Για να ερευνήσουμε λεπτομερώς, τις θεμελιώδεις αυτές διαφορές στη σύνθεση και συσσώρευση σταγονιδίων λίπους, πραγματοποιήσαμε μεγάλης κλίμακας χρονο-εξαρτώμενα πειράματα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερα λιπαρά οξέα για 3, 6, 12, 24

και 36 ώρες πριν εκτεθούν σε ερυθρό του Νείλου και αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό του περιεχομένου τους σε σταγονίδια λίπους. Όπως αποτυπώνεται στα ιστογράμματα της εικόνας 32, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ελαϊκό οξύ αύξησαν προοδευτικά το περιεχόμενό τους σε σταγονίδια λίπους σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά διαστήματα. Αντίθετα, η ικανότητα των κυττάρων να συνθέτουν τριγλυκερίδια και να τα αποθηκεύουν σε σταγονίδια μετά την έκθεσή τους σε στεατικό οξύ, ήταν σημαντικά μικρότερη στην περίοδο των πρώτων 6 ωρών. Επιπλέον, μετά τις πρώτες 6 ώρες έκθεσης σε κορεσμένο λιπαρό οξύ, με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του φθορισμού των κυττάρων, δίνοντας ένα νέο πληθυσμό με βασικά επίπεδα φθορισμού. Μετά από την πάροδο 36 ωρών, ολόκληρος σχεδόν ο πληθυσμός των κυττάρων είχε χάσει το περιεχόμενό του σε σταγονίδια λίπους.

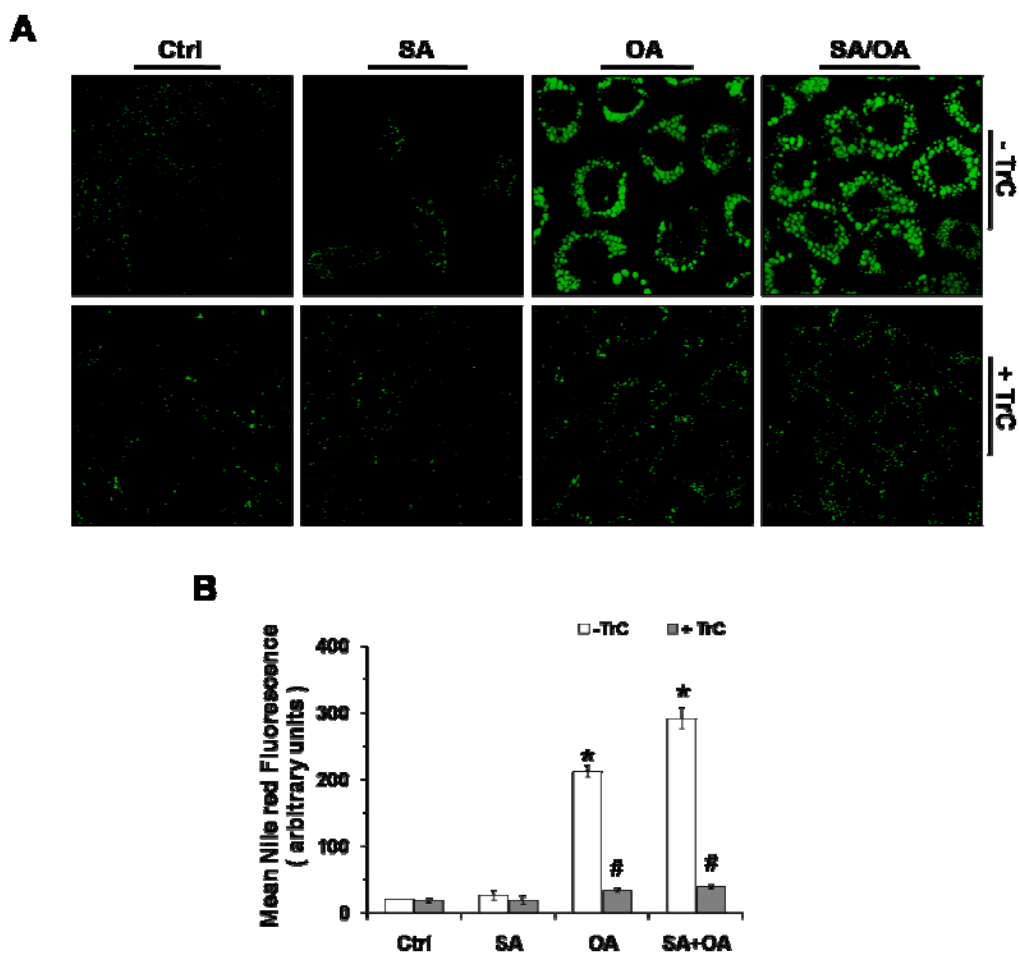


Εικόνα 32: Έκθεση σε στεατικό οξύ οδηγεί σε διακοπή της σύνθεσης τριγλυκεριδίων και της συσσώρευσης σταγονιδίων λίπους. Κύτταρα HepG2 (3×10^5) στρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και την επόμενη μέρα εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA). Στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα επώαστηκαν με την λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική ερυθρό του Νείλου και το περιεχόμενό τους σε σταγονίδια λίπους αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής όπως αναφέρεται στην ενότητα « Υλικά και Μέθοδοι ». Οι κατανομές του φθορισμού στους πληθυσμούς των κυττάρων ελήφθησαν από την μέτρηση 15×10^3 κυττάρων σε κάθε δείγμα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι προφανές ότι ο ρυθμός σύνθεσης τριγλυκεριδίων στην περίπτωση του κορεσμένου λιπαρού οξέος εμποδίζεται αρχικά, επιδεικνύοντας μειωμένη απόδοση, και στη συνέχεια διακόπτεται μετά από μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επώασης. Ταυτόχρονη προσθήκη ελαϊκού οξέος αναστέλλει το φαινόμενο αυτό και επαναφέρει την ικανότητα των κυττάρων στη φυσιολογική πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων. Επιπρόσθετα, η διακοπή της διαδικασίας αυτής προηγείται χρονικά της εμφάνισης τοξικών φαινομένων, υποστηρίζοντας την άποψη ότι αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός της κυτταροτοξικής δράσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων.

3.7 Η ενεργοποίηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων με το Συνένζυμο Α αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επίδειξη κυτταροτοξικής δράσης.

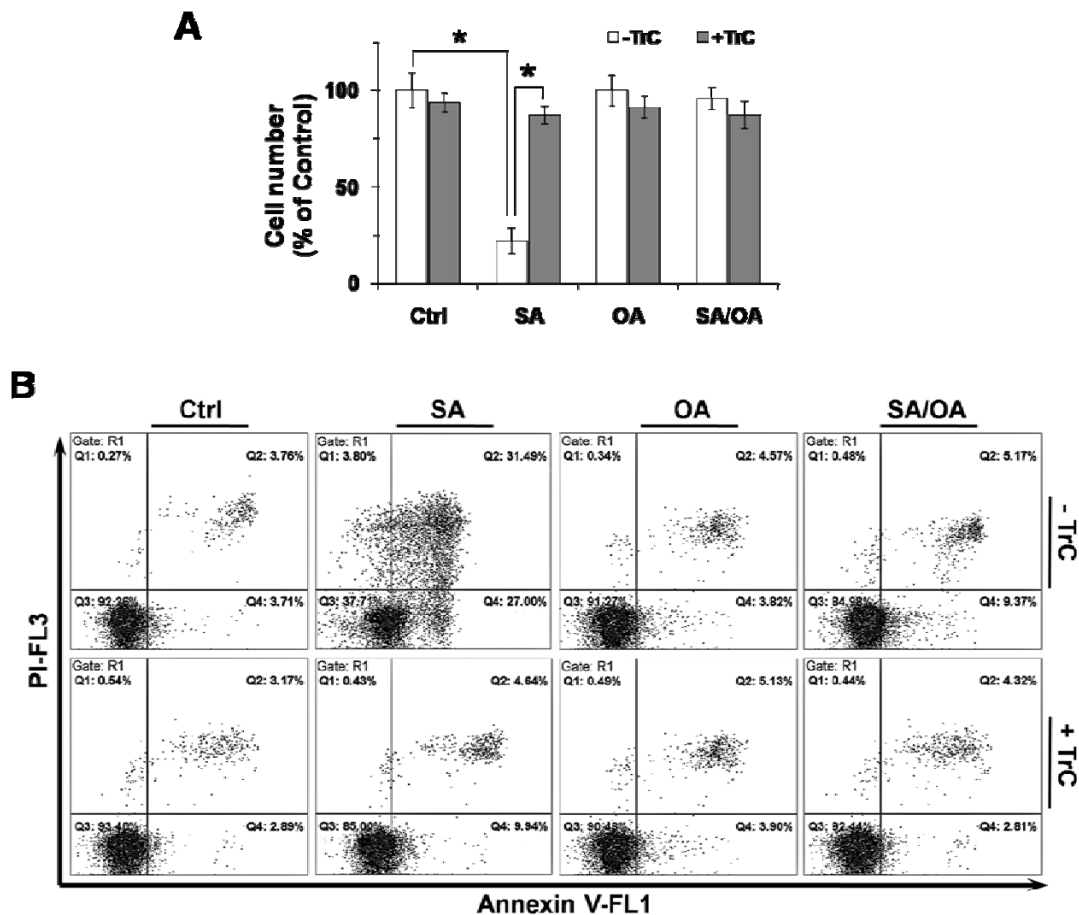
Το πρώτο ένζυμο που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, μετά την είσοδό τους στα κύτταρα, είναι η συνθετάση του άκυλο-συνενζύμου Α (acyl-CoA Synthetase; ACS). Για να μπορέσουν να εισέλθουν στο μεταβολικό μονοπάτι είτε προς οξείδωση, κυρίως στα μιτοχόνδρια, είτε προς τη σύνθεση νέων λιπιδίων στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, η ACS ενεργοποιεί τα λιπαρά οξέα συνδέοντάς τα με το συνένζυμο Α. Προκειμένου να ερευνήσουμε αν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ή κάποιο μεταβολικό τους προϊόν, μετά την ενεργοποίησή τους, είναι υπεύθυνα για την πρόκληση λιποτοξικότητας, χρησιμοποιήσαμε έναν εξειδικευμένο αναστολέα της ACS, την Τριασίνη C (Triacsin C; TrC) (Fujimoto et al., 2006; Namatame et al., 1999). Πραγματοποιώντας χρώση των κυττάρων με ερυθρό του Νείλου, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του αναστολέα εμπόδισε τον σχηματισμό σταγονιδίων λίπους που προκλήθηκε από την επώαση των κυττάρων με ελεύθερα λιπαρά οξέα, για 48 ώρες. Τόσο το ελαϊκό οξύ όσο και ο συνδυασμός των δύο λιπαρών οξέων δεν οδήγησε στην δημιουργία κυτταρικής στεάτωσης που παρατηρήθηκε απουσία του αναστολέα (Εικόνα 33Α). Η έμμεση επίδραση της τριασίνης C, στην παραγωγή σταγονιδίων λίπους παρατηρήθηκε και με ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 33Β). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η παρουσία του αναστολέα, εμποδίζει την σύνδεση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με το συνένζυμο Α. Έτσι δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα στην πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων.



Εικόνα 33: Η αναστολή της σύνδεσης με το συνένζυμο A εμποδίζει την χρησιμοποίηση των λιπαρών οξέων στην πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων. Κύτταρα HepG2 εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA) απουσία ή παρουσία 0,5μM Τριασίνης C (TrC), αναστολέα της ACS. **(A)** Μετά από 48 ώρες έκθεσης τα κύτταρα επωάστηκαν με την λιποφίλη φθορίζουσα χρωστική ερυθρό του Νείλου και ο σχηματισμός σταγονιδίων λίπους παρατηρήθηκε με μικροσκοπία συνεστιασμού. **(B)** Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες και αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής. Οι μπάρες απεικονίζουν το μέσο φθορισμό διπλών μετρήσεων από δύο διαφορετικά πειράματα. (*P < 0,05 έναντι των κυττάρων μαρτύρων, # P < 0,05 έναντι των αντίστοιχων δειγμάτων παρουσία τριασίνης C).

Στη συνέχεια, θελήσαμε να δούμε αν η αναστολή της σύνδεσης με το συνένζυμο A αναστέλει και την τοξική δράση του κορεσμένου στεατικού οξέος. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα λιπαρά οξέα, παρουσία ή απουσία του αναστολέα, για 48 ώρες. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 34A) και ανάλυση του κυτταρικού θανάτου σε κυτταρόμετρο ροής,

με χρώση αννεξίνης-V και ιωδιούχου προπιδίου (Εικόνα 34B), έδειξε πως η προσθήκη της TrC προστατεύσε πλήρως τα κύτταρα από την κυτταροτοξική δράση του κορεσμένου στεατικού οξέος.



Εικόνα 34: Η σύνδεση με το Συνένζυμο A αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επίδειξη κυτταροτοξικής δράσης από το κορεσμένα λιπαρά οξέα. Κύτταρα HepG2 εκτέθηκαν σε αλβουμίνη (Ctrl), στεατικό οξύ (SA), ελαϊκό οξύ (OA) ή στον συνδυασμό των δύο λιπαρών οξέων (SA/OA) απουσία ή παρουσία 0,5μM Τριασίνης C (TrC), αναστολέα της ACS. **(A)** Μετά από 48 ώρες έκθεσης τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο αριθμός τους καταμετρήθηκε με αποκλεισμό της χρωστικής κυανού του τροπανίου (*P < 0,5). **(B)** Τα κύτταρα σημάνθηκαν με Αννεξίνη-V και ιωδιούχο προπίδιο (PI) και η εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής (15 x 10³ κύτταρα ανά δείγμα).

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα αυτά επιδεικνύουν καθαρά πως το ελεύθερο στεατικό οξύ δεν είναι υπεύθυνο για την πρόκληση τοξικότητας αλλά κάποιο μεταβολικό του προϊόν, που φέρει διαφορετικές ιδιότητες από τους αντίστοιχους μεταβολίτες του ελαϊκού οξέος. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κορεσμένοι αυτοί μεταβολίτες

εμποδίζουν και διακόπτουν τη φυσιολογική πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων, στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και προκαλούν στρες στο οργανίδιο αυτό με επακόλουθο την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού θανάτου. Ταυτόχρονη προσθήκη ελαϊκού οξέος φαίνεται να ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα, τις ιδιότητες των μεταβολιτών αυτών, αναστέλλοντας έτσι την τοξική τους δράση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες οι διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου στις ανεπτυγμένες χώρες έχουν διαφοροποιηθεί ριζικά και αυτή η αλλαγή φαίνεται να συνδέεται όλο και περισσότερο με τα αυξανόμενα επίπεδα παχυσαρκίας και σχετικών παθολογικών καταστάσεων στο γενικό πληθυσμό (Zimmet et al., 2001). Κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά προκαλεί ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό του αίματος, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της απορρόφησής τους, καθώς και στη συσσώρευσή τους στους μη λιπώδεις ιστούς. Το ήπαρ αποτελεί ένα από τα βασικά όργανα για το συστηματικό μεταβολισμό τους λίπους. Η συνεχής συσσώρευση λιπιδίων στην μορφή σταγονιδίων λίπους έχει προταθεί ότι οδηγεί σε δυσλειτουργία των ηπατοκυττάρων με επακόλουθο την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων (Adams et al., 2005; Schaffer, 2003). Ο όρος μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός φάσματος τέτοιων καταστάσεων και περιλαμβάνει την πορεία εξέλιξης από το λιπώδες ήπαρ σε στεατοηπατίδα, κίρρωση ακόμα και καρκινογένεση (Adams et al., 2005; Clark et al., 2003). Παρά την μεγάλη επέκταση της NAFLD και τις επιπτώσεις της στην παγκόσμια υγεία, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί, υπεύθυνοι για την εξέλιξη της ασθένειας, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Σήμερα, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση της NAFLD και, με δεδομένα τα κενά στην αποσαφήνιση των μηχανισμών παθογένεσης, οι όποιες θεραπευτικές παρεμβάσεις έχουν κυρίως εμπειρικό χαρακτήρα. Ως επί τω πλείστω, επιχειρείται η διακοπή τυχόν λαμβανομένων φαρμάκων και η διόρθωση παραγόντων όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερλιπιδαιμία που σχετίζονται με την νόσο. Η μείωση του σωματικού βάρους με δίαιτα και άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε ομαλοποίηση της ηπατικής βιοχημείας και βελτίωση των ιστολογικών βλαβών.

Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να διερευνηθεί προσεχτικά και λεπτομερώς η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί στην λιποτοξική δράση των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε κύτταρα του ήπατος, καθώς επίσης και να διαλευκανθεί ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη διαδικασία αυτή. Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν μεγάλης έκτασης χρονοεξαρτώμενα πειράματα χρησιμοποιώντας την ανθρώπινη καρκινική ηπατοκυτταρική σειρά HepG2, ένα συχνά χρησιμοποιούμενο

μοντέλο για την μελέτη του μεταβολισμού του λίπους και την παθογένεση της NAFLD (Gomez-Lechon et al., 2007; Malhi et al., 2006; Wu et al., 2008).

4.1 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα της εισαγωγής, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να αποτελεί μέρος του προβλήματος της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, εντούτοις δεν έχει διευκρινιστεί αν η ανάπτυξή του αποτελεί και γενεσιουργό αιτία της λιποτοξικότητας ή είναι το αποτέλεσμα διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός θάνατος. Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να μελετήσουμε την υπόθεση του πιθανού δεύτερου χτυπήματος από τη δημιουργία οξειδωτικού στρες στο λιπώδες ήπαρ, αναλύσαμε την ευαισθησία του πυρηνικού DNA στην εξωγενή προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, μετά από την έκθεση των κυττάρων σε λιπαρά οξέα. Όπως φαίνεται όμως, στην εικόνα 28, τα κύτταρα επέδειξαν την ίδια ευαισθησία στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανεξάρτητα με το αν εκτέθηκαν ή όχι σε λιπαρά οξέα.

Από την άλλη πλευρά, η λεπτομερής χρονοεξαρτώμενη διερεύνηση της ενδογενούς παραγωγής Δ.Μ.Ο. δεν έδειξε κάποια σημαντική αύξηση στην περίπτωση του κυτταροτοξικού στεατικού οξέος, παρά μόνο στο χρονικό σημείο των 48 ωρών έκθεσης (Εικόνα 29). Το χρονικό αυτό σημείο ακολουθεί χρονικά της εμφάνισης των πρώτων τοξικών φαινομένων, ενισχύοντας την άποψη ότι η παραγωγή Δ.Μ.Ο. αποτελεί το αποτέλεσμα και όχι την αιτία στη διαδικασία της λιποτοξικής δράσης του κορεσμένου στεατικού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά, με μια πρώτη ματιά, φαίνεται να έρχονται σε σύγκρουση με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων που υποστηρίζουν πως η δημιουργία Δ.Μ.Ο. αποτελεί κομβικό σημείο στην ανάπτυξη λιποτοξικότητας από τα κορεσμένα λιπαρά (Li et al., 2008; Listenberger et al., 2003). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, έκθεση διαφορετικών κυτταρικών σειρών αλλά και ηπατοκυττάρων στο κορεσμένο παλμιτικό οξύ (16:0) οδήγησε στη δημιουργία Δ.Μ.Ο. υπεύθυνων για την τοξική του δράση. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της αντίφασης είναι ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σχετικά αργά στη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας, μιας και η αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η απελευθέρωση του κυττοχρώματος c είχε, ήδη, λάβει χώρα.

Προκειμένου να αποκλείσουμε το ρόλο του οξειδωτικού στρες στο μηχανισμό πρόκλησης λιποτοξικότητας από το κορεσμένο στεατικό οξύ, μελετήσαμε την επίδραση της δέσμευσης του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, ο οποίος αποτελεί και τον κύριο διαμεσολαβητή της τοξικότητας που παρατηρείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Barbouti et al., 2001; Melidou et al., 2005; Tenopoulou et al., 2005). Στο συγκεκριμένο μοντέλο όμως, η δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου από τη δεσφερριόξαμίνη δεν προστάτευσε τα κύτταρα από την τοξική δράση του κορεσμένου λιπαρού οξέος. Αντίθετα, η συνεπώαση αυτή αύξησε δραματικά την ευαισθησία των κυττάρων στη δράση του, προκαλώντας εκτεταμένη απόπτωση ήδη από τις 24 ώρες έκθεσης (Εικόνα 30Α). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και στο επίπεδο έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 30Β), υποδεικνύοντας ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου αυξάνει τη στρεσογόνο ικανότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Σε μια πρώτη ανάγνωση, η συνεργιστική αυτή δράση θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλλαγή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο ενδοπλασματικό δίκτυο από την δεσφερριόξαμίνη. Μιας και η ύπαρξη οξειδωτικών συνθηκών στο ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Tu and Weissman, 2004; Zhang and Kaufman, 2008), είναι πιθανό η παρουσία των ιόντων σιδήρου να εμπλέκεται στη διατήρηση του οξειδωτικού περιβάλλοντος στον αυλό του οργανιδίου. Πραγματοποιώντας όμως δοσο-εξαρτώμενα πειράματα μόνο με DFO, παρατηρήθηκε ότι απαιτείται 200 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας (5mM) για να προκαλέσει την έκφραση της πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 30Γ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συνεργιστική δράση της ενδοκυττάριας μείωσης του σιδήρου στην τοξικότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων, κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται σε διαφορετικό μηχανισμό.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της ενδοκυττάριας παραγωγής μονοακόρεστων λιπαρών οξέων από το ένζυμο SCD1 (Stearoyl-CoA Desaturase 1). Είναι πιθανό στη διάρκεια της εξέλιξης, τα κύτταρα να ανέπτυξαν προστατευτικούς μηχανισμούς απέναντι στη τοξικότητα των κορεσμένων λιπαρών, μετατρέποντάς τα στα αντίστοιχα μονοακόρεστα. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους διάφορους ιστούς και μετατρέπει το στεατικό (18:0) και το παλμιτικό οξύ (16:0) στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ελαϊκό (18:1) και παλμιτελαϊκό οξύ (16:1) αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη SCD1 είναι ένα διμερές με δύο υπομονάδες. Στο κέντρο κάθε υπομονάδας υπάρχει ένα διατομικό κέντρο σιδήρου

υπεύθυνο για την καταλυτική δράση του ενζύμου (Lindqvist et al., 1996; Paton and Ntambi, 2009). Το γεγονός αυτό προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον διότι θα μπορούσε να εξηγήσει τη συνεργιστική δράση της DFO στην τοξικότητα των κορεσμένων λιπαρών, μέσω της μείωσης των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου και επακόλουθη μείωση της έκφρασης ή της ενεργότητας της SCD1. Υποστηρίζοντας αυτήν την υπόθεση, η παρουσία DFO δεν αυξάνει τη στρεσογόνο ικανότητα της θαψιγκαργκίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως φαίνεται από την έκφραση της πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 30B).

Συγκεντρωτικά τα παραπάνω αποτελέσματα αποκλείουν το ρόλο του οξειδωτικού στρες, ως γενεσιουργό αιτία της λιποτοξικής δράσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Η μερική εμπλοκή των Δ.Μ.Ο. φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα των τελευταίων σταδίων της αποπτωτικής διαδικασίας και να οφείλεται περισσότερο, στην αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην επακόλουθη απελευθέρωση του κυττοχρώματος c από αυτή. Από την άλλη πλευρά, η σημαντική παραγωγή Δ.Μ.Ο. από τα πρώτα κιόλας χρονικά διαστήματα έκθεσης στο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ ήταν μη αναμενόμενη, μιας και τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάστηκαν κανονικά και δεν εμφάνισαν χαρακτηριστικά τοξικότητας σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο ρόλος της παροδικής αύξησης των Δ.Μ.Ο., σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι γνωστός και η διερεύνησή του αποτελεί τη συνέχεια της παρούσας εργασίας. Προκαταρκτικά πειράματα, στο εργαστήριό μας, έχουν δείξει ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων (>1mM) οδηγούν, επίσης, στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων. Αν αυτή, η τοξικότητα οφείλεται στην παρατεταμένη αύξηση των Δ.Μ.Ο., τότε ανοίγει ένας νέος ερευνητικός ορίζοντας στο συγκεκριμένο πεδίο. Ένα πεδίο με την ύπαρξη ενός δεύτερου και διαφορετικού μηχανισμού πρόκλησης λιποτοξικότητας, από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα.

4.2 Ο ρόλος των ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, αποκάλυψαν δραματικά διαφορετικές επιδράσεις μεταξύ των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Στο εύρος των φυσιολογικών συγκεντρώσεων, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, στεατικό και παλμιτικό οξύ, δύο από τα πιο πλούσια κορεσμένα λιπαρά της δυτικής διαίτας, οδήγησαν στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων προκαλώντας αρχικά αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη

συνέχεια προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Περαιτέρω διερεύνηση της αιτίας πρόκλησης κυτταρικού θανάτου αποκάλυψε ως υπεύθυνη, τη δημιουργία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (καθώς και το πολυακόρεστο λινελαϊκό) που αποτελεί το 80% των λιπαρών του ελαιολάδου, δεν επέδειξε κάποια τοξική για τα κύτταρα, δράση. Απεναντίας, ταυτόχρονη επώασή του με τα κορεσμένα λιπαρά (διπλάσια συνολική συγκέντρωση λιπαρών οξέων) ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από αυτά τοξικότητα, σε όλα τα εξεταζόμενα επίπεδα. Επιπρόσθετα, η παρεχόμενη προστασία του ελαϊκού οξέος ήταν εμφανής ακόμα και όταν χορηγήθηκε σε μεταγενέστερα χρονικά διαστήματα ή και σε αναλογίες συγκέντρωσης, μικρότερες του 1:1 (OA:SA), δείχνοντας ότι μικρές μόνο ποσότητες ελαϊκού οξέος είναι ικανές να ρυθμίσουν τον μηχανισμό πρόκλησης λιποτοξικότητας. Η προστατευτική αυτή ικανότητα φαίνεται να περιορίζεται μόνο στον μηχανισμό δράσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων και δεν αποτελεί γενικό αναστολέα άλλων στρεσογόνων παραγόντων που έχουν ως στόχο το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Στην προσπάθειά μας να αναγνωρίσουμε τα κεντρικά γεγονότα υπεύθυνα για αυτές τις θεμελιώδεις διαφορές, μελετήσαμε λεπτομερώς τα κύρια βήματα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων μετά την απορρόφησή τους από τα κύτταρα. Μετά την είσοδό τους, το πρώτο βήμα απαραίτητο για τον μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων είναι η ενεργοποίησή τους. Η ενεργοποίηση αυτή, πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης με το υδρόφιλο συνένζυμο A (CoA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του άκυλο-συνεζύμου A (ACS) και λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Sourene and Kuypers, 2008). Στη συνέχεια, ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου, τα ενεργοποιημένα λιπαρά οξέα μπορούν, είτε να οδηγηθούν στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας μέσω β-οξειδωσης, είτε να χρησιμοποιηθούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως υποστρώματα για την σύνθεση κυρίως φωσφολιπιδίων, τριγλυκεριδίων και εστέρων της χοληστερόλης (Bruce and Salter, 1996; Guo et al., 2006; Yen et al., 2008). Στην περίπτωση που η ενεργειακές ανάγκες έχουν καλυφθεί, η πορεία οδηγείται προς την δεύτερη περίπτωση όπου μέσω της πορείας του Kennedy τα λιπαρά οξέα αποθηκεύονται σε τριγλυκερίδια (Εικόνα 5). Τα νέο-συντιθέμενα τριγλυκερίδια στη συνέχεια, απελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα στη μορφή των σταγονιδίων λίπους (Εικόνα 6).

Χρησιμοποιώντας την χημική ουσία τριασίνη C, έναν εξειδικευμένο αναστολέα της ACS (Fujimoto et al., 2006; Namatame et al., 1999), παρατηρήθηκε τόσο η αναστολή της

σύνθεσης τριγλυκεριδίων από τα λιπαρά οξέα (αφού χωρίς την σύνδεση με το CoA δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για αυτή τη σύνθεση), όσο και η πλήρης αναστολή της τοξικής δράσης του κορεσμένου στεατικού οξέος (Εικόνα 33). Τα πρώτο συμπέρασμα που εξάγεται από τα συγκεκριμένα δεδομένα, είναι ότι υπεύθυνο για την εμφάνιση τοξικής δράσης δεν είναι αυτό κάθε αυτό το ελεύθερο στεατικό οξύ, αλλά κάποιο μεταβολικό του προϊόν μετά την ενεργοποίησή του. Επειδή όμως, τα δύο λιπαρά οξέα ακολουθούν το ίδιο μονοπάτι προς την πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων, το δεύτερο συμπέρασμα που προκύπτει, είναι πως οι μεταβολίτες του στεατικού οξέος θα πρέπει να φέρουν διαφορετικές ιδιότητες από τους αντίστοιχους μεταβολίτες του ελαϊκού οξέος.

Χρησιμοποιώντας τεχνικές συνεστιακής μικροσκοπίας και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, παρατηρήθηκε αυξημένη σύνθεση τριγλυκεριδίων και μεγάλη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στα κύτταρα που εκτέθηκαν στο μη τοξικό, μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ. Αντίθετα, επώαση μόνο με το τοξικό για τα κύτταρα στεατικό οξύ, οδήγησε σε πολύ λιγότερα τριγλυκερίδια και μικρότερα σε μέγεθος σταγονίδια λίπους (Εικόνα 31). Περαιτέρω διερεύνηση, μέσω χρόνο-εξαρτώμενων πειραμάτων, αποκάλυψε πως ο ρυθμός σύνθεσης τριγλυκεριδίων στην περίπτωση του κορεσμένου στεατικού οξέος, εμποδίζεται από τα πρώτα κιόλας χρονικά διαστήματα έκθεσης και στη συνέχεια φαίνεται να διακόπτεται (Εικόνα 32). Από την άλλη πλευρά, η σύνθεση τριγλυκεριδίων στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ελαϊκό οξύ συνεχίζει κανονικά, αυξάνοντας προοδευτικά το περιεχόμενό τους σε σταγονίδια λίπους, σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά διαστήματα. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν πως το μέγεθος της κυτταρικής στεάτωσης δεν είναι υπεύθυνο για την πρόκληση λιποτοξικότητας. Απεναντίας, η αποθήκευση των ενεργοποιημένων λιπαρών οξέων στην αδρανή μορφή των τριγλυκεριδίων φαίνεται να διατηρεί τις κυτταρικές λειτουργίες και να συνεισφέρει στην επιβίωση των κυττάρων. Η διακοπή της διαδικασίας αυτής προηγείται χρονικά της εμφάνισης τοξικών φαινομένων, υποστηρίζοντας την άποψη ότι αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός στη λιποτοξική δράση των κορεσμένων λιπαρών.

Συγκεντρωτικά τα παραπάνω αποτελέσματα θέτουν δύο καίρια ερωτήματα: α) Ποια είναι η αιτία διακοπής της σύνθεσης τριγλυκεριδίων, στην περίπτωση του κορεσμένου στεατικού οξέος και β) πως το γεγονός αυτό οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου προκαλώντας στρες στο οργανίδιο;

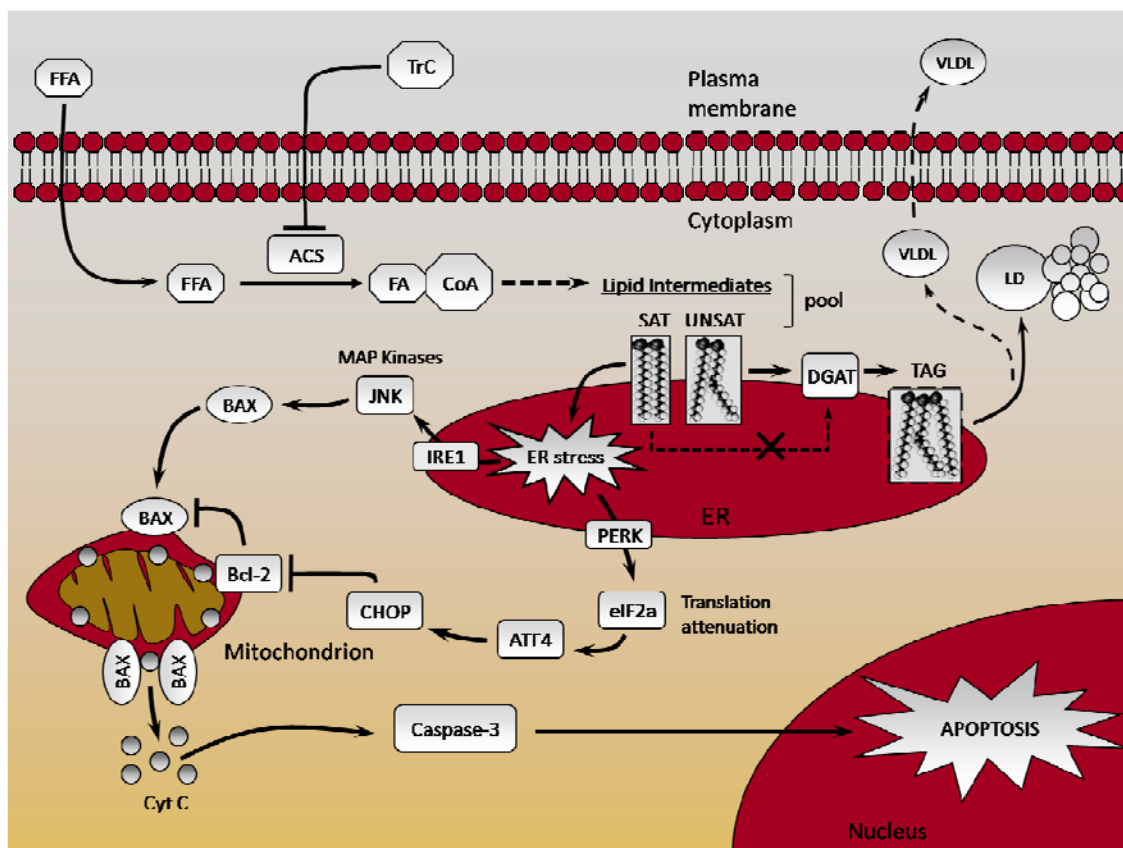
Όσον αφορά το πρώτο ερώτημα, είναι προφανές ότι ένα ή περισσότερα στάδια στην πορεία του Kennedy, στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, είναι

ελαττωματικά. Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι ο βαθμός κορεσμού των δύο λιπαρών αλυσίδων σε ενδιάμεσους μεταβολίτες, όπως το φωσφατιδικό οξύ (PA) και η διάκυλο-γλυκερόλη (DAG), μπορεί να επηρεάσει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και με αυτό τον τρόπο να ρυθμίσει και την αλληλεπίδρασή τους με διάφορες πρωτεΐνες (Coleman and Bell, 1976; Goldberg et al., 1994; Mori et al., 1982; Ostrander et al., 2001). Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ο Goldberg και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η προσθήκη μορίων διπαλμιτίνης (16:0;16:0), σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων δεν ήταν ικανή να ενεργοποιήσει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ενώ προσθήκη μορίων διελαΐνης (18:1;18:1) προκάλεσε την ενεργοποίηση αυτή. Οι διαφορετικές αυτές ιδιότητες αποδόθηκαν στο σχηματισμό μη ρευστών δομών (gel-like domains) στις μεμβράνες από τα μόρια της διπαλμιτίνης, σε αντίθεση με τις ρευστές δομές (liquid-crystalline domains) που σχημάτισαν τα μόρια της διελαΐνης. Το γεγονός αυτό έκανε τα μόρια των κορεσμένων διάκυλο-γλυκερολών μη διαθέσιμα για τις απαραίτητες αλληλεπιδράσεις και την ενεργοποίηση της PKC. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι, η προσθήκη ακόρεστων λιπαρών οξέων στις δομές της διπαλμιτίνης επανέφερε την ρευστή κατάσταση επιτρέποντας την πρόσβαση της PKC και την ενεργοποίησή της (Goldberg and Zidovetzki, 1997). Ένα τέτοιο μοντέλο θα μπορούσε να εξηγήσει ικανοποιητικά τη διακοπή της σύνθεσης των τριγλυκεριδίων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου που παρατηρήθηκε στη παρούσα εργασία. Αυξημένη παραγωγή ενδιάμεσων μεταβολιτών του στεατικού οξέος, πιθανά οδηγεί στο σχηματισμό τέτοιων μη ρευστών δομών αποτρέποντας την πρόσβασή τους στα αντίστοιχα ένζυμα. Προσθήκη ελαϊκού οξέος επαναφέρει την ρευστή κατάσταση επιτρέποντας την χρησιμοποίηση των κορεσμένων μεταβολιτών στην πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων.

Όσον αφορά το δεύτερο ερώτημα, η ανάπτυξη στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με τον ίδιο τρόπο, από την αλλαγή των ιδιοτήτων των μεμβρανών του οργανιδίου, λόγω της συσσώρευσης κορεσμένων ενδιάμεσων λιπιδίων. Η αύξηση του βαθμού κορεσμού μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα και την ρευστότητα των μεμβρανών, επηρεάζοντας τελικά την ακεραιότητα και την λειτουργικότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι συγκεκριμένες μεμβράνες μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευάλωτες σε τέτοιες αλλαγές, μιας και πρέπει να αποτελούνται από υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπιδίων για να είναι λειτουργικές (Spector and Yorek, 1985). Ενισχύοντας τον προτεινόμενο μηχανισμό, παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει μεγάλες ανωμαλίες στη μορφολογία του ενδοπλασματικού δικτύου

μετά την έκθεση των κυττάρων σε κορεσμένα και όχι σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Borradaile et al., 2006; Diakogiannaki et al., 2008; Moffitt et al., 2005). Παρόλο που το συγκεκριμένο μοντέλο εξηγεί ικανοποιητικά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσο και τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων, παραμένει μια υπόθεση εργασίας που θα πρέπει να αποδειχτεί πλήρως, πειραματικά.

Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί το σημείο σύνθεσης όλων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών του ενδομεμβρανικού συστήματος. Κάθε διαταραχή που εμποδίζει τη σωστή αναδίπλωση των πεπτιδίων αυτών στον αυλό του οργανιδίου οδηγεί σε μια κατάσταση γνωστή και ως στρες ενδοπλασματικού δικτύου (Ron and Walter, 2007; Yoshida, 2007; Zhang and Kaufman, 2008). Η απάντηση των κυττάρων στις συνθήκες αυτές είναι η ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου και συνάμα εκλεπτισμένου μηχανισμού αποκατάστασης που επιδεικνύουν όλα τα θηλαστικά. Η απόκριση αυτή μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια των στρεσογόνων ερεθισμάτων. Η αρχική φάση προσαρμογής οδηγεί στην προσωρινή αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία παρέχει στα κύτταρα την ευκαιρία να ανακάμψουν και να επαναφέρουν την ομοιοστασία στο εσωτερικό τους. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο κορεσμένο στεατικό οξύ εισέρχονται σε μια τέτοια φάση προσαρμογής όπως φάνηκε από την παροδική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 17A και 17B) και την αρχική φωσφοφυλιώση του παράγοντα eIF2α που αναστέλει την πρωτεϊνοσύνθεση (Εικόνα 25A). Όταν το στρες είναι πιο έντονο και παρατεταμένο και υπάρχει αδυναμία αντιμετώπισης, τα κύτταρα εισέρχονται σε μια δεύτερη φάση. Σε αυτή τη φάση, δευτογενή γεγονότα, όπως η έκφραση των πρωτεϊνών ATF4 και CHOP καθώς και η ενεργοποίηση της JNK, οδηγούν τα κύτταρα σε μιτοχονδριακό αποπτωτικό θάνατο (Εικόνες 25 και 26). Η παρατεταμένη έκφραση της CHOP και η ενεργοποίηση της JNK, όπως παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη, μπορούν να διεγείρουν την απόπτωση προκαλώντας την μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια καθώς και την μείωση της έκφρασης της αντιαποπτωτικής Bcl-2 από την CHOP (Malhi and Gores, 2008a; McCullough et al., 2001). Το προτεινόμενο μοντέλο και η απεικόνιση των κύριων γεγονότων που καθορίζουν την πορεία προς την επιβίωση ή την πρόκληση αποπτωτικού θανάτου από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, παρουσιάζονται στην Εικόνα 35.



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού πρόκλησης λιποτοξικότητας από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κορεσμένοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του στεατικού οξέος εμποδίζουν και διακόπτουν τη φυσιολογική πορεία σύνθεσης των τριγλυκεριδίων στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Προτείνεται, πως ο σχηματισμός μιας δεξαμενής (pool) κορεσμένων ενδιάμεσων μεταβολιτών προκαλεί τη δημιουργία μη ρευστών δομών οι οποίες αποτρέπουν την πρόσβαση στα ένζυμα του μηχανισμού σύνθεσης τριγλυκεριδίων. Συσσώρευση μη ρευστών δομών προκαλεί τελικά στρες στο οργανίδιο και ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού θανάτου. Ταυτόχρονη προσθήκη ελαϊκού οξέος φαίνεται να ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα, τις ιδιότητες των μεταβολιτών αυτών, αναστέλλοντας έτσι την τοξική τους δράση. FFA, free fatty acids; ACS, acyl-CoA synthetase; TrC, triacsin C; SAT, saturated intermediates; UNSAT, unsaturated intermediates; DGAT, acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase; TAG, triacylglycerol; LD, lipid droplets; VLDL, very low density lipoproteins; IRE1, inositol requiring enzyme 1; PERK, RNAdependent protein kinase-like ER eukaryotic initiation factor-2α kinase; Cyt C, cytochrome C.

Παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες του συγκεκριμένου κυτταρικού μοντέλου απέχουν αρκετά από τις επικρατούσες συνθήκες *in vivo*, διατροφή επίμυων πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά προκάλεσε παρόμοια χαρακτηριστικά στρες ενδοπλασματικού δικτύου και απόπτωσης στα κύτταρα του ήπατος (Wang et al., 2006). Αντίθετα, η εκδήλωση αυτών των φαινομένων δεν ήταν εμφανής στα ζώα που η δίαιτά τους ήταν υψηλή σε ακόρεστα λιπαρά. Επιπρόσθετα, φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α, χαρακτηριστικό γνώρισμα της ενεργοποίησης του βραχίονα της PERK, παρατηρήθηκε πρόσφατα σε ασθενείς με NAFLD και NASH (Puri et al., 2008).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν πως κομβικό σημείο στην πρόκληση τοξικότητας από τα κορεσμένα λιπαρά, αποτελεί η διακοπή της διαδικασίας σύνθεσης τριγλυκεριδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Προτείνεται, πως ο σχηματισμός μιας μη ρευστής δεξαμενής κορεσμένων ενδιάμεσων λιπιδίων κάνει τα μόρια αυτά μη προσβάσιμα στα ένζυμα του μηχανισμού σύνθεσης, ενώ συγκεκριμένα επίπεδα ακορεστότητας-ρευστότητας φαίνεται να είναι απαραίτητα για την φυσιολογική εξέλιξη της πορείας. Αύξηση του βαθμού κορεσμού των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να διαταράξει την ακεραιότητα και λειτουργικότητα του οργανιδίου, οδηγώντας τελικά σε στρες ενδοπλασματικού δικτύου και απόπτωση. Η αναγνώριση των συγκεκριμένων ενδιάμεσων λιπιδίων και η ταυτοποίηση των σχηματιζόμενων δομών από αυτούς τους μεταβολίτες μπορεί να οδηγήσει σε νέες φαρμακολογικές προσεγγίσεις για την διαχείριση της μη-αλκοολικής λιπώδους εκφύλισης του ήπατος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά προκαλεί ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό του αίματος, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της απορρόφησής τους, καθώς και στη συσσώρευσή τους στους μη λιπώδεις ιστούς. Η συνεχής συσσώρευση λιπιδίων στη μορφή σταγονιδίων λίπους έχει προταθεί ότι οδηγεί σε δυσλειτουργία των ηπατοκυττάρων με επακόλουθο την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων (λιποτοξικότητα). Ο όρος μη-αλκοολική λιπώδης εκφύλιση του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός φάσματος τέτοιων καταστάσεων και περιλαμβάνει την πορεία εξέλιξης, από την απλή δημιουργία του λιπώδους ήπατος στην ανάπτυξη πιο σοβαρών σταδίων, όπως η στεατοηπατίδα (Non Alcoholic Steatohepatitis, NASH), η κίρρωση ακόμα και η καρκινογένεση. Σύμφωνα με την υπόθεση των δύο χτυπημάτων, η εξέλιξη της NAFLD σε στεατοηπατίτιδα απαιτεί δύο χτυπήματα. Το πρώτο χτύπημα θεωρείται ότι είναι η αθρόα προσέλευση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ηπατοκυτταρικής στεάτωσης. Η συσσώρευση σταγονιδίων λίπους αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας, το οποίο όμως δεν φαίνεται να είναι αρκετό να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και ίνωση. Παρόλο που το δεύτερο χτύπημα δεν είναι γνωστό, ένα πιθανό δεύτερο χτύπημα υπεύθυνο για την εξέλιξη της ασθένειας, θεωρείται ότι είναι η ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στο λιπώδες ήπαρ.

Παρά τη μεγάλη επικράτηση της NAFLD και τις επιπτώσεις της στην παγκόσμια υγεία, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί, υπεύθυνοι για την ανάπτυξη της ασθένειας, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μεταφορά της υπόθεσης των δύο χτυπημάτων σε μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας, με σκοπό τη μελέτη του ρόλου των ελεύθερων λιπαρών οξέων και του οξειδωτικού στρες στον μηχανισμό πρόκλησης λιποτοξικότητας. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιηθήκαν ανθρώπινες ηπατοκυτταρικές σειρές, οι οποίες και εκτέθηκαν σε δύο από τα πιο πλούσια λιπαρά οξέα της δυτικής δίαιτας. Το κορεσμένο στεατικό οξύ (18:0) που συναντάνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις τροφές ζωικής προέλευσης και το αντίστοιχο μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1, cis) που αποτελεί την κύρια λιπιδιακή συνιστώσα του ελαιολάδου.

Πιο συγκεκριμένα, ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepG2 εκτέθηκαν σε κορεσμένο στεατικό οξύ (18:0), μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1, cis) καθώς και σε συνδυασμούς των δύο λιπαρών οξέων και μελετήθηκε λεπτομερώς, η επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, στη δημιουργία στρες ενδοπλασματικού δικτύου και απόπτωσης και στην παραγωγή και συσσώρευση σταγονιδίων λίπους. Παρατηρήθηκε ότι: α) το στεατικό οξύ, και όχι το ελαϊκό, ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκάλεσε το θάνατο των ηπατοκυττάρων, β) ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος παρουσίασε χαρακτηριστικά ανάπτυξης στρες ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδριακού αποπτωτικού θανάτου, γ) η έκθεση σε στεατικό οξύ δεν οδήγησε στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ούτε αύξησε την ευαισθησία του DNA των κυττάρων στην εξωγενή προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, δ) η σύνθεση και συσσώρευση σταγονιδίων λίπους διακόπηκε από τα πρώτα στάδια έκθεσης σε στεατικό οξύ, ενώ η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε κανονικά στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ελαϊκό οξύ, ε) η ταυτόχρονη προσθήκη ελαϊκού οξέος ανέστηλε πλήρως την τοξική δράση του κορεσμένου λιπαρού οξέος σε όλα τα στάδια που μελετήθηκαν και επανέφερε την ικανότητα σύνθεσης τριγλυκεριδίων και παραγωγής σταγονιδίων λίπους, στ) η ενεργοποίηση του ελεύθερου στεατικού οξέος με το συνένζυμο A αποτέλεσε απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση της τοξικής δράσης.

Συγκεντρωτικά φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες δεν διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην λιποτοξική δράση του κορεσμένου λιπαρού οξέος. Τα αποτελέσματα επιδεικνύουν καθαρά, πως το ελεύθερο στεατικό οξύ δεν είναι υπεύθυνο για την πρόκληση τοξικότητας αλλά κάποιο μεταβολικό του προϊόν, που φέρει διαφορετικές ιδιότητες από τους αντίστοιχους μεταβολίτες του ελαϊκού οξέος. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κορεσμένοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του στεατικού οξέος εμποδίζουν και διακόπτουν τη φυσιολογική πορεία σύνθεσης τριγλυκεριδίων, στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και προκαλούν στρες στο οργανίδιο αυτό, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Ταυτόχρονη προσθήκη ελαϊκού οξέος φαίνεται να ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα τις ιδιότητες των μεταβολιτών αυτών, αναστέλλοντας έτσι την τοξική τους δράση. Συμπερασματικά προτείνεται ότι, η αναστολή της σύνθεσης τριγλυκεριδίων αποτελεί το κομβικό εναρκτήριο γεγονός της λιποτοξικής δράσης του κορεσμένου στεατικού οξέος.

SUMMARY

Diet rich in fat causes qualitative and quantitative changes in serum free fatty acid levels and increases the rate of uptake and accumulation of lipids in non-adipose tissues such as liver. Inappropriate accumulation of excess lipids into liver cells, in the form of lipid droplets, has been proposed to lead to dysfunction of hepatocytes and, consequently, to serious pathological complications (lipotoxicity). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a term used to characterize a spectrum of pathological changes ranging from simple fatty infiltration (steatosis) to hepatic steatosis accompanied with inflammation, fibrosis, and cirrhosis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH). According to the two hit hypothesis, the progression of the disease to steatohepatitis requires two hits. The “first hit” apparently constitutes the deposition of triglycerides in the form of lipid droplets, in the cytoplasm of hepatocytes, during sustained elevation of free fatty acid levels in serum. This leads to hepatocellular steatosis. Steatosis constitutes the hallmark of the disease, but it appears that a second hit is necessary, capable of inducing cell death, inflammation and fibrosis. Although the nature of the “second hit” is essentially unknown, it is often assumed to be connected with ensuing exposure of the steatotic liver to increased levels of oxidative stress. Despite the high prevalence of NAFLD and its potential for serious complications, the underlying molecular mechanisms that determine the progression to liver damage remain poorly understood and need further investigation. The aim of the present study was to create a model of the two hit hypothesis, using human hepatocytes in culture, in order to investigate the role of free fatty acids and oxidative stress in the process of lipotoxicity. For this reason, human hepatocyte cell cultures were exposed to two of the most abundant fatty acids in the western diet. Saturated stearic acid (18:0), which appears in high concentrations in animal based diets and the respective monounsaturated oleic acid (18:1, cis), the main lipid species in olive oil.

In detail, HepG2 human liver cells were exposed to stearate, oleate, or mixtures of the two fatty acids and the effects on cell proliferation and viability, reactive oxygen species (ROS) generation, induction of ER stress and apoptosis and lipid droplet accumulation, were evaluated. It was observed that: a) stearate, but not oleate, inhibited cell proliferation and induced cell death, b) stearate-induced cell death had the characteristics of ER stress- and mitochondrial-mediated apoptosis, c) stearate-treated cells did not produce ROS and untreated and fatty acid-treated cells were equally sensitive

against DNA damage, induced by subsequent exposure to hydrogen peroxide, d) the capacity of cells to produce and accumulate triglycerides in the form of lipid droplets was hindered at an early phase following exposure to stearate, while it proceeded normally in oleate-treated cells, e) Co-administration of oleate restored the ability of stearate-treated cells for triglyceride synthesis and lipid droplet formation and protected cells from stearate-induced toxicity at all steps, e) activation of stearate, in the form of stearyl-CoA, was a necessary step for the manifestation of toxicity.

Collectively, the data suggest that oxidative stress does not represent a significant contributor in saturated fatty acid-induced liver toxicity. The results indicate that it is not free stearate per se, but one or more of its specific metabolic products, with different properties than oleate metabolites, which are responsible for inducing cell toxicity. It is proposed that these saturated lipid intermediates of stearate hinder and then interrupt the process of triglyceride synthesis in endoplasmic reticulum (ER) membranes and induce ER stress, leading ultimately in mitochondrial-mediated apoptotic cell death. Co-administration of oleate appears to modulate the physical properties of these metabolites, inhibiting in this way their toxic effect. In conclusion, it is suggested that interruption of triglyceride synthesis constitutes the key initiating event, in the process of saturated fatty acid-induced lipotoxicity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, L.A., Sanderson, S., Lindor, K.D., and Angulo, P. (2005). The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 42, 132-138.

Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J.L., Elmi, N., Bronk, S.F., Kohno, S., Charlton, M.R., and Gores, G.J. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* 52, 586-593.

Albano, E., Mottaran, E., Vidali, M., Reale, E., Saksena, S., Occhino, G., Burt, A.D., and Day, C.P. (2005). Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 54, 987-993.

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J.C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276, 11615-11623.

Antunes, F., and Cadenas, E. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free radical biology & medicine* 30, 1008-1018.

Aoki, H., Kang, P.M., Hampe, J., Yoshimura, K., Noma, T., Matsuzaki, M., and Izumo, S. (2002). Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277, 10244-10250.

Barbouti, A., Doulias, P.T., Zhu, B.Z., Frei, B., and Galaris, D. (2001). Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 31, 490-498.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

Bogoyevitch, M.A., and Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1061-1095.

Borradaile, N.M., Han, X., Harp, J.D., Gale, S.E., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2006). Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 47, 2726-2737.

- Bruce, J.S., and Salter, A.M. (1996). Metabolic fate of oleic acid, palmitic acid and stearic acid in cultured hamster hepatocytes. *Biochem J* 316 (Pt 3), 847-852.
- Cano, E., and Mahadevan, L.C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20, 117-122.
- Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Munshi, N., Kharbanda, S., and Anderson, K.C. (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 278, 17593-17596.
- Chavez, J.A., and Summers, S.A. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1801, 252-265.
- Chen, Y.R., and Tan, T.H. (2000). The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol* 16, 651-662.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J., and Tan, T.H. (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271, 31929-31936.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.
- Chevion, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med* 5, 27-37.
- Clark, J.M., Brancati, F.L., and Diehl, A.M. (2003). The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 98, 960-967.
- Coleman, R., and Bell, R.M. (1976). Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J Biol Chem* 251, 4537-4543.
- Coleman, R.A., Lewin, T.M., Van Horn, C.G., and Gonzalez-Baro, M.R. (2002). Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* 132, 2123-2126.
- Coll, T., Eyre, E., Rodriguez-Calvo, R., Palomer, X., Sanchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M. (2008). Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283, 11107-11116.

- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 317-332.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Day, C.P., and James, O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., and May, W.S., Jr. (2001). Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 276, 23681-23688.
- Despres, J.P., Arsenault, B.J., Cote, M., Cartier, A., and Lemieux, I. (2008). Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century? *Can J Cardiol* 24 Suppl D, 7D-12D.
- Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.
- Diakogiannaki, E., Dhayal, S., Childs, C.E., Calder, P.C., Welters, H.J., and Morgan, N.G. (2007). Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* 194, 283-291.
- Diakogiannaki, E., Welters, H.J., and Morgan, N.G. (2008). Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 197, 553-563.
- Donovan, N., Becker, E.B., Konishi, Y., and Bonni, A. (2002). JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem* 277, 40944-40949.
- Doulias, P.T., Christoforidis, S., Brunk, U.T., and Galaris, D. (2003). Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free radical biology & medicine* 35, 719-728.
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27, 79-101.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

- Erickson, S.K. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S412-416.
- Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Tanai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D., and Gores, G.J. (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437-443.
- Fujimoto, Y., Onoduka, J., Homma, K.J., Yamaguchi, S., Mori, M., Higashi, Y., Makita, M., Kinoshita, T., Noda, J., Itabe, H., *et al.* (2006). Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull* 29, 2174-2180.
- Galaris, D., and Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45, 1-23.
- Gentile, C.L., and Pagliassotti, M.J. (2008). The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 19, 567-576.
- Goldberg, E.M., Lester, D.S., Borchardt, D.B., and Zidovetzki, R. (1994). Effects of diacylglycerols and Ca²⁺ on structure of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers. *Biophys J* 66, 382-393.
- Goldberg, E.M., and Zidovetzki, R. (1997). Effects of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys J* 73, 2603-2614.
- Gomez-Lechon, M.J., Donato, M.T., Martinez-Romero, A., Jimenez, N., Castell, J.V., and O'Connor, J.E. (2007). A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 165, 106-116.
- Gubern, A., Casas, J., Barcelo-Torns, M., Barneda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M.A., and Claro, E. (2008). Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* 283, 27369-27382.
- Guo, W., Huang, N., Cai, J., Xie, W., and Hamilton, J.A. (2006). Fatty acid transport and metabolism in HepG2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G528-534.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (1982). The role of the superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline complex. *Biochem Pharmacol* 31, 2801-2805.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N.J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271, 4138-4142.
- Halliwell, B., and Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9-19.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85.
- Hass, U. (2003). Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett* 140-141, 155-159.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* *10*, 3787-3799.

Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* *274*, 962-971.

Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* *186*, 323-331.

Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* *313*, 104-107.

Hotamisligil, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* *140*, 900-917.

Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* *273*, 10777-10783.

Iordanov, M.S., and Magun, B.E. (1999). Different mechanisms of c-Jun NH₂-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors. *J Biol Chem* *274*, 25801-25806.

Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* *88*, 347-354.

Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* *275*, 31199-31203.

Johnson, G.L., and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1341-1348.

Jornot, L., Petersen, H., and Junod, A.F. (1998). Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J* *335* (Pt 1), 85-94.

Jung, T.W., Lee, Y.J., Lee, M.W., and Kim, S.M. (2009). Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH₂ terminal kinase. *FEBS J* *276*, 2278-2284.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., *et al.* (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* *275*, 322-327.

Kim, B.J., Ryu, S.W., and Song, B.J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281, 21256-21265.

Kokame, K., Kato, H., and Miyata, T. (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* 276, 9199-9205.

Krahmer, N., Guo, Y., Farese, R.V., Jr., and Walther, T.C. (2009). SnapShot: Lipid Droplets. *Cell* 139, 1024-1024 e1021.

Lai, E., Bikopoulos, G., Wheeler, M.B., Rozakis-Adcock, M., and Volchuk, A. (2008). Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E540-550.

Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448-7459.

Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.

Li, Z., Berk, M., McIntyre, T.M., Gores, G.J., and Feldstein, A.E. (2008). The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 47, 1495-1503.

Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 284, 5637-5644.

Liang, H., and Fesik, S.W. (1997). Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol* 274, 291-302.

Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., and Shanklin, J. (1996). Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J* 15, 4081-4092.

Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Jr., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077-3082.

Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., and Oh, B.J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55, 434-438.

Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patane, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., *et al.* (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51, 1437-1442.

- Madan, K., Bhardwaj, P., Thareja, S., Gupta, S.D., and Saraya, A. (2006). Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* 40, 930-935.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 281, 12093-12101.
- Malhi, H., and Gores, G.J. (2008a). Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134, 1641-1654.
- Malhi, H., and Gores, G.J. (2008b). Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 28, 360-369.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 9, 2277-2293.
- Mansbach, C.M., 2nd, and Gorelick, F. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G645-650.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2001). Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem* 130, 1-8.
- Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2005). Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7, 472-481.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-1259.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Melidou, M., Riganakos, K., and Galaris, D. (2005). Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med* 39, 1591-1600.
- Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23, 783-792.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A., and Saikumar, P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276, 18361-18374.

Moffitt, J.H., Fielding, B.A., Evershed, R., Berstan, R., Currie, J.M., and Clark, A. (2005). Adverse physicochemical properties of tripalmitin in beta cells lead to morphological changes and lipotoxicity in vitro. *Diabetologia* 48, 1819-1829.

Morgan, N.G., Dhayal, S., Diakogiannaki, E., and Welters, H.J. (2008). The cytoprotective actions of long-chain mono-unsaturated fatty acids in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36, 905-908.

Mori, T., Takai, Y., Yu, B., Takahashi, J., Nishizuka, Y., and Fujikura, T. (1982). Specificity of the fatty acyl moieties of diacylglycerol for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biochem* 91, 427-431.

Mu, Y.M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C.H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., *et al.* (2001). Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 142, 3590-3597.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., *et al.* (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 48, 1-26.

Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H., and Mori, K. (2007). Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27, 1027-1043.

Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40, 1-6.

Namatame, I., Tomoda, H., Arai, H., Inoue, K., and Omura, S. (1999). Complete inhibition of mouse macrophage-derived foam cell formation by triacsin C. *J Biochem* 125, 319-327.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153, 1011-1022.

Ogden, C.L., Carroll, M.D., Curtin, L.R., Lamb, M.M., and Flegal, K.M. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. *JAMA* 303, 242-249.

Ostrander, D.B., Sparagna, G.C., Amoscato, A.A., McMillin, J.B., and Dowhan, W. (2001). Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276, 38061-38067.

Panayiotidis, M., Tsolas, O., and Galaris, D. (1999). Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 26, 548-556.

- Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13, 349-355.
- Paton, C.M., and Ntambi, J.M. (2009). Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E28-37.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., and Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3012-3017.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118, 829-838.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M., and Sanyal, A.J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134, 568-576.
- Putchu, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., *et al.* (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899-914.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11, 372-380.
- Rocchini, A.P. (2002). Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med* 346, 854-855.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Ross, G.M., McMillan, T.J., Wilcox, P., and Collins, A.R. (1995). The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 337, 57-60.
- Rutkowski, D.T., and Hegde, R.S. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189, 783-794.
- Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., and Clore, J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120, 1183-1192.

Sauerwein, H.P. (2006). The dysmetabolic syndrome: epidemiology and etiology. Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme *11*, 1-9; discussion 9-13.

Schaffer, J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* *14*, 281-287.

Schroeter, H., Boyd, C.S., Ahmed, R., Spencer, J.P., Duncan, R.F., Rice-Evans, C., and Cadenas, E. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J* *372*, 359-369.

Seki, S., Kitada, T., and Sakaguchi, H. (2005). Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatology* *33*, 132-134.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* *3*, 99-111.

Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *90*, 1031-1039.

Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* *311*, 617-631.

Sluss, H.K., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol* *14*, 8376-8384.

Soupe, E., and Kuypers, F.A. (2008). Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)* *233*, 507-521.

Spector, A.A., and Yorek, M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* *26*, 1015-1035.

Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* *18*, 321-336.

Susca, M., Grassi, A., Zauli, D., Volta, U., Lenzi, M., Marchesini, G., Bianchi, F.B., and Ballardini, G. (2001). Liver inflammatory cells, apoptosis, regeneration and stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* *33*, 768-777.

Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 85-96.

Te Sligte, K., Bourass, I., Sels, J.P., Driessen, A., Stockbrugger, R.W., and Koek, G.H. (2004). Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med* *15*, 10-21.

- Tenopoulou, M., Doulias, P.T., Barbouti, A., Brunk, U., and Galaris, D. (2005). Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 387, 703-710.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2008). Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19, 371-379.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
- Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164, 341-346.
- Unger, R.H., and Orci, L. (2002). Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* 1585, 202-212.
- Unger, R.H., Zhou, Y.T., and Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2327-2332.
- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., *et al.* (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Wang, D., Wei, Y., and Pagliassotti, M.J. (2006). Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 147, 943-951.
- Wilson, D.J., Fortner, K.A., Lynch, D.H., Mattingly, R.R., Macara, I.G., Posada, J.A., and Budd, R.C. (1996). JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 26, 989-994.
- Wu, X., Zhang, L., Gurley, E., Studer, E., Shang, J., Wang, T., Wang, C., Yan, M., Jiang, Z., Hylemon, P.B., *et al.* (2008). Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhethinic acid through lysosomal and mitochondrial pathways. *Hepatology* 47, 1905-1915.
- Xue, X., Piao, J.H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., Yagita, H., Okumura, K., Harding, H., and Nakano, H. (2005). Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 280, 33917-33925.

Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Yen, C.L., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V., Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49, 2283-2301.

Yesilova, Z., Yaman, H., Oktenli, C., Ozcan, A., Uygun, A., Cakir, E., Sanisoglu, S.Y., Erdil, A., Ates, Y., Aslan, M., *et al.* (2005). Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 100, 850-855.

Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *FEBS J* 274, 630-658.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.

Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F., and Woodgett, J.R. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 6, 606-613.

Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.

Zimmet, P., Alberti, K.G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15, 1481-1486.