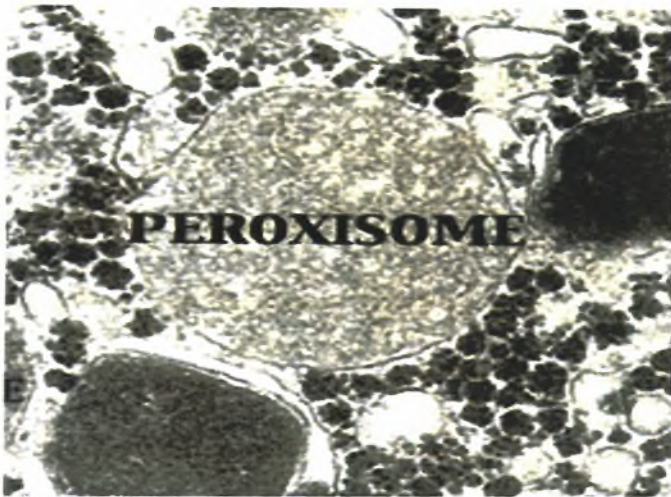


## Απομόνωση και χαρακτηρισμός των υπεροξυσωματίων από το ήπαρ υγιών αρουραίων.



Γιουβανούδη Ελένη

Μονάδα Βιοχημικής Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο  
Στοκχόλμης, S-106 91 Στοκχόλμη, Σουηδία

Υπεύθυνοι: Καθηγητής Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Joe De Pierre

Καθηγητής B. Dean Nelson



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4438/1  
Ημερ. Εισ.: 27-07-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΓΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087929

# Περιεχόμενα

- I. Εισαγωγή
  
- II. Υλικά και μέθοδοι
  - a. απομόνωση των υπεροξεισωματίων
  - b. ενζυμικές δοκιμασίες
  - c. western blotting
  - d. ηλεκτροφόρηση gel δύο διαστάσεων (2-D gel)
  - e. χρωματισμός του 2-D gel
  
- III. Αποτελέσματα & Συζήτηση
  - A. Ενζυμικές δοκιμασίες
    - Καταλάση
    - Ουρική Οξειδάση
    - Οξική Φωσφατάση
    - Γλουταμινική Δεϋδρογονάση
  
  - B. Western Blotting
  
  - C. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων
  
- IV. Συμπεράσματα
  
- V. Ευχαριστίες
  
- VI. Αναφορές / Βιβλιογραφία

## Περίληψη

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές για την απομόνωση των υπεροξυσωματίων από το ήπαρ τρωκτικών. Η κάθε μία από αυτές τις τεχνικές παρουσίαζε κάποια μειονεκτήματα, που είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση λίγων, με μη ικανοποιητική ακεραιότητα, αλλά σε υψηλό βαθμό καθαρών υπεροξυσωματίων. Στο παρόν πείραμα εφαρμόστηκε μια καινούρια τεχνική για την απομόνωση των υπεροξυσωματίων από το ήπαρ αρουραίων. Ενζυμικοί δείκτες καθώς και Western blotting ήταν οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό και τη μέτρηση των υπεροξυσωματίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπεροξυσωματιακή στοιβάδα περιείχε πολύ χαμηλά επίπεδα λυσοσωματίων, αλλά αρκετά μιτοχόνδρια και υπολείμματα από ενδοπλασματικό δίκτυο. Στις περαιτέρω αναλύσεις με ηλεκτροφόρηση διπλής ανάλυσης και χρώσης της πηκτής με τη χρωστική Coomassie brilliant blue, χρώσης της με άργυρο (silver staining) και με τις φθορίζουσες χρωστικές Cy3 και Cy5, είναι εύκολος ο εντοπισμός και η ανάλυση των πρωτεϊνών των απομονωμένων υπεροξυσωματίων.

Απομονωμένα υπεροξυσωμάτια με καλά διατηρημένη δομή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για περαιτέρω μελέτες της λειτουργίας του οργανιδίου και σε μελέτες των ενζύμων με πολλαπλές υποκυτταρικές και σε διάφορα οργανίδια εντοπίσεις.

## Abstract

A number of procedures for isolating peroxisomes from rodent liver have been developed during the past two decades, each with its own limitation, most often resulting in highly purified peroxisomes, but in low yield and with unsatisfactory intactness. In the present investigation we have used a new procedure to isolate peroxisomes from rat liver. Using marker enzyme assays and Western blotting, we have shown that the peroxisomal fraction obtained with this procedure contains very low levels of lysosomes, but significant amounts of mitochondria and endoplasmic reticulum. Following two-dimensional gel electrophoresis and subsequent staining of the gels with Coomassie blue, silver or Cy5 and Cy 3 fluorescent dyes, we could easily detect the peroxisomal proteins for future identification by mass spectrometry. Highly purified and structurally well preserved peroxisomes should be useful in further elucidation of the function of this organelle and, especially, in studies of peroxisomal enzymes with multiple subcellular and suborganellar localizations.

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

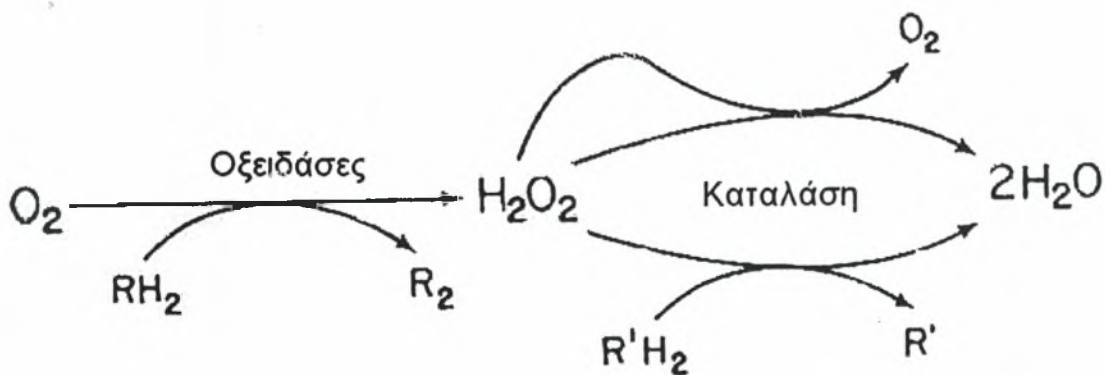
Το υπεροξυσωματίο ανακαλύφθηκε πρώτη φορά από την ομάδα του De Dune, σαν βιοχημική οντότητα (De Dune, C., Bauduin, P., 1966). Είναι ένα υποκυτταρικό οργανίδιο μονής μεμβράνης που βρίσκεται σε πολλούς ιστούς και σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα των ζώων και των φυτών, ενώ παίρνει μέρος σε διάφορες οξειδωτικές ενζυμικές αντιδράσεις, όπως η α- και β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Περιέχει περισσότερα από πενήντα (50) ένζυμα (αριθμός που συνεχώς αυξάνεται), που έχουν σχέση με πολλές μεταβολικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανόμενων της αναπνοής, του καταβολισμού των πουρινών, της αποτοξίνωσης του οργανισμού από την αιθανόλη και της βιοσύνθεσης του πλασμαλογόνου. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις είναι αναγνωρισμένα και καλά χαρακτηρισμένα και βρίσκονται στο εσωτερικό του οργανιδίου. Αυτές οι πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και εισάγονται διαμέσου της μεμβράνης του. Η βιογένεση του οργανιδίου είναι μια διαδικασία που εκτελείται από έναν κυτταρικό μηχανισμό, ο οποίος αποτελείται από περισσότερες από είκοσι πρωτεΐνες, τις υπεροξίνες, που είναι υπεύθυνες για τον εντοπισμό και την εισαγωγή των υπεροξυσωματιακών πρωτεϊνών. Η καταλάση είναι το πιο σημαντικό ένζυμο του οργανιδίου γιατί καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό και με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στην αποτοξίνωση του κυττάρου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

#### *Λειτουργίες:*

Πολλές από τις βιοχημικές αντιδράσεις των υπεροξυσωματίων είναι οξειδωτικές και λειτουργούν σε καταβολικά μονοπάτια. Μερικές, ωστόσο, είναι αναβολικές αντιδράσεις, ενώ κάποια από τα τελικά προϊόντα αυτών των αντιδράσεων χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία για τις διάφορες αναβολικές αντιδράσεις σε άλλα μέρη του κυττάρου.

## Αναπνοή

Το αναπνευστικό μονοπάτι των υπεροξυσωματίων ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε από τον De Dune και τους συνεργάτες του (de Dune, C., and Baudhuin, P. 1966). Αποτελείται από μια ομάδα οξειδασών που χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο για να οξειδώσουν άμεσα μια ποικιλία από υποστρώματα, με την τελική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Στη συνέχεια, με τη σειρά της η καταλάση διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο και νερό. Στα υποστρώματα των οξειδασών συμπεριλαμβάνονται το γαλακτικό, γλυκολικό και άλλα α-υδροξυ οξέα, το ουρικό οξύ, D-αμινοοξέα και πολυαμίνες, όπως είναι η σπερμίνη (Holta, E. 1977). Η διάσπαση του  $H_2O_2$  από την καταλάση, μπορεί να συμβαίνει με δύο μηχανισμούς: 1) με δράση καταλάσης και 2) με υπεροξειδωτική αντίδραση (σχήμα 1). Υποστρώματα για την υπεροξειδωση περιλαμβάνουν αλκοόλη, μυρμηγκικό οξύ, νιτρικά και κινόνες. Οι υπεροξειδωτικές αντιδράσεις ευνοούνται από τις συνθήκες που επικρατούν μέσα στα υπεροξυσωμάτια, δηλαδή, μεγάλη συγκέντρωση καταλάσης και μικρός αλλά σταθερός σχηματισμός  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  πιθανώς να καταστρέφεται υπεροξειδωτικά, στο επίπεδο που υπάρχει κατάλληλο υπόστρωμα. Μεγάλη ποσότητα  $H_2O_2$  διασπάται από την καταλάση.



Σχήμα 1: Το αναπνευστικό μονοπάτι των υπεροξυσωματίων

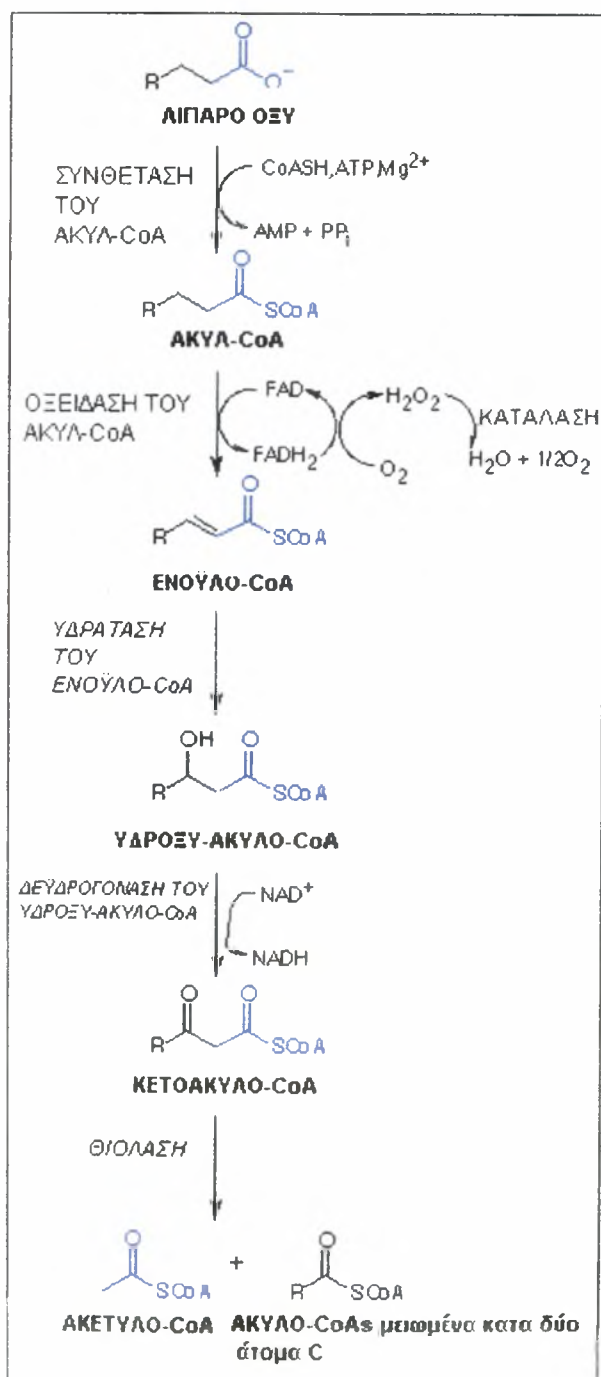
Η υπεροξυσωματιακή αναπνοή διαφέρει σε πολλά σημεία από τη μιτοχονδριακή αναπνοή. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την υπεροξυσωματιακή οξείδωση δεν μετατρέπεται σε ATP, όπως γίνεται στα μιτοχόνδρια, αλλά απελευθερώνεται σαν θερμότητα στο περιβάλλον. Αυτές οι



αντιδράσεις συμβάλλουν στο φαινόμενο της θερμογένεσης. Η κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου των υπεροξυσωματίων δεν μπλοκάρεται από κυανιούχα και δεν είναι ευαίσθητο στον αναπνευστικό έλεγχο. Η φυσιολογική δραστηριότητα της υπεροξυσωματικής αναπνοής έχει υπολογιστεί ότι καταναλώνει μόλις το 20% του οξυγόνου του ήπατος.

## Μεταβολισμός λιπιδίων

### β-οξειδωση λιπαρών οξέων



Τα υπεροξυσωμάτια καταλύουν την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων μέσω ενός μονοπατιού (σχήμα 2). Η συνθετάση των λιπαρών οξέων προσθέτει μία CoA ομάδα σε ελεύθερο λιπαρό οξύ. Το βήμα αυτό προϋποθέτει ATP, CoASH καθώς και ιόντα μαγνησίου (Uchiyama A. et al. 1996). Η μακριά αλυσίδα του άκυλο-CoA είναι το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι το ακέτυλο-CoA. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχηματίζεται στην πρώτη αντίδραση αυτής της αλυσίδας αντιδράσεων. Η καταλάση μετατρέπει το τοξικό υπεροξειδίο του υδρογόνου που σχηματίστηκε από την οξειδάση του ακυλοσυνενζύμου A σε νερό και οξυγόνο (Fahimi HD. 1969).

Σχήμα 2: μονοπάτι β' οξειδωσης λιπαρών οξέων των υπεροξυσωματίων

Αυτό διαφέρει από την αντίστοιχη αντίδραση που λαμβάνει μέρος στα μιτοχόνδρια, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το άκυλο-CoA στην ηλεκτρονιακή αλυσίδα, μέσω φλαβοπρωτεϊνών, που είναι φορείς ηλεκτρονίων. Τα υπεροξυσωμάτια οξειδώνουν κορεσμένα ακυλο-CoA με την αλυσίδα τους να κυμαίνεται από 7-18 ή και περισσότερα άτομα άνθρακα και μακριές αλυσίδες ακόρεστων ακυλο-CoA.

Οι τρεις επόμενες αντιδράσεις της υπεροξυσωματιακής β-οξειδωσης είναι παρόμοιες με αυτές των μιτοχονδρίων, αλλά καταλύονται από ένζυμα με διαφορετικές φυσιολογικές ιδιότητες και που απαιτούν διαφορετικά υποστρώματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το δεύτερο και τρίτο ένζυμο, η κροτωνάση (crotonase) και η δεϋδρογενάση του υδροξυακυλ-CoA (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase), σχηματίζουν μαζί ένα διλειειτουργικό ένζυμο (Dieuaide-Noubhani M, et. al 1997).

Η θειολάση (thiolase) διασπά το κετοακυλ-CoA σε ακετυλ-CoA και ακυλ-CoA, που έχει 2 άτομα άνθρακα λιγότερα (Antonpenkov VD, et al., 1997). Έχουν βρεθεί τουλάχιστον δύο διαφορετικές υπεροξυσωματιακές θειολάσες στα ανθρώπινα κύτταρα.

Σε υγιείς αρουραίους, η απόδοση της υπεροξυσωματιακής β-οξειδωσης είναι περίπου η ίδια σε μέγεθος με την δραστηριότητα της μιτοχονδριακής β-οξειδωσης. Οι ιδιότητες των δύο αυτών συστημάτων προτείνουν ότι μία μιτοχονδριακή λειτουργία είναι να οξειδώνει λιπαρά οξέα για την παραγωγή ενέργειας που είναι απαραίτητη στο ήπαρ, και μία υπεροξυσωματιακή λειτουργία είναι να παρέχει ακετυλ-CoA για τις αναβολικές αντιδράσεις. Υπάρχει αύξηση της υπεροξυσωματιακής β-οξειδωσης από 3-10 φορές σε μελέτες που έγιναν σε γενετικά παχύσαρκους μύες και σε αρουραίους που τους χορηγούσαν μεγάλη ποσότητα τροφής και υπολιπιδαιμικών φαρμάκων.

### *Ενεργοποίηση λιπαρών οξέων*

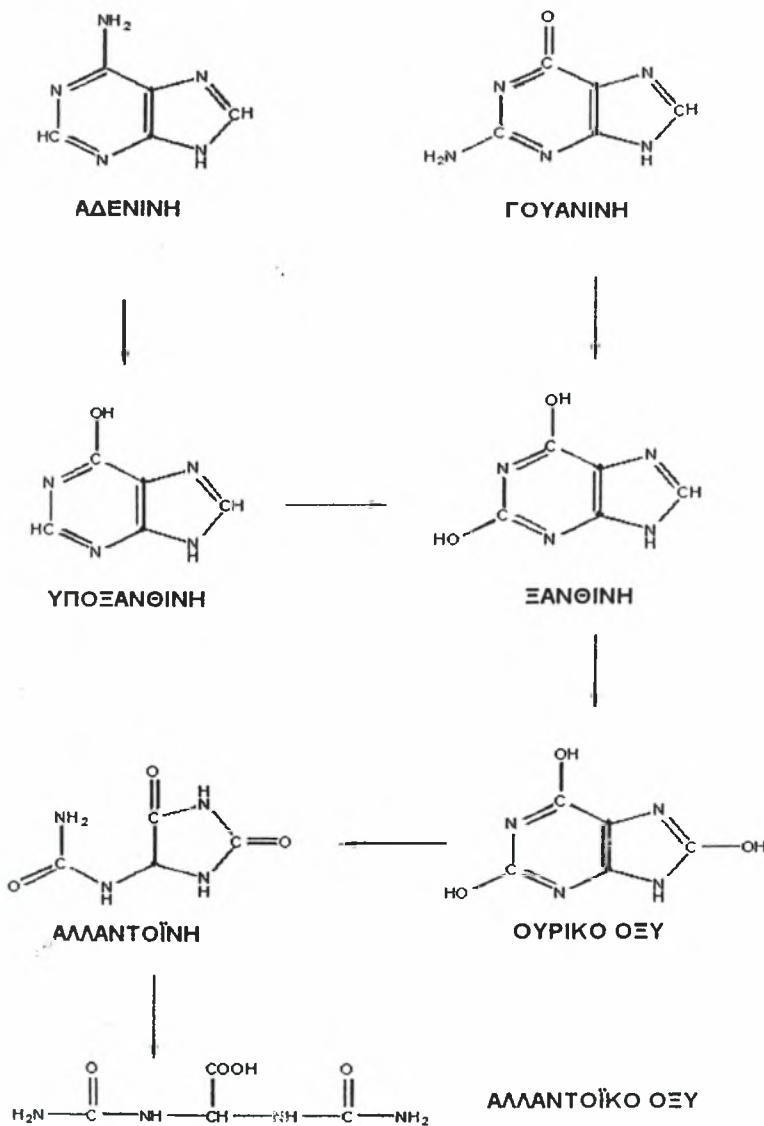
Τα υπεροξυσωμάτια μπορούν να ενεργοποιήσουν τα λιπαρά οξέα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η υπεροξυσωματιακή συνθετάση του ακυλ-CoA δρα στο παλμιτικό και το λαυρικό οξύ, αλλά όχι στα οκτανοϊκά οξέα.

### Καταβολισμός πουρινών

Τα νουκλεοτίδια αρχικά αποικοδομούνται υδρολυτικά προς νουκλεοζίτες, με τη δράση νουκλεοσιδασών (Blackburn, G.M. and Gait, M.J. 1990). Η αδενίνη και η γουανίνη καταβολίζονται σύμφωνα με το σχήμα 3. Έτσι, η αδενίνη απαμινώνεται προς υποξανθίνη με το ένζυμο απαμινάση του αδενυλικού και στη συνέχεια η υποξανθίνη σε ξανθίνη με τη δράση οξειδάσης της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο, το οποίο υπάρχει και σαν δεϋδρογονάση και χρησιμοποιεί  $NAD^+$  σαν δέκτη ηλεκτρονίων, αλλά μπορεί να μετατραπεί και σε οξειδάση, η οποία χρησιμοποιεί ως αποδέκτη ηλεκτρονίων, μοριακό οξυγόνο (Angermuller S, et al., 1987). Η οξειδάση της

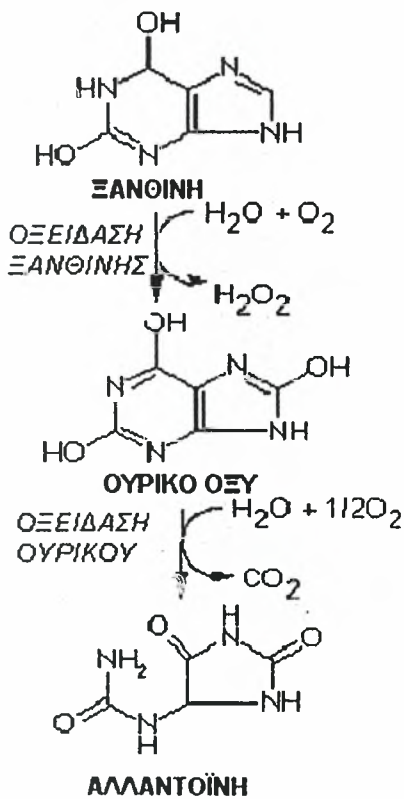


Σχήμα 3: Καταβολισμός πουρινών

ξανθίνης οξειδώνει επίσης, την ξανθίνη σε ουρικό οξύ. Το μοριακό οξυγόνο, το οξειδωτικό και στις δύο αντιδράσεις, ανάγεται προς υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο διασπάται σε νερό και μοριακό οξυγόνο με τη δράση της καταλάσης. Η ξανθίνη είναι επίσης ένα ενδιάμεσο στη δημιουργία του ουρικού από γουανίνη.

Στους ανθρώπους, το ουρικό είναι το τελικό προϊόν της αποικοδόμησης των πουρινών και αποβάλεται με τα ούρα. Υψηλά επίπεδα ουρικού στον ορό προκαλούν ουρική αρθρίτιδα.

Η αποικοδόμηση των πουρινών σε μερικά είδη προχωράει περαιτέρω (Stryer L. 1997). Τα θηλαστικά, εκτός των πρωτευόντων, εκκρίνουν αλλαντοΐνη, η οποία δημιουργείται με οξείδωση του ουρικού, από τη δράση της ουρικάσης, με ταυτόχρονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα. Ως αντιοξειδωτικό, η ουρικάση, πιστεύεται ότι συμβάλλει στην αύξηση της διάρκειας ζωής των πρωτευόντων θηλαστικών σε σχέση με άλλα σπονδυλωτά. Τα ψάρια εκκρίνουν αλλαντοϊκό, το οποίο παράγεται με ενυδάτωση της αλλαντοΐνης, από την αλλαντοϊνάση. Η αποικοδόμηση προχωράει ένα βήμα παραπέρα στα αμφίβια και στα περισσότερα είδη ψαριών. Το αλλαντοϊκό υδρολύεται σε δύο μόρια ουρίας, με τη δράση του ενζύμου αλλαντοϊκάση και ένα μόριο γλυοξυλικού. Τέλος, ασπόνδυλοι θαλάσσιοι οργανισμοί μετατρέπουν και την ουρία σε αμμωνία. Φαίνεται πιθανόν, ότι τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές χάθηκαν σταδιακά κατά την πορεία της εξέλιξης των ανώτερων θηλαστικών.



Έτσι, είναι εμφανές ότι τα υπεροξυσωμάτια παίζουν σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών. Παρ' όλα αυτά, δεν έχει ακόμη βρεθεί κάποιος οργανισμός, στον οποίο να βρίσκονται και τα τέσσερα ένζυμα μέσα στα υπεροξυσωμάτια.

Ανεπάρκεια σε οξειδάση της ξανθίνης (Moriwaki Y, et al., 1999) έχει ως αποτέλεσμα μία ασθένεια που είναι γνωστή ως ξανθινουρία τύπου 1. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ξανθίνης και μειωμένο ουρικό οξύ.

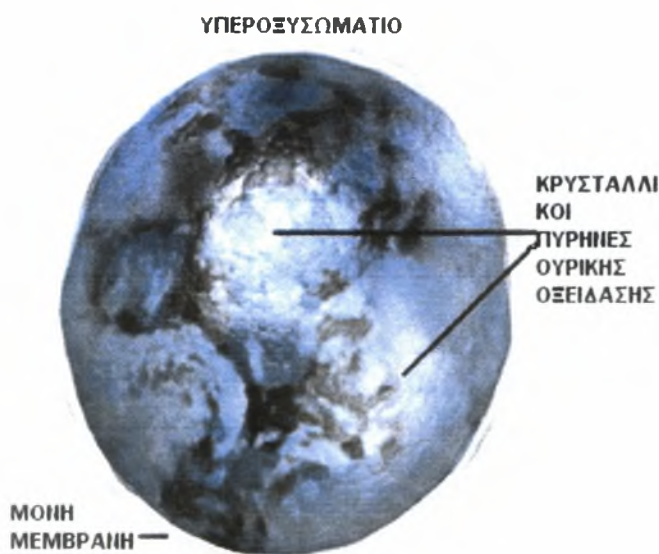
Σχήμα 4: Μεταβολισμός ξανθίνης

### Μορφολογία:

Τα υπεροξυσωμάτια βρίσκονται σε μεγαλύτερο αριθμό και μέγεθος στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, από ότι σε άλλα κύτταρα θηλαστικών. Το σχήμα τους συνήθως είναι σφαιρικό ή ελαφρώς ελλειπτικό και περιβάλλονται από απλή μεμβράνη, έχουν κοκκιώδες κυτταρόπλασμα και σε μερικούς οργανισμούς καλοσχηματισμένο πυρήνα (Θωμόπουλος Γ. 1995). Στο ήπαρ αρουραίων, η διάμετρός τους κυμαίνεται από 0.6-0.7  $\mu\text{m}$ , παρόλο που το μέγεθός τους κυμαίνεται γύρω στα 0.2-1.0  $\mu\text{m}$ . Σύμφωνα με μορφομετρικές αναλύσεις που έχουν γίνει, υπάρχουν 370-620 υπεροξυσωμάτια ανά παρεγχυματικό κύτταρο, και όλα μαζί καταλαμβάνουν περίπου το 1.5-2% του όγκου του κυττάρου.

Σε πολλά ηπατικά υπεροξυσωμάτια υπάρχει πυρήνας. Στο ήπαρ των αρουραίων, ο πυρήνας περιέχει ουρική οξειδάση, η οποία βρίσκεται με τη μορφή κυλινδρικής παρακρυσταλλικής παράταξης από κοίλους σωλήνες (εικόνα 1). Αντίθετα, τα ανθρώπινα ηπατικά υπεροξυσωμάτια δεν έχουν ούτε πυρήνα, ούτε ουρική οξειδάση. Γενικά, υπάρχει καλή συσχέτιση στην παρουσία ουρικής οξειδάσης στα υπεροξυσωμάτια και στην παρουσία πυρήνα, αλλά αυτό δεν είναι πάντα απαραίτητο. Η μορφολογία του πυρήνα

ποικίλει από είδος σε είδος και το σχήμα του μπορεί να είναι εκτός από σφαιρικό, επίμηκες ή με ανώμαλη επιφάνεια. Όταν τα υπεροξυσωμάτια έχουν πυρήνα, τότε μπορεί να είναι ορατά σε ηλεκτρονική μικροσκοπία.



Εικόνα 1: Οι κρυσταλλικοί πυρήνες της ουρικής οξειδάσης

Σε μερικά είδη, τα υπεροξυσωμάτια περιέχουν μια επίπεδη δομή, σαν μικρό πιάτο, με μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων, που βρίσκεται σχεδόν κολλητά στη μεμβράνη. Η δομή αυτή είναι κοινή στα εντομοφάγα ζώα και σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα είδη. Είναι απύσχα στον άνθρωπο καθώς και στα ηπατικά υπεροξυσωμάτια αρουραίων.

Τα υπεροξυσωμάτια τείνουν να βρίσκονται σε ομάδες μέσα στα κύτταρα. Μερικές φορές βρίσκονται να είναι και αλληλοσυνδεόμενα. Αυτό γίνεται συνήθως σε περιόδους πολλαπλασιασμού τους.

Μερικοί μελετητές υποστηρίζουν ότι τα υπεροξυσωμάτια συχνά βρίσκονται να είναι συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ άλλοι, είναι αντίθετοι με αυτή την άποψη. Το σίγουρο είναι, ότι λόγω της φυσιολογικής ομοιότητάς τους, θα πρέπει να συνεργάζονται και σε βιοχημικό επίπεδο (Lazarow, P.B., 1998).

Το σχήμα των υπεροξυσωματίων μπορεί να αλλάξει από την επίδραση άσχετων με αυτά συστατικών, τα οποία μερικές φορές επηρεάζουν το σχήμα τους από πολύ επίμηκες, μέχρι και παράξενα ακανόνιστο. Η ποσότητα και ο τελικός όγκος των υπεροξυσωματίων επηρεάζεται και αυξάνεται από μια ποικιλία υπολιπιδαιμικών φαρμάκων. Αυτή η αύξηση στη μάζα τους, είναι ένα τελείως ξεχωριστό φαινόμενο από τον πολλαπλασιασμό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), που προκαλείται από τη φαινοβαρβιτάλη (Phenobarbital).

#### *Βιογένεση:*

Οι περισσότερες πληροφορίες που παίρνουμε από πειράματα για τη βιογένεση των υπεροξυσωματίων, αντλούνται από μελέτες που έγιναν στην καταλάση, το κυριότερο ένζυμο του οργανιδίου (Roels F 1991). Η καταλάση συντίθεται in vivo στο ήπαρ αρουραίων σαν απομονομερές, το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Μπαίνει στο υπεροξυσωμάτιο, όπου συνδέεται με αίμη και αθροίζεται για να σχηματίσει το ενεργό τετραμερές ένζυμο.

Όταν το mRNA της καταλάσης μεταφράζεται in vitro σε βλαστό σίτου ή σε εκχύλισμα δικτυοκυττάρων, τότε το προϊόν έχει την ίδια μοριακή μάζα με την υπομονάδα ενός ώριμου ενζύμου. Το mRNA της καταλάσης βρίσκεται σε

ελεύθερη μορφή και όχι προσδεμένο σε πολυσώμα. Το ΕΔ φαίνεται ότι δεν παίζει κάποιο ρόλο στη βιογένεση της καταλάσης.

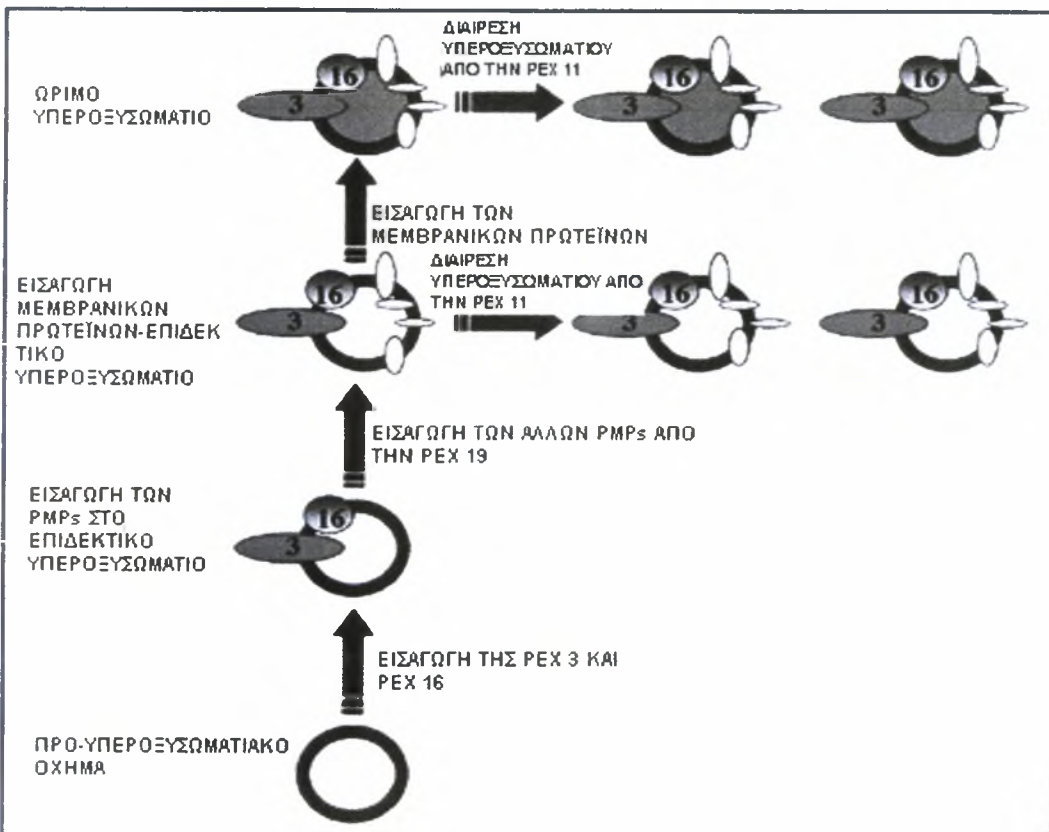
Όλες οι υπεροξυσωματιακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου και μεταφράζονται από ελεύθερα πολυσώματα (Goïdaman et al., 1978; Robbi et al., 1978). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το ίδιο συμβαίνει και για τις υπεροξυσωματιακές μεμβρανικές πρωτεΐνες (PMPs) (Fujiki et al., 1984). Μετά τη σύνθεσή τους στα ελεύθερα πολυσώματα, οι νέες υπεροξυσωματιακές πρωτεΐνες στοχεύουν προς τα υπεροξυσωμάτια και μετά εισάγονται σε προϋπάρχοντα υπεροξυσωμάτια μετα-μεταφραστικά, το οποίο προϋποθέτει ότι η σύνθεση και η εισαγωγή τους είναι διαδοχική διαδικασία και όχι αυθόρμητη. Στις πρωτεΐνες αυτές συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες του πυρήνα, διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο, τα υπεροξυσωμάτια αυξάνουν σε μέγεθος, ενώ η διαδικασία αυτή απαιτεί και την ενσωμάτωση των φωσφολιπιδίων, που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, στην υπεροξυσωματιακή μεμβράνη. Η αύξηση σε μέγεθος των υπεροξυσωματίων μπορεί να συνεχιστεί μέχρι ένα κρίσιμο σημείο, κατά το οποίο το υπεροξυσωμάτιο διαιρείται σε δυο θυγατρικά υπεροξυσωμάτια, τα οποία με τη σειρά τους ακολουθούν την ίδια διαδικασία (Lazarow et al., 1985). Νέα υπεροξυσωμάτια μπορούν να δημιουργηθούν είτε από σχάση παλιών, είτε μεμβράνες και σημαντικές μεμβρανικές πρωτεΐνες από άλλα υποκυτταρικά μέρη, όπως το ΕΔ, οργανώνονται για το σχηματισμό τους (Titorenco et al., 1998).

Μια προηγούμενη υπόθεση για τη βιογένεση των υπεροξυσωματίων υποστήριζε ότι η καταλάση και άλλες διαλυτές υπεροξυσωματιακές πρωτεΐνες απομονώνονται συµμεταφραστατικά μέσα στο ΕΔ (όπως στην περίπτωση των εκκριτικών πρωτεϊνών) και μέσω αυτού μεταναστεύουν σε άλλα μέρη του κυττάρου, όπου συσσωρεύονται και μαζί με άλλες υπεροξυσωματιακές πρωτεΐνες σχηματίζουν τελικά τα υπεροξυσωμάτια (de Duve, C., Baudhuin, P. 1966). Η υπόθεση αυτή, όσο ελκυστική και αν φαινόταν, ύστερα από μια σειρά πειραμάτων, τελικά αποδείχτηκε ότι ήταν λάθος.

Η βιογένεση των υπεροξυσωματίων (σχήμα 5) απαιτεί το σχηματισμό μιας λιπιδιακής διπλοστοιβάδας, την εισαγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσα στη διπλοστοιβάδα και τη μεταφορά των διαλυτών πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης, στο εσωτερικό του οργανιδίου. Η διαδικασία αυτή μελετήθηκε σε

πολλούς οργανισμούς και αναγνωρίστηκαν 24 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες στη βιοσύνθεση του υπεροξυσωματίου (Subramani S. 1998, Hetteema EH, et al., 1999). Τα γονίδια αυτά ονομάζονται γονίδια PEX (PEX1, PEX2, PEX3, κ.λ.π.) και οι πρωτεΐνες τους ονομάζονται υπεροξίνες.

Οι υπεροξίνες μπορούν να διακριθούν σε δύο διακριτές ομάδες: αυτές που συμμετέχουν αποκλειστικά στην εισαγωγή των διαλυτών πρωτεϊνών και αυτές που συμμετέχουν στη βιογένεση της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης.



Σχήμα 5: Η διαδικασία βιογένεσης της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης περιλαμβάνει τα παραπάνω βήματα.

Η διαδικασία βιογένεσης της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης είναι πολύ λιγότερο κατανοητή από ότι η εισαγωγή των πρωτεϊνών μέσα στο οργανίδιο (Veenhuis M., et al. 2000). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει το σχηματισμό της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας και την εισαγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών (PMPs) μέσα στη διπλοστοιβάδα. Μόνο τρεις πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί να συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης de novo (PEX3, PEX16, και PEX19). Μια τέταρτη, η PEX11

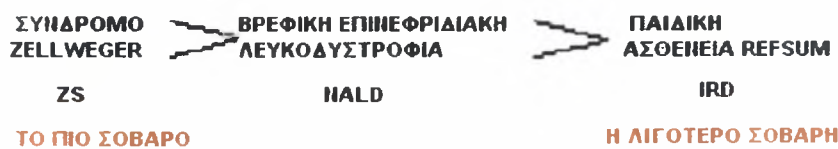


βρέθηκε ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωματίων. Όταν υπερεκφράζεται, προκαλεί μαζικό πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωματίων. Η PEX11 είναι επαγωγίμο ένζυμο και μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό του οργανιδίου ακόμη και αν διεγερθεί εξωτερικά.

Το πρώτο στοιχείο που έδειχνε ότι ο μηχανισμός που συμπεριλαμβάνεται στη βιογένεση της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης είναι τελείως διαφορετικός από αυτόν που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των υπεροξυσωματιακών πρωτεϊνών διαμέσου της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης, ήταν η ανακάλυψη ότι κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με το σύνδρομο Zellweger περιείχαν υπεροξυσωματιακές μεμβρανικές δομές, που λέγονται «φαντάσματα» (ghosts), τα οποία περιέχουν μεν PMPs, αλλά έχουν σχεδόν πλήρη έλλειψη από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Santos et al., 1988).

Μέχρι τώρα, πολλά ερωτήματα, όσον αφορά τη βιογένεση του οργανιδίου έχουν μείνει αναπάντητα. Μερικά από αυτά αφορούν τον τόπο σύνθεσής τους, το χώρο σύνθεσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς και το μηχανισμό εισαγωγής τους στο υπεροξυσωμάτιο.

#### *Υπεροξυσωμάτια και Παθολογία:*



Στον άνθρωπο, δυσλειτουργία του μηχανισμού βιογένεσης των υπεροξυσωματίων έχει ως αποτέλεσμα κληρονομούμενες μεταβολικές και υπεροξυσωματιακές διαταραχές (Braverman N, et al., 1995). Οι υπεροξυσωματιακές διαταραχές χωρίζονται συνήθως σε δυο υποομάδες, που περιλαμβάνουν (i) τις μεταβολικές διαταραχές υπεροξυσωματίων (peroxisome biogenesis disorder PBDs) και (ii) την ανεπάρκεια μιας μόνο υπεροξυσωματιακής πρωτεΐνης. Η έννοια της ασθένειας του Zellweger αποτελείται από τέσσερις διαταραχές: το σύνδρομο Zellweger (Zellweger cerebrohepatorenal syndrome ZS), τη βρεφική επινεφριδιακή λευκοδυστροφία, (neonatal adrenoleukodystrophy NALD), τη παιδική

ασθένεια Refsum (Infantile Refsum disease IRD) και τη χονδροδυσπλασία (rhizomelic chondrodysplasia punctata RCDP). Το σύνδρομο Zellweger, η βρεφική επινεφριδιακή λευκοδυστροφία και η παιδική ασθένεια Refsum είναι καθαρά διαφορετικές από τη χονδροδυσπλασία, ενώ αναφέρονται ως το φάσμα ασθενειών Zellweger, με το σύνδρομο Zellweger να είναι το πιο σοβαρό, και οι άλλες οι λιγότερο σοβαρές ασθένειες (Wanders R.J.A et al., 2004).

Οι διαταραχές αυτές προκαλούνται από λάθη σε κάποιο από τα τουλάχιστον 14 γονίδια που έχουν βρεθεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη σωστή λειτουργία των υπεροξυσωματίων. Μερικά από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για αυτές τις αρρώστιες δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί. Για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στη σύνθεση του οργανιδίου είναι σημαντικό όχι μόνο να μελετηθούν οι πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για τις λειτουργίες τους, αλλά και αυτές που συμμετέχουν στη βιογένεση του οργανιδίου. Η διάκριση μεταξύ αυτών των διαταραχών γίνεται με βάση τη σοβαρότητά τους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαταραχή της λειτουργίας των υπεροξυσωματίων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους (Lazarow, P. B., Moser, H.W. 1995). Μία μετάλλαξη μπορεί να επηρεάζει την κωδικοποίηση των γονιδίων για υπεροξυσωματικά ένζυμα και συνεπώς να σταματήσει πολύ ή λιγότερο σημαντικές λειτουργίες του μεταβολισμού του οργανιδίου. Ακόμα και μία μόνο μετάλλαξη μπορεί επίσης να επηρεάσει την κωδικοποίηση προϊόντος που παίρνει μέρος στον πολλαπλασιασμό και βιογένεση του οργανιδίου (peroxisome-biogenesis disorder, PBD). Τα τμήματα των υπεροξυσωματίων που απομένουν («ghosts»), μπορούν να βρεθούν στα κύτταρα ασθενών ή να έχουν πλήρως εξαφανιστεί (Lazarow, P. B., Moser, H.W. 1995).

### **Υπολιπιδαιμικά φάρμακα και Αθηροσκλήρυνση**

Τα υπεροξυσωματίδια επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από υπολιπιδαιμικά φάρμακα. Η δραστηριότητα της υπεροξυσωματιακής β-οξειδωσης αυξάνεται κατά 8 φορές στο ήπαρ αρουραίων, όταν σε αυτά δίνεται το υπολιπιδαιμικό φάρμακο κλοφιβράτη (clofibrate) για 1 βδομάδα (Page et al. 1997). Άλλα υπολιπιδαιμικά φάρμακα που έχουν διαφορετική δομή (fibric acid) μπορούν

να αυξήσουν τη β-οξειδωση όλου του ήπατος κατά 18 φορές (Page et al. 1997).

Τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα μπορούν επίσης, να αυξήσουν και τη δραστηριότητα άλλων ενζύμων που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό των λιπιδίων, σε διάφορα ηπατικά οργανίδια. Η κλοφιβράτη, είναι παράγωγο του ινικού οξέος, ενός υπολιπιδαιμικού παράγοντα, και ενισχύει την κάθαρση των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Τα παράγωγα αυτά επιτείνουν τη δραστηριότητα της περιφερικής λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, η οποία διευκολύνει την είσοδο τριγλυκεριδίων από τις VLDLs και τα χυλομικρά στους ιστούς-στόχους. Η μεταφορά, επομένως, εστέρων χοληστερόλης από την υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) προς τα πλούσια σε τριγλυκερίδια σωματίδια περιορίζεται, και το περιεχόμενο της HDL σε χοληστερόλη αυξάνεται, ενώ μικρότερα ποσά χοληστερόλης βρίσκονται στην κυκλοφορία με τα αθηρογενετικά υπολειμματικά σωματίδια (Page et al. 1997).

Η ακετυλοτρανφεράση της καρνιτίνης, που βρίσκεται στα υπεροξυσωματίδια, τα μιτοχόνδρια και το ΕΔ, αυξάνεται όσον αφορά το μέγεθός της. Όσο μεγαλύτερη η αλυσίδα, τόσο μικρότερος ο βαθμός αύξησης.

Η κλοφιβράτη προκαλεί στο ήπαρ δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Αυτά τα ένζυμα μπορεί να βρεθούν στο ΕΔ, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσωματίδια, ενώ η δραστηριότητα σε αυτά τα τρία οργανίδια περίπου αυξάνεται όσο αυξάνεται και η δόση του φαρμάκου.

Η κλοφιβράτη προκαλεί επίσης, μέτρια αύξηση στη δραστηριότητα της καταλάσης, αλλά δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της αύξησης αυτής και των υπολιπιδαιμικών ιδιοτήτων του φαρμάκου. Πολλές αναφορές, ωστόσο, συνδέουν τη δραστηριότητα της καταλάσης με την αθηροσκλήρυνση (Summary of the second report of the N-CEP, 1993). Έχει βρεθεί ότι μια καθαρή υπεροξειδωμένη υπομονάδα της καταλάσης, προστατεύει μερικώς τους λαγούς από αθηροσκλήρυνση, η οποία προκλήθηκε από υψηλή διαίτα σε χοληστερόλη.

## Όγκοι

Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωματίων και φυσιολογικές αλλαγές:

### Ενεργοποίηση υποδοχέα

Οι υποδοχείς ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωματίων (Peroxisome proliferator-activated receptors PPARs) αντιπροσωπεύουν παράδειγμα δόσο-εξαρτώμενων μεταβάσεων σε μηχανισμούς τοξικότητας, που μπορεί να μεταφράζονται ως δείκτες στην αξιολόγηση του ρίσκου για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από λιπαρά οξέα και από παράγωγά τους οι οποίοι σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (Lake BG 1995). Έχει αποδειχθεί ότι οι PPARs τροποποιούν την πλειοτροπική δράση των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωματίων, ρυθμίζοντας γονίδια που εμπλέκονται στην ομοιόσταση των λιπιδίων (Ugrea, R., and Bronfman, M.1996).

Ορίζονται ως μια ομάδα από δομικά διαφορετικές ουσίες, οι οποίες διεγείρουν μια σειρά από βιοχημικές και δομικές αλλαγές στα ηπατοκύτταρα τρωκτικών. Ονομάστηκαν «ενισχυτές ή πολλαπλασιαστές υπεροξυσωματίων» λόγω της αύξησης που προκαλούν στον όγκο και την πυκνότητα των υπεροξυσωματίων, όταν εκτεθούν σε αυτά, δηλαδή σε ουσίες όπως ο πλαστικοποιητής DEHP (di-(2-ethylhexyl) phthalate και το υπολιπιδαιμικό φάρμακο κλοφιβράτη, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς για περισσότερο από 40 χρόνια. Η ανακάλυψη τους συνέπεσε χρονικά με την ανακάλυψη μιας κατηγορίας φαρμάκων που προκαλούσαν καρκινικούς όγκους σε ζώα. Αυτά τα φάρμακα ενεργοποιούσαν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωματίων σε κύτταρα στόχους.

Ανάμεσα στις επιπτώσεις που προκαλούν ύστερα από έκθεση σε αυτά τα στοιχεία, είναι και η αύξηση στη μεταβολική ενεργότητα των ενζύμων, ιδιαίτερα σε ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την οξειδωση των λιπιδίων, αύξηση στην ενεργότητα της υπεροξεικογένειας των κυτοχρωμάτων P450 και μείωση στη χοληστερόλη του ορού. Επιπρόσθετα, μερικοί πολλαπλασιαστές υπεροξυσωματίων, όπως το DEHP είναι καρκινογόνοι στα τρωκτικά. Μελέτες στη μορφή δράσης του DEHP, όπως και οι υπόλοιποι πολλαπλασιαστές των

υπεροξυσωματίων, έδειξαν ότι δεν προκαλούσαν τοξικότητα στα τρωκτικά. Μάλλον, γεγονότα κλειδιά στη καρκινογενή διαδικασία είναι το οξειδωτικό στρες, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η αναστολή της απόπτωσης και η ανάπτυξη κλώνων.

Τα γεγονότα αυτά διεγείρονταν από μια διαδικασία που ήταν άγνωστη μέχρι το 1990, όταν οι Issemann και Green (1990) απέδειξαν ότι αυτά τα γεγονότα διεγείρονταν από ένα πυρηνικό υποδοχέα, τον υποδοχέα ενισχυτή υπεροξυσωματίων (PPAR). Η υπεροικογένεια των PPARs αποτελείται από τρεις υποτύπους ή ισομορφές υποδοχέων: τους α, β/δ, και γ. Ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων έχει διαφορετικές φυσιολογικές επιπτώσεις (στους αρουραίους και παρόμοια και στον άνθρωπο). Ενεργοποίηση του α-υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα κανονική αύξηση των υπεροξυσωματίων στο ήπαρ τρωκτικών (αύξηση σε όγκο και πυκνότητα των υπεροξυσωματίων, πολλαπλασιασμός κυττάρων, αναστολή της απόπτωσης, αύξηση σε α/β οξείδωση των λιπαρών οξέων). Ενεργοποίηση του γ-υποδοχέα, σχετίζεται με αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αύξηση της απόπτωσης και διαφοροποίησης των κυττάρων. Οι Issemann και Green (1990) και Issemann et al. (1993) απέδειξαν ότι το mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), το βιολογικά ενεργό προϊόν υδρόλυσης του DEHP, μπορεί να ενεργοποιήσει τον PPARα, αλλά και τον PPARγ (Maloney και Waxman, 1999). Επειδή αυτοί οι δύο υποδοχείς έχουν αντίθετες επιδράσεις στην ανάπτυξη των κυττάρων, παρατηρούνται δοσο-εξαρτώμενες μεταβάσεις σε φυσιολογικές ανταποκρίσεις που βασίζονται στην ενεργοποίηση του κάθε υποδοχέα. Οι βιολογικές επιδράσεις που ενεργοποιούνται από τον PPARγ είναι ανταγωνιστικές της καρκινογένεσης (Eibl et al., 2001; Inoue et al., 2001; Sarrah et al., 1998; Takahashi et al., 1999), ενώ η ενεργοποίηση του PPARα σχετίζεται με ηπατοκυτταρική καρκινογένεση (Peters et al., 1997). Η μετάβαση αυτή μπορεί να σχετίζεται με τη ρύθμιση του ρίσκου από υπολιπιδαιμικά φάρμακα, τα οποία ενεργοποιούν τον PPARα, ή από αντικαρκινικά φάρμακα που ενεργοποιούν τον PPARγ.

Ενεργοποίηση του PPARα είναι το αρχικό γεγονός-κλειδί για την ηπατοκυτταρική ογκογένεση στα τρωκτικά. Οι Issemann και Green (1990) και Hasmall et al. (2000) απέδειξαν ότι το MEHP, που είναι το βιολογικά ενεργό προϊόν υδρόλυσης του DEHP, καθώς και άλλοι ενισχυτές υπεροξυσωματίων,

μπορούν να ενεργοποιήσουν τον PPAR $\alpha$ . Ακολούθως, ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα οδηγεί σε γονιδιακή έκφραση και διέγερση της υπεροξυσωματιακής ενζυμικής δραστηριότητας και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, αυξάνεται η αντιγραφή του DNA και αναστέλλεται η απόπτωση των κυττάρων. Ο συνδυασμός αυτών των γεγονότων οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων στα τρωκτικά, μέσω του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες, το οποίο δεν είναι απόλυτα κατανοητό.

Ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  βρέθηκε ότι δεν σχετίζεται με αύξηση της υπεροξυσωματιακής ενζυμικής δραστηριότητας, αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης ή αναστολή της απόπτωσης. Αντίθετα, ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  οδηγεί σε κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ η έκφρασή του μειώνεται κατά την κυτταρική ανάπτυξη (Gelman et al., 1999; Vamecq και Latruffe, 1999). Αυτό έχει αποδειχθεί για κύτταρα του λιπώδους ιστού (Tontonoz et al., 1994), για τους ινοβλάστες, και μυοκύτταρα (Gelman et al., 1999). Επιπλέον, ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  αναστέλλει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του εντέρου (Vamecq και Latruffe, 1999) και του καρκίνου των πνευμόνων (Chang και Szabo, 2000) μέσω αύξησης της απόπτωσης (Elstner et al., 1998; Kubota et al., 1998). Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  καταστέλλει την αντιγραφή των γονιδίων των παραγόντων πολλαπλασιασμού του κυττάρου, όπως είναι οι AP-1, NF- $\kappa$ B και Stat 1 (Ricote et al., 1999; Desreumaux et al., 2001).

Από πειράματα σε κύτταρα τρωκτικών, έχειδειχθεί ότι ουσίες που είναι αγωνιστές των PPAR $\alpha$  ή των PPAR $\gamma$  μπορεί να δρουν σε θετική συνέργεια σε υψηλές συγκεντρώσεις, δηλαδή, αγωνιστές των PPAR $\alpha$  σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να ενεργοποιήσουν τον PPAR $\gamma$ , και αντίστροφα (Johnson et al., 1997; Maloney and Waxman 1999). Επειδή οι δύο αυτοί υποδοχείς έχουν διαφορετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη των κυττάρων, υπάρχει μια πιθανότητα να τροποποιείται η φυσιολογική ανταπόκριση των κυττάρων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι αγωνιστές του PPAR $\alpha$  διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ίδιοι αυτοί αγωνιστές μπορεί να ενεργοποιούν τον PPAR $\gamma$ , ο οποίος αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Maloney and Waxman 1999). Αντίστροφα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι αγωνιστές του PPAR $\gamma$

αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι ίδιοι αγωνιστές μπορεί να ενεργοποιούν τον PPAR $\alpha$ , ο οποίος διεγείρει την κυτταρική διαίρεση (DeLuca et al., 2000).

Όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να αποδειχθούν χρησιμοποιώντας ανθρώπινους υποδοχείς ή υποδοχείς τρωκτικών που έχουν καλλιεργηθεί *in vitro* και σε κάποια έκταση, σε τρωκτικά *in vivo*. Στοιχεία για μελέτες σε ζώα, υποτίθεται ότι είναι όμοια και για μελέτες στον άνθρωπο, εφόσον οι άνθρωποι ιστοί έχουν υποδοχείς και για τον PPAR $\alpha$  και για τον PPAR $\gamma$  (Auboeuf et al., 1997; Greene et al., 1995; Palmer et al., 1998). Ωστόσο, η σχετική ιστική πυκνότητα των υποδοχέων μπορεί να είναι διαφορετική στους ανθρώπους και στα τρωκτικά. Οι Palmer et al. (1998) απέδειξαν ότι η συγκέντρωση του PPAR $\alpha$  στο ήπαρ ανθρώπου είναι μικρότερη από ότι στο ήπαρ μυών. Αντίθετα, τα επίπεδα του PPAR $\gamma$  σε ανθρώπινους ιστούς είναι υψηλότερα από ότι σε ιστούς τρωκτικών (Vidal-Puig et al., 1997). Επιπλέον, οι άνθρωποι υποδοχείς μπορεί να έχουν διαφορετική συγκέντρωση σε συγγένεια/ενεργοποίηση από ότι οι υποδοχείς τρωκτικών (Maloney and Waxman 1999).

Οι PPARs παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και της ομοιόστασης των λιπιδίων. Εμπλέκονται σε μεγάλο αριθμό ασθενειών όπως, ο διαβήτης, ο καρκίνος και η παχυσαρκία και αποτελούν στόχο των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων.

#### *Υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωματίων- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )*

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη μελέτη του PPAR $\gamma$  λόγω συσχέτισής του με διάφορες αρρώστιες που σχετίζονται με το «μεταβολικό σύνδρομο», όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η υπέρταση (Knouff et al., 2003).

Ο υποδοχέας ενισχυτής υπεροξυσωματίων- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) ανήκει σε μια υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων και ελέγχει την ομοιόσταση της ενέργειας, των λιπιδίων και της γλυκόζης (Chawla et al., 2001; Rosen et al., 2001; Francis et al., 2003; Shearer et al., 2003). Ο PPAR- $\gamma$  μπορεί να προσδένεται σε διάφορες μικρές λιποφιλικές χημικές ενώσεις, οι οποίες

προέρχονται από τον μεταβολισμό και τη διατροφή. Ο PPAR-γ σχηματίζει ετεροδιμερές με τον ρετινοϊκό X υποδοχέα-α (RXRα) και προσδένεται στα PPAR στοιχεία ανταπόκρισης (PPREs) στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων στόχων (Fajas et al., 2002; Fajas et al., 2003).

Στα αποτελέσματα από τη δράση του PPAR-γ διαμεσολαβούν δύο ισομορφές πρωτεΐνης, η ευρέως εκφραζόμενη PPAR-γ1 και η PPAR-γ2. Η έκφραση της κάθε ισομορφής γίνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού εκκινήτη, που παρέχει τις ειδικές για κάθε ιστό ακολουθίες έκφρασης. Οι ισομορφές αυτές παράγονται από ένα μόνο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα και διαφέρουν μόνο στο ότι η PPAR-γ2 φέρει ένα επιπλέον αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο (Zhu et al., 1995; Fajas et al., 1997; Kliewer et al., 1994).

Ο PPAR-γ είναι ο κύριος ρυθμιστής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και της αποθήκευσης ενέργειας και συνεπώς είναι πολύ σημαντικός στον έλεγχο του μεταβολισμού όλου του σώματος. Σύμφωνα με αυτό, ο PPAR-γ αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που προάγουν την αποθήκευση των λιπαρών οξέων, ενώ καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που διεγείρουν τη διαδικασία της λιπόλυσης στα λιποκύτταρα (Auwerx 1999). Ο κύριος ρόλος του PPAR-γ στην λιπογένεση και στη ρύθμιση του μεταβολισμού έχει αποδειχθεί από μια σειρά κυτταρικών, γενετικών και φαρμακολογικών μελετών.

Ο λευκός λιπώδης ιστός (white adipose tissue WAT) απαιτείται για τη σωστή ομοιόσταση της γλυκόζης, επειδή η λιποδυστροφία σχετίζεται με σοβαρή ανθεκτικότητα σε ινσουλίνη (Moitra et al., 1998). Η παρατήρηση ότι οι αγωνιστές του PPAR-γ αυξάνουν το λίπος και βελτιώνουν συγχρόνως τον έλεγχο της γλυκερόλης, υποστηρίζει την άποψη ότι ο WAT διαμεσολαβεί τουλάχιστον σε κάποια φάση της ομοιόστασης της γλυκόζης (Larsen et al., 2003).

Εκτός από το γεγονός ότι ο PPAR-γ έχει σχέση με την ευαισθητοποίηση της ινσουλίνης και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο και στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης. Για παράδειγμα, ο PPAR-γ έχει τη δυνατότητα, όχι μόνο να ρυθμίζει έμμεσα τον καρδιακό μεταβολισμό μέσω του ελέγχου του στα επίπεδα της γλυκόζης και των λιπιδίων, αλλά και συμπεριλαμβάνεται άμεσα στην αθηροσκλήρυνση, ελέγχοντας τις λειτουργίες των μακροφάγων και τον σχηματισμό των αφρώδων κυττάρων (Lee et al., 2002). Ο PPAR-γ εκφράζεται ευρέως στα αφρώδη κύτταρα στα πρίμα



στάδια της αθηροσκλήρυνσης (Tontonoz et al., 1998; Ricote et al., 1998) και η έκφρασή τους διεγείρεται στα ανθρώπινα μονοκύτταρα ύστερα από έκθεση σε οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (oxLDLs). Ο ligand του PPAR-γ επάγει την έκφραση του περισυλλέκτη υποδοχέα CD36, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη πρόσληψη των oxLDLs. Συνεπώς, ο PPAR-γ ρυθμίζει την πρόσληψη του ligand του σε ένα αυτό ρυθμιζόμενο κύκλο των αφρωδών κυττάρων (Nagy et al., 1998).

Πολλές μελέτες συσχετίζουν μια μετάλλαξη του αλληλομόρφου της αλανίνης12 (Ala12) του PPAR-γ με διάφορες μεταβολικές αρρώστιες, όπως είναι η αθηροσκλήρυνση. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μετάλλαξη στην Ala12 του PPAR-γ, μπορεί να προσφέρει ανθεκτικότητα στην αθηροσκλήρυνση, ακόμη και σε μη διαβητικά άτομα και όταν υπάρχει ρίσκο για καρδιακά επεισόδια (Ridker et al., 2003). Τέλος, διάφορες ομάδες εξέτασαν αν υπάρχει συσχέτιση αυτού του αλληλομόρφου με την καρκινογένεση. Μειωμένη έκφραση του PPAR-γ (μέσω αυθόρμητης βιοχημικής μετάλλαξης) έχει σχέση με πιο προηγμένο καρκίνο του μαστού (Jiang et al., 2003), με πολλαπλές μορφές από θυρεοειδή νεοπλασία (Aldred et al., 2003) και με καρκίνο του προστάτη (Mueller et al., 2000).

### *Ηπατώμα Morris*

Το επίπεδο των μορφολογικών διαφορών στο ηπατώμα Morris είναι αντιστρόφως ανάλογος με το ρυθμό αύξησης των ηπατωμάτων. Ανάμεσα σε ποικίλες διαφοροποιήσεις που συμβαίνουν, είναι οι μεγάλες αλλαγές στα υπεροξυσωματίδια, δηλαδή, η μείωση στο μέγεθός τους (στα ηπατώματα με μέσο ρυθμό αύξησης) μέχρι την πλήρη εξαφάνισή τους (στα γρήγορα αναπτυσσόμενα ηπατώματα) (Hu J.J., et al. 1998).

Οι αλλαγές που συμβαίνουν στη ποσότητα των υπεροξυσωματίων συνοδεύονται και από ανάλογες αλλαγές στη δραστηριότητα των υπεροξυσωματιακών ενζύμων. Γενικά, η δραστηριότητα της καταλάσης είναι ανάλογη του αριθμού των υπεροξυσωματίων, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Οι δραστηριότητες της ουρικής οξειδάσης και της D-αμινοοξικής οξειδάσης ακολουθούν και αυτές τη καταλάση, στο ότι είναι πολύ μικρές σε μετρίως αναπτυσσόμενους όγκους, ενώ λείπουν τελείως σε οξείες περιπτώσεις. Σε

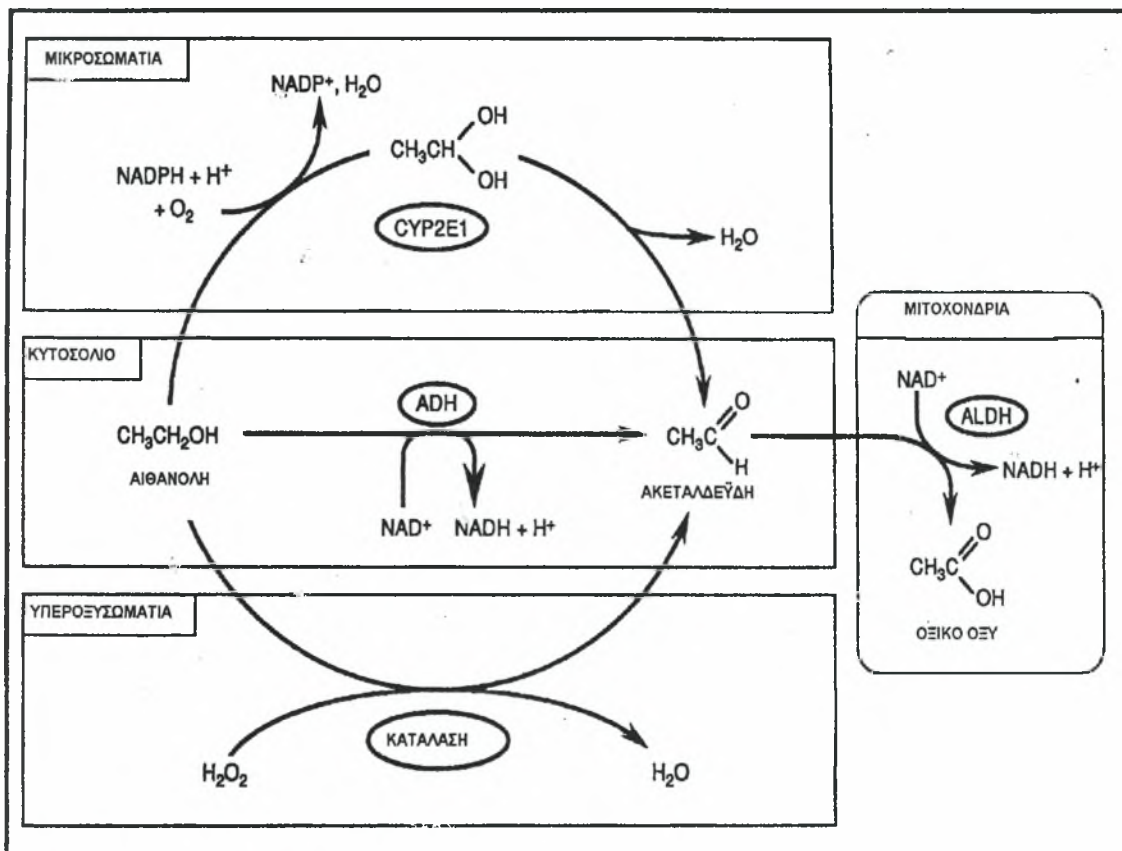
ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους, τα υπεροξυσωμάτια και οι οξειδάσες είναι συνολικά απόντα, ενώ όλη η καταλάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Saccone G.T., Sabine J.R., 1978).

## **Αλκοολισμός**

Αύξηση στην ποσότητα των ηπατικών υπεροξυσωματίων έχει αναφερθεί ύστερα από μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους και αρουραίους ύστερα από κατανάλωση αλκοόλης, αλλά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη. Στα υπεροξυσωμάτια αποδίδεται η οξειδωση των αλκοολών με τη βοήθεια της αλκοολικής οξειδάσης που περιέχουν. Ο χρόνιος αλκοολισμός στον άνθρωπο προκαλεί συχνά θανατηφόρες καρδιομυοπάθειες. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι παρεμπόδιση της δράσης της καταλάσης αυξάνει τις καρδιομυοπάθειες στην περίπτωση χρόνια αλκοολικών ατόμων. Η χορήγηση κλοφιβράτης προκαλεί αύξηση στο ρυθμό απομάκρυνσης της αιθανόλης στους αρουραίους και εμποδίζει το σχηματισμό λίπους στο ήπαρ κατά τη διάρκεια οξείας αλλά και χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλης. Κάποιο ποσοστό της απομάκρυνσης της αιθανόλης οφείλεται σε ηπατομεγαλία που προκαλείται από το φάρμακο.

Υπάρχουν τρεις τρόποι μεταβολισμού της αλκοόλης (Keizer *et al.*, 1992, Veenhuis and Goodman, 1990, Gunkel *et al.*, 2001) (σχήμα 6):

Τα υπεροξυσωμάτια των ηπατοκυττάρων είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της μισής σχεδόν ποσότητας αλκοόλης που προσλαμβάνει ένα άτομο μετά από οίνοποσία (η αλκοολική οξειδάση μετατρέπει την αλκοόλη σε ακεταλδεΐδη, με το NAD ως δέκτη πρωτονίων).



Σχήμα 6: Τρόποι μεταβολισμού της αλκοόλης

Περίπου το 50% των φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αλκοολών, μεταβολίζονται από μια υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών, το κυτόχρωμα P450, που καταλύουν τη μετατροπή ξενοβιοτικών και ενδοβιοτικών ουσιών. Ειδικότερα, το ένζυμο CYP2E1 καταλύει περίπου το 10% του μεταβολισμού της αιθανόλης και χρησιμοποιεί επίσης το NAD ως συμπράγοντα. Η αιθανόλη μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του CYP2E1 και επαγωγή του μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση ήπατος.

Ένας τρίτος τρόπος μεταβολισμού της αιθανόλης γίνεται με τη δράση της καταλάσης στα υπεροξυσωμάτια των ηπατοκυττάρων, όπου μεταβολίζει μικρή ποσότητα αιθανόλης, όταν υπάρχει επαρκής ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε αυτήν την περίπτωση, δεν απαιτείται NAD ως συμπράγοντας.

Και οι τρεις τρόποι μεταβολισμού της αιθανόλης, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ακεταλδεϋδης, η οποία μεταβολίζεται περαιτέρω στα μιτοχόνδρια από το ένζυμο δεϋδρογονάση της ακεταλδεϋδης σε οξικό οξύ.

### **Μεταβολικές διαταραχές υπεροξυσωματίων (peroxisome biogenesis disorder PBDs)**

Η αιτία της «τριπλής» αυτής διαταραχής φαίνεται να είναι η μη ολοκληρωμένη μετανάστευση των νευρικών βλαστικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη (Powers JM, Moser HW. 1998). Αυτό πολύ συχνά συνοδεύεται και από σοβαρές κρανιοεγκεφαλικές δυσλειτουργίες, που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, μεγάλο μέτωπο, φαρδύ διάφραγμα, δυσμορφίες των ματιών, καταρράκτη και γλαύκωμα. Επίσης, άλλα χαρακτηριστικά της ασθένειας είναι η ηπατομεγαλία, η χαλαρότητα των μυών και οι νεφρικές κύστες, οι οποίες προκαλούνται από τη λειτουργία του φλοιού των επινεφριδίων.

Άτομα με το σύνδρομο Zellweger (ZS) εμφανίζουν σοβαρή διανοητική καθυστέρηση, σημαντική υποτονία, εκφυλισμό του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, γλαύκωμα και μειωμένη ακοή. Πολύ συχνά παρουσιάζουν κρίσεις, ενώ στις δυσμορφίες του εγκεφάλου συμπεριλαμβάνονται, όχι μόνο δυσπλασία του φλοιού, αλλά και ετεροτοπία των νευρώνων και εκφυλιστικές αλλαγές. Εμφανίζονται, επίσης, δυσσεμεύλωση, παρά απομυελίνωση. Τα νεογνά με αυτό το σπάνιο κληρονομικό σύνδρομο εμφανίζουν πολλαπλά και πολύπλοκα συμπτώματα. Δεν έχουν ανιχνεύσιμα υπεροξυσωμάτια στα ηπατοκύτταρά τους και στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια, παρόλο που η δραστηριότητα της ηπατικής τους καταλάσης είναι κανονική. Τα μιτοχόνδρια σε ήπαρ και εγκέφαλο εμφανίζονται επίσης να είναι δομικά και λειτουργικά ελαττωματικά. Άλλες κυτταρικές αλλαγές περιλαμβάνουν ανεπάρκεια λείου ενδοπλασματικού δικτύου και αυξημένη ποσότητα γλυκογόνου στα ηπατοκύτταρα (Brown et al., 1982; Wanders RJA et al., 1986).

Ασθενείς με βρεφική επινεφριδιακή λευκοδυστροφία (NALD) εμφανίζουν υποτονία και κρίσεις, προοδευτική ασθένεια του λευκού λιπώδους ιστού και συνήθως πεθαίνουν σε νηπιακή ηλικία (Imamura et al., 1998)).

Ασθενείς με την παιδική ασθένεια Refsum (IRD), πολλές φορές εμφανίζουν κάποια εξωτερικά χαρακτηριστικά που είναι παρόμοια με αυτά του συνδρόμου

Zellweger, αλλά δεν παρουσιάζουν ανώμαλη μετανάστευση νευρικών κυττάρων και προοδευτική ασθένεια του λευκού λιπώδους ιστού. Τα συμπτώματα των ασθενών ποικίλουν από σοβαρή αναπηρία μέχρι και δυσκολία στην εκμάθηση με κρούσματα βαρηκοΐας και μειωμένης όρασης, λόγω βλάβης στην λειτουργία του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Η θνησιμότητα αυτών των ασθενών ποικίλει. Οι περισσότεροι ασθενείς μπορεί να φτάσουν την παιδική ηλικία και μερικοί έως και την εφηβεία (Geisbrecht et al., 1998).

Καθαρή κλινική διάκριση μεταξύ των διαφορετικών φαινοτύπων των PBDs δεν υπάρχει. Κοινά χαρακτηριστικά για όλες τις ασθένειες είναι δυσλειτουργία του ήπατος, καθυστέρηση στην ανάπτυξη των νευρώνων, αμφιβληστροειδοπάθεια και προοδευτικό χάσιμο της ακοής.

Τέλος, τα κλινικά χαρακτηριστικά της χονδροδυσπλασίας (RCDP) είναι αρκετά διαφορετικά από το ZS, το NALD και το IRD. Οι ασθενείς εμφανίζουν αναλόγως κοντότερο ανάστημα, τυπική εμφάνιση του κρανίου και του προσώπου, που περιλαμβάνει φαρδύ διάφραγμα, επίκανθο, υψηλή καμπύλη του ουρανίσκου, δυσμορφία στα αφτιά και μικρογοναθία. Επίσης, παρουσιάζουν νανισμό και σοβαρή διανοητική καθυστέρηση με σπαστικότητα. Οι περισσότεροι ασθενείς με χονδροδυσπλασία δεν ξεπερνούν την πρώτη δεκαετία της ζωής τους (Braveman et al., 2002).

#### *Θεραπεία:*

Οι επιλογές θεραπείας για τις μεταβολικές διαταραχές υπεροξυσωματίων είναι περιορισμένες μέχρι τώρα. Το πρόβλημα είναι ότι σε σοβαρές PBD μορφές, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται το ZS και το RCDP, ανωμαλίες που έχουν ήδη αναπτυχθεί ενδομήτρια, περιορίζουν τις πιθανές μεταγενετικές θεραπείες. Συμπληρωματικές θεραπείες, όπως θεραπεία για τον έλεγχο των κρίσεων, φυσιοθεραπεία και κινησιοθεραπεία, καθώς και θεραπείες για την βελτίωση της όρασης και της ακοής, είναι σημαντικές για την βελτίωση της ποιότητας ζωής αυτών των ασθενών. Η αναγνώριση πιο ήπιων μορφών ασθένειας, με λιγότερο σημαντικές ανωμαλίες και επιβίωση μέχρι και την τρίτη ή και τέταρτη δεκαετία της ζωής των ασθενών, έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω προσπάθειες να διορθωθούν οι βιοχημικές ανωμαλίες μεταγενετικά. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν προσπάθειες να διορθωθεί η ανεπάρκεια

πλασμαλογόνου, με συμπλήρωμα στη δίαιτα των ασθενών, αλκυλογλυκερόλης, για να μειωθούν έτσι τα VLCFAs και κυρίως τα επίπεδα του φυτανικού οξέως και να μειωθούν τα επίπεδα τοξικότητας, η οποία προκαλείται από τα ενδιάμεσα χολικού οξέος (Setchel et al., 1992). Οι μελέτες αυτές δεν απέδωσαν πολύ συγκεκριμένα αποτελέσματα, λόγω του μικρού αριθμού που συμπεριλήφθηκαν σε αυτές. Πιο πρόσφατα, το ενδιαφέρον των επιστημόνων επικεντρώθηκε στο εικοσιεξανοϊκό οξύ (docosahexaenoic acid DHA), ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, που παίρνει μέρος σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες. Βρέθηκε, ότι σε κύτταρα ασθενών με το σύνδρομο Zellweger τα επίπεδά του ήταν πολύ μειωμένα. Μελέτες σε 20 PBD ασθενείς με μη καθορισμένο γενότυπο, αλλά κυρίως σε ήπια μορφή της αρρώστιας, έδειξαν βελτιωμένη λειτουργία του ήπατος και βελτιωμένα επίπεδα υπεροξυσωματιακών μεταβολιτών στο πλάσμα, ενώ ανάλογη βελτίωση του μυϊκού τόνου, της κοινωνικής συμπεριφοράς και της όρασης, σε κάθε ασθενή. Επίσης, η μυέλωση βελτιώθηκε σε παραπάνω από τους μισούς ασθενείς, οι οποίοι εξετάστηκαν με ακτινογραφία συντονισμού (Martinez M. 1992).

### **Σκοπός της εργασίας:**

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία καινούρια μέθοδος απομόνωσης υπεροξυσωματίων, η οποία διαφέρει από τις προηγούμενες συμβατικές μεθόδους, στο ότι απαιτείται λιγότερος χρόνος για την ολοκλήρωσή της, είναι πιο φτηνή, δεν απαιτεί εξειδικευμένα εργαλεία και κεφαλές φυγόκεντρου για τη πραγματοποίησή της, και τέλος, αποδίδει καθαρά υπεροξυσωματία σε σχετικά μεγάλο ποσοστό, όπως έχει ήδη δειχθεί σε προηγούμενα πειράματα που έχουν γίνει στο ήπαρ μυών. Έτσι, έγινε προσπάθεια να προσαρμόσουμε την μέθοδο αυτή για να απομονώσουμε υπεροξυσωματία από το ήπαρ αρουραίων. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχική υποκλασματώση κάθε υπερκείμενου διαλύματος, το οποίο υπερκείμενο διάλυμα απομονώνεται μετά την ομογενοποίηση του ήπατος, εφαρμόζοντας ταυτόχρονα μια τροποποιημένη μορφή διαφορικής φυγοκέντρωσης, που είναι γνωστή ως «κλιμακωτή» διαφορική φυγοκέντρωση, η οποία ακολουθείται από επώαση των δειγμάτων με ιμιπραμίνη, που βοηθά στη διάλυση των λυσοσωμάτων. Στη συνέχεια, γίνεται διαδοχικά γραμμική βαθμιδωτή φυγοκέντρωση πυκνότητας σε καθένα από τα δείγματα. Όταν η διαδικασία απομόνωσης των υπεροξυσωματίων έχει τελειώσει, γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο υπεροξυσωματιακό κλάσμα, με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.

## **II. Υλικά και μέθοδοι**



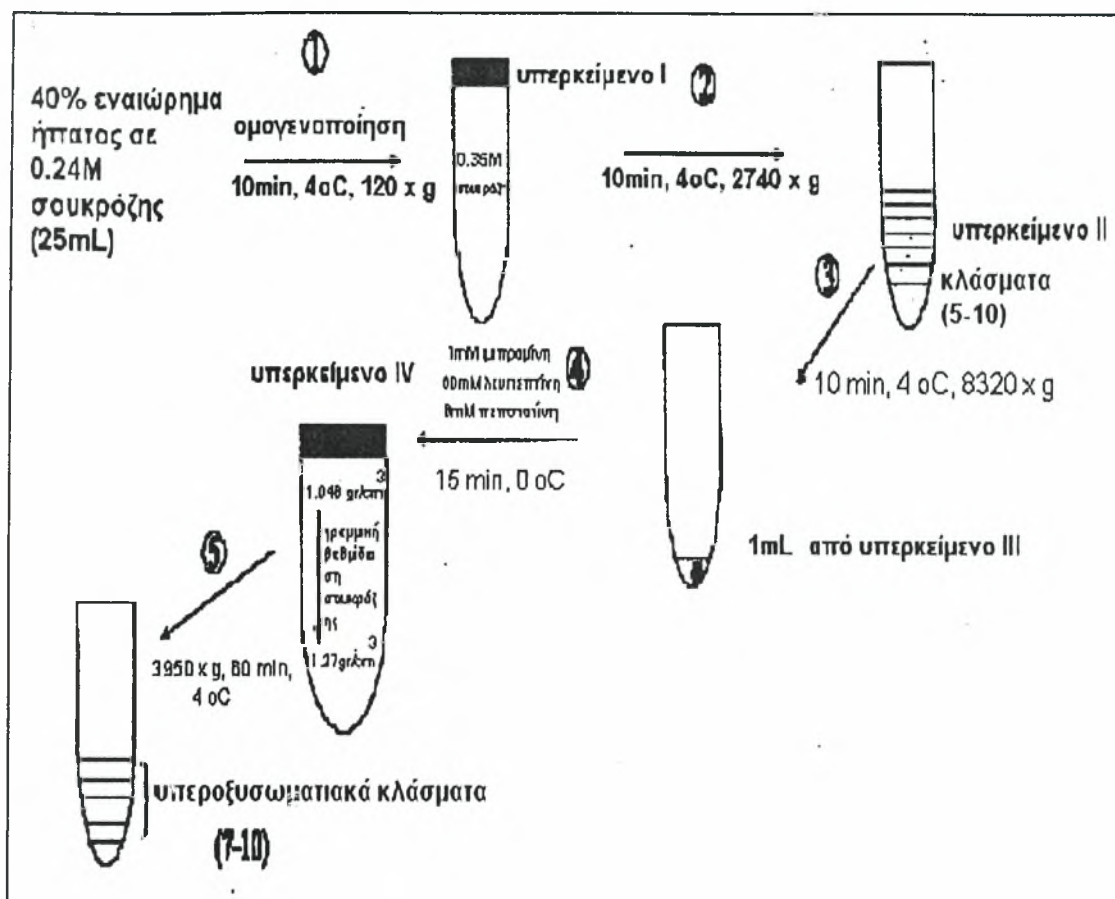
### *Απομόνωση των υπεροξυσωματίων:*

Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν στους 4° C, εκτός από τη διάλυση των λυσοσωματίων, η οποία πραγματοποιήθηκε στους 0° C.

Το ήπαρ των αρσυραίων ομογενοποιήθηκε σε έναν Potter-Elvehjem ομογενοποιητή, εφαρμόζοντας τέσσερις κινήσεις. Το δείγμα προς ομογενοποίηση βρισκόταν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0.24 M σουκρόζη και κατόπιν, το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 800 rpm σε μία JA-20 γωνίας κεφαλή φυγόκεντρου για 10 λεπτά.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν 5 mL από το υπερκείμενο διάλυμα 1 κάθε δείγματος και τοποθετήθηκαν σαν στοιβάδα, στο πάνω μέρος κρύου διαλύματος 0.35 M σουκρόζης (εικόνα 2) και εφαρμόστηκε για 10 λεπτά κλιμακωτή διαφορική φυγοκέντρηση (layered differential centrifugation) στα 2740 g, σε JA-18 γωνίας κεφαλή φυγόκεντρου. Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκαν τα πρώτα 20 mL από κάθε υπερκείμενο διάλυμα και χρησιμοποιήθηκαν τα υπόλοιπα 30 mL του υπερκείμενου, δηλαδή τα κλάσματα 5-10 για περαιτέρω φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 8320 g στην ίδια κεφαλή φυγόκεντρου, με αποτέλεσμα την καλύτερη συγκέντρωση των υπάρχοντων οργανιδίων. Πετάμε το υπερκείμενο και κρατάμε μόνο 5 mL από αυτό καθώς και το ίζημα, στο οποίο θα πρέπει να βρίσκονται τα επιθυμητά οργανίδια. Διαλύουμε το ίζημα με το υπερκείμενο και επωάζουμε το διάλυμα με 1 mM ιμιπραμίνη και δύο αναστολείς πρωτεάσης, την πεπστατίνη A 6 μM και την λευπεπτίνη 60 μM, για 15 λεπτά, σε πάγο, για την διάλυση των μεμβρανών των λυσοσωματίων.

Μετά την διάλυση των μεμβρανών των λυσοσωματίων, τα δύο δείγματα υπόκεινται σε γραμμική βαθμιδωτή φυγοκέντρηση πυκνότητας (linear density gradient centrifugation), χρησιμοποιώντας διάλυμα διαβαθμισμένης σουκρόζης από 1,048 σε 1,277 g/cm<sup>3</sup> και μετά φυγοκέντρηση για 60 λεπτά στα 3950 g. Τέλος, μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας συλλέχθηκαν τα κλάσματα 7-10 από το υπερκείμενο διάλυμα καθώς και το διήθημα, στα οποία βρίσκονται τα υπεροξυσωματίδια.



Εικόνα 2: διαγραμματική αναπαράσταση κλασμάτωσης ομογενοποιημένου ήπατος μυών χρησιμοποιώντας διαφορετική φυγοκέντρηση (1), κλιμακωτή διαφορετική φυγοκέντρηση (2), συγκεντρωτική φυγοκέντρηση (3), επώαση με ιμιπραμίνη-λευπεπτίνη-πεπστατίνη A (4) και γραμμική βαθμιδωτή φυγοκέντρηση πυκνότητας.

### *Ενζυμικές δοκιμασίες:*

#### ○ **Μέτρηση δραστηριότητας της καταλάσης:**

Το μείγμα αντίδρασης περιείχε 50 mM φωσφορικό κάλιο (potassium phosphate), pH 7.0 και 60  $\mu$ L 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ρυθμισμένο έτσι ώστε να δίνει περίπου 0.5 σε απορρόφηση στα 240 nm ( $\Delta OD_{240}$ ). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στους 25° C, προσθέτοντας 20  $\mu$ L από 2-φορές αραιωμένου δείγματος (ή 100-φορες αραιωμένου, στην περίπτωση που χρησιμοποιούσαμε το ομογενοποίημα) σε 1 mL μείγματος buffer-  $H_2O_2$ . Η διαφορά στην απορρόφηση ( $\Delta OD_{240}/min$ ) μετρήθηκε για 3 λεπτά.

#### ○ **Μέτρηση δραστηριότητας της ουρικής οξειδάσης:**

Σε αυτή τη μέτρηση, 1 mg ουρικού οξέος αναμείχθηκε με 0.1 M buffer βορικού με pH 8.5. Η διαφορά στην απορρόφηση ( $\Delta OD_{293}/min$ ) μετρήθηκε στους 37° C για περίπου 2 λεπτά.

#### ○ **Μέτρηση δραστηριότητας της όξινης φωσφατάσης:**

Τα δείγματα επωάστηκαν για 15 λεπτά σε 0.1 M buffer οξικού νατρίου (sodium acetate buffer), pH 4.5 και 20 mM p-nitrophenyl phosphate (υπόστρωμα). Η αντίδραση διακόπηκε προσθέτοντας 2.0 M NaOH και προσδιορίστηκε η απορρόφηση του τελικού κίτρινου διαλύματος στα 410 nm (Bowers 1973).

ο **Μέτρηση δραστηριότητας της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης:**

Τα δείγματα αρχικά αναμίχθηκαν με buffer τριαιθανολαμίνης (triethanolamine) (70 mM; pH 8), 2.5 mM EDTA, 100 mM οξικό αμμώνιο (ammonium acetate), 1 mM ADP, 0.164 mM β-NADPH, 0.1% TritonX-100, και η διαφορά στην απορρόφηση μετρήθηκε στα 340 nm, στους 37° C, για 3 λεπτά, για να καθοριστεί η μη ειδική οξειδωση του NADH. Στη συνέχεια, ξεκίνησε η αντίδραση προσθέτοντας στην κυψελίδα 6.9 mM α-κετογλουταρικό (α-ketoglutarate) και μετρήθηκε η ειδική δραστηριότητα της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης με τον ίδιο τρόπο.

*Western blotting:*

Οι πρωτεΐνες των δειγμάτων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gels SDS-πολυακρυλαμίδης (10%-4%) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε Hybond ECL ή Hybond-P PVDF μεμβράνες. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη βυθίστηκε σε μείγμα 5% άπαχο ξηρό γάλα και 0.1% (v/v) Tween 20 σε PBS (Phosphate buffered saline), σε ανακινητή, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό τη μη ειδική αδρανοποίησή της. Διαφορετικά, οι μεμβράνες μπορούν να αφεθούν σε αυτό το διάλυμα, πάνω σε ανακινητή, όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 2 - 8° C. Μετά, η μεμβράνη ξεπλύθηκε σύντομα με δύο αλλαγές από διάλυμα ξέπλυσης, που περιείχε 0.1% Tween 20 σε PBS. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα για την καταλαση (catalase), την υδρολάση του εποξειδίου (epoxide hydrolase) και την D-αμινοξική οξειδάση (D-amino acid oxidase). Η μεμβράνη επώαστηκε σε αραιωμένο σε PBS πρωτογενές αντίσωμα για 1 ώρα, πάνω σε ανακινητή, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, η μεμβράνη ξεπλύθηκε 2 φορές σύντομα με το διάλυμα έκπλυσης και μετά για 3 φορές από 5 λεπτά, με καινούριες αλλαγές του διαλύματος. Μετά τις επώσεις με τα πρωτογενή αντισώματα, η μεμβράνη επώαστηκε με δευτερογενές αντίσωμα, σημειωμένο με Horseradish Peroxidase (HRP), αραιωμένο 1:3000 σε PBS, για 1 ώρα, πάνω σε ανακινητή, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη δεύτερη επώαση, η

μεμβράνη ξεπλύθηκε με την ίδια διαδικασία με το πρωτογενές αντίσωμα. Για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν 1 mL από RNP2108 διαλύματος ανίχνευσης 1 και 1 mL από RNP2108 διαλύματος ανίχνευσης 2 (Amersham Pharmacia Biotech). Η επιφάνεια της μεμβράνης καλύφθηκε πλήρως από το μείγμα των δύο διαλυμάτων. Ύστερα από 1 λεπτό, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ένα σύστημα phosphorimager Fujifilm LAS-1000 και εκτέθηκε σε αυτό για 10-15 λεπτά.

#### *Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων:*

Μετά την απομόνωση των υπεροξυσωματίων, τα δείγματα κατακρημνίστηκαν με τριχλωροοξικό οξύ (TCA), σε τελική συγκέντρωση 10%, σε πάγο, για 60 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκαν (14000 rpm x g) για 15 λεπτά. Τα ιζήματα που αποκτήθηκαν ξεπλύθηκαν 2 φορές με νερό και ακετόνη (400  $\mu$ L για το καθένα), με φυγοκέντρηση για μετά την κάθε πλύση, για 5 λεπτά. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν από την ακετόνη και τα υπολείμματα ξαναδιαλύθηκαν σε 250  $\mu$ L 8 M διαλύματος ουρίας, 40 mM DTT (dithiothreitol) και 2% IPG (Immobilized pH gradient) buffer, το οποίο περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για ακινητοποίηση πάνω στις ειδικές στεγνές λωρίδες (IPG strips) (13 cm, pH 4-7, Amersham Pharmacia Biotech) σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια της νύχτας, για να εξασφαλιστεί μέγιστη διάχυση της πρωτεΐνης πάνω στην λωρίδα. Στη συνέχεια, οι λωρίδες με τις πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν στο Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) και καλύφθηκαν με υγρό (Amersham Pharmacia Biotech). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα 300 V για 4 ώρες και στα 3000 V για 16 ώρες μέχρι να φτάσει συνολικά τις 50 kVh. Ακολούθησε η εστίαση, κατά την οποία κάθε IPG λωρίδα εξισορροπήθηκε 2 φορές από 15 λεπτά στο πρώτο διάλυμα, που περιείχε 6 M ουρία, 30% γλυκερόλη, 50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 1% (w/v) DTT και μπλε της βρωμοφαινόλης. Το δεύτερο διάλυμα εφαρμόστηκε με τον ίδιο τρόπο, με τη διαφορά ότι το DTT αντικαταστάθηκε από 2.5% (w/v) ιωδοακεταμίδα (iodoacetamide). Τέλος, οι

IPG λωρίδες φορτώθηκαν και έτρεξαν σε 12.5% SDS-PAGE ακρυλαμίδης (Amersham Pharmacia Biotech). Αρχικά, τα gel έτρεξαν στα 15 mA/gel, ενώ όταν οι πρωτεΐνες διαχύθηκαν στο gel, αυξήθηκε στα 30 mA/gel. Η ηλεκτροφόρηση σταμάτησε όταν η γραμμή από το μπλε της βρωμοφαινόλης έφτασε στη βάση του gel.

#### *Χρωματισμός του 2-D gel:*

##### ○ **Coomassie brilliant blue**

Αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολουθεί χρωματισμός των gel με κυανό του coomassie (Bowers 1973) για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών. Τα gel βυθίστηκαν αρχικά σε 12% TCA και στη συνέχεια χρωματίστηκαν με 0.1% (w/v) Coomassie G-250 σε 2% φωσφορικό οξύ, 10% (w/v) θειικό αμμώνιο και 40 mL μεθανόλη, για όλη τη διάρκεια της νύχτας, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από αυτό, τα gel ξεπλύθηκαν για 1 λεπτό το καθένα, σε 0.1 M Tris-phosphate buffer, pH 6.5 και μετά για 1 λεπτό σε 25% (w/v) σε μεθανόλη. Τέλος, το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-χρώματος σταθεροποιήθηκε σε 20% θειικό αμμώνιο.

##### ○ **Χρώση με άργυρο**

Σε αυτή την περίπτωση, τα gel τοποθετήθηκαν για 1 ώρα σε 45% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ και 45% νερό και μετά πλύθηκαν με νερό για 20-60 λεπτά. Στη συνέχεια, για 1 μόνο λεπτό σε 0.02% σε θειοθειικό νάτριο (sodium thiosulfate) και ξεπλύθηκε 2 φορές με ύδωρ για 1 λεπτό κάθε φορά. Τα gel βυθίστηκαν για 40 λεπτά σε 0.1% νιτρικό άργυρο (silver nitrate) στους 4° C και στη συνέχεια σε 0.04% φορμαλδεΰδη-2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και ξεπλύθηκαν 2 φορές με νερό. Όταν πραγματοποιήθηκε η χρώση, η ανάπτυξη της σταμάτησε με 1% οξικό οξύ. Τέλος, τα gel αποθηκεύτηκαν σε 1% οξικό οξύ, στους 4° C (Shevchenko, M Wilm, O vorm, and M. Mann, 1996).

- **Χρώση με κυανικά:**

Τα gel στα οποία οι πρωτεΐνες βάφονται με χρώση κυανίνης, σκανάρονται κατευθείαν μετά το 2-D PAGE, με τη βοήθεια ενός αναλυτή φθορίζουσας εικόνας (FLA-3000 Series). Οι Cy3 και Cy5 είναι δύο διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες μπορούν να αναλυθούν σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, 553 nm και 645 nm, αντίστοιχα.

### **III. Αποτελέσματα & Συζήτηση**

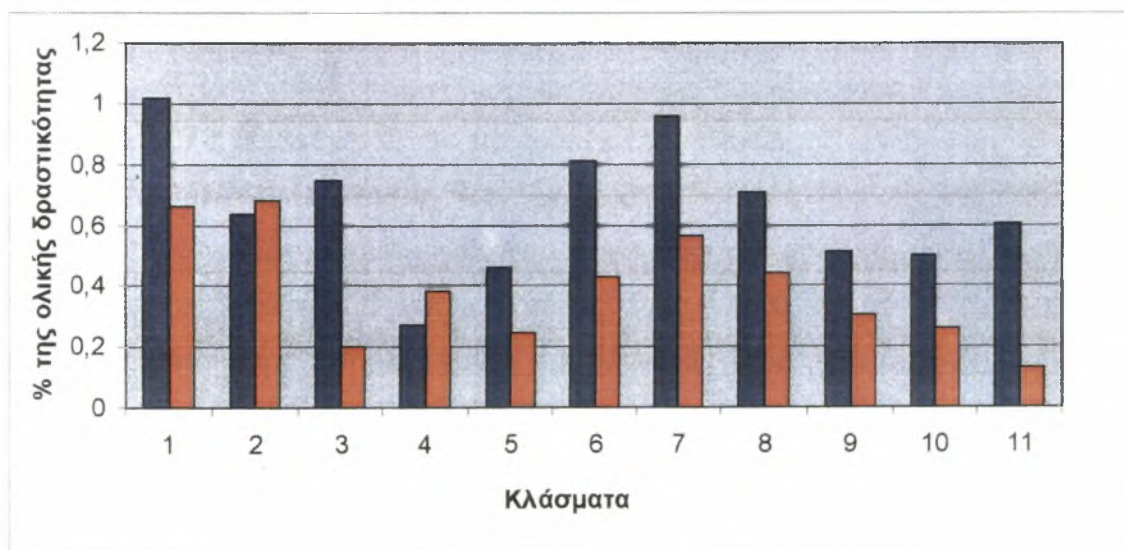


### Ενζυμικές δοκιμασίες:

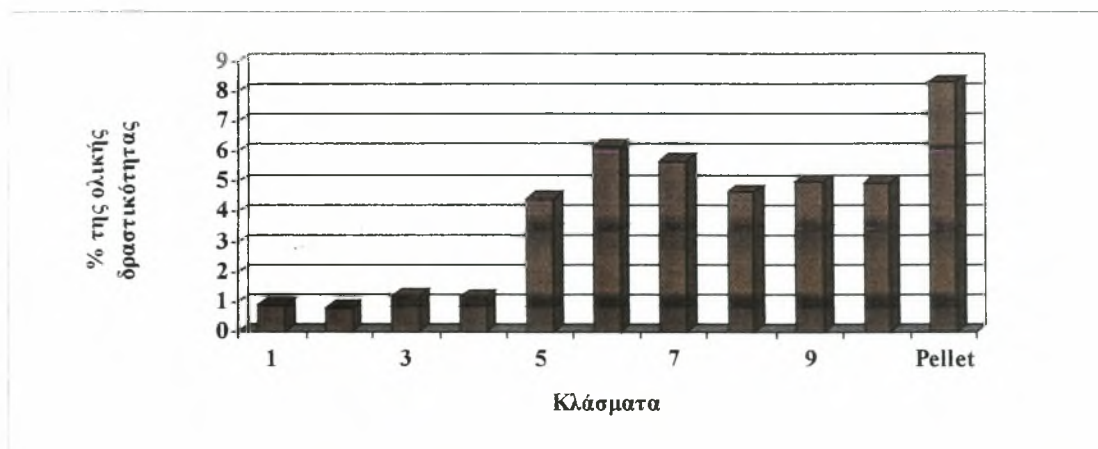
Η έρευνα αυτή περιορίστηκε στον εντοπισμό των υπεροξυσωματίων, λυσοσωματίων και μιτοχονδρίων. Τα τρία αυτά οργανίδια είναι δύσκολο να ξεχωριστούν το ένα από το άλλο, γιατί έχουν σχεδόν την ίδια πυκνότητα και μέγεθος. Συνεπώς, ο μεγαλύτερος κίνδυνος πρόσμιξης των υπεροξυσωματίων προέρχεται από λυσοσωμάτια και μιτοχόνδρια.

#### ο Δραστικότητα καταλάσης (υπεροξυσωμάτια)

Η καταλάση είναι παρούσα στα υπεροξυσωμάτια σχεδόν όλων των αερόβιων κυττάρων, προστατεύει τα κύτταρα από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, καταλύοντας την αποσύνθεσή του σε μοριακό οξυγόνο και ύδωρ, χωρίς την παραγωγή ελεύθερων ριζών.



Εικόνα 3: Δραστικότητα καταλάσης σε 11 κλάσματα, που έχουν απομονωθεί από το ήπαρ δύο διαφορετικών επιμύων (βλ. εικόνα 2).

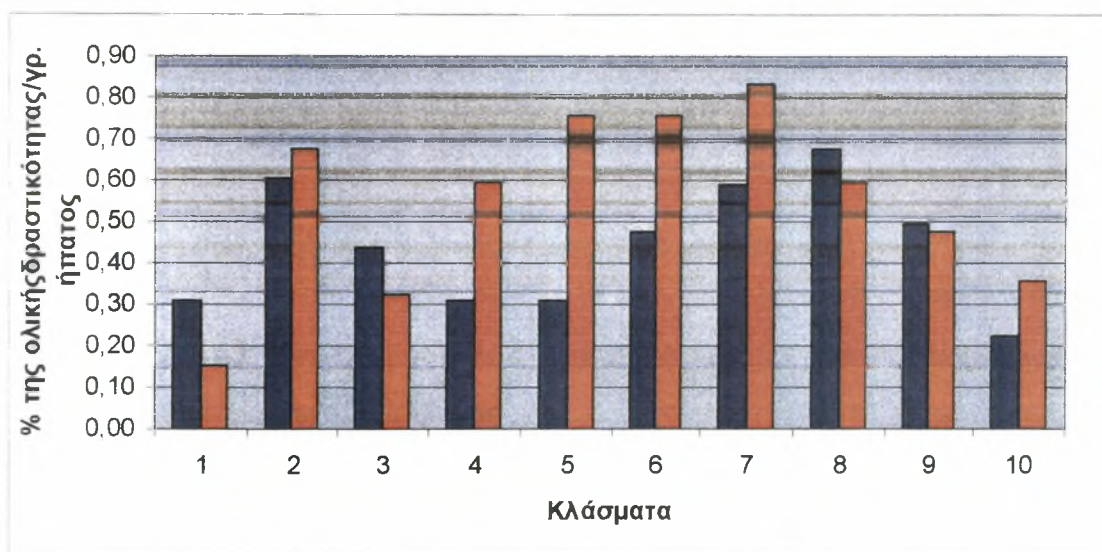


Εικόνα 4: Δραστηριότητα καταλάσης σε 10 κλάσματα και στο αρχικό ομογενοποίημα, που απομονώθηκαν από το ήπαρ μυών, με την ίδια διαδικασία όπως στους επίμυες.

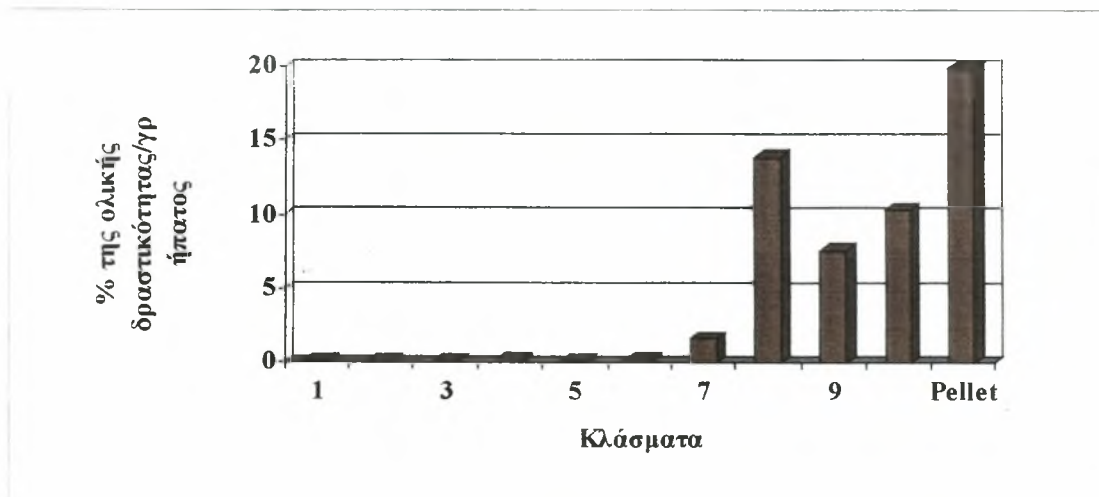
Όπως βλέπουμε στην εικόνα 3, παρατηρούμε ότι υπάρχει καταλάση σχεδόν σε όλες τα κλάσματα και στους δύο αρουραίους και ότι υπάρχει μικρή διαφορά στη συγκέντρωση της καταλάσης ανάμεσα στους αρουραίους. Στην περίπτωση των μυών, παρατηρούμε αυξημένη συγκέντρωση καταλάσης στα κλάσματα 7-11 (εικόνα 4). Η παρουσία της καταλάσης σχεδόν σε όλες τα κλάσματα, στην περίπτωση των αρουραίων, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα υπεροξυσωμάτια στο ήπαρ αρουραίων είναι μεγαλύτερα από τα υπεροξυσωμάτια των μυών. Επίσης, ένας ακόμη λόγος μπορεί να είναι κάποιες δυσκολίες στη διαδικασία απομόνωσής τους. Μία δεύτερη υπόθεση μπορεί να είναι το γεγονός ότι η καταλάση είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και πιθανή καταστροφή της μεμβράνης κατά τη διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού, μπορεί να ελευθερώσει το ένζυμο μέσα στο μέσο.

○ **Δραστικότητα ουρικής οξειδάσης (υπεροξυσωμάτια)**

Η ουρική οξειδάση είναι και αυτή ένα ένζυμο των υπεροξυσωματίων. Η δραστικότητά της είναι εμφανής σχεδόν σε όλες τα κλάσματα, όπως είδαμε και στην περίπτωση της καταλάσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων που κάναμε, βλέπουμε μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου στα κλάσματα 5-8 (εικόνα 5). Συνεπώς, η παρουσία του ενζύμου στα άλλα κλάσματα, και ιδιαίτερα στα πρώτα κλάσματα, συγκρινόμενα με τις μετρήσεις στο ήπαρ μυών (εικόνα 6), μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι προηγήθηκε κάποια καταστροφή της υπεροξυσωματιακής μεμβράνης κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενζύμου μέσα στο μέσο. Επιπλέον, επειδή η ουρική οξειδάση είναι πυρηνικό ένζυμο, αυτό σημαίνει ότι τα υπεροξυσωμάτια είχαν καταστραφεί τελείως.



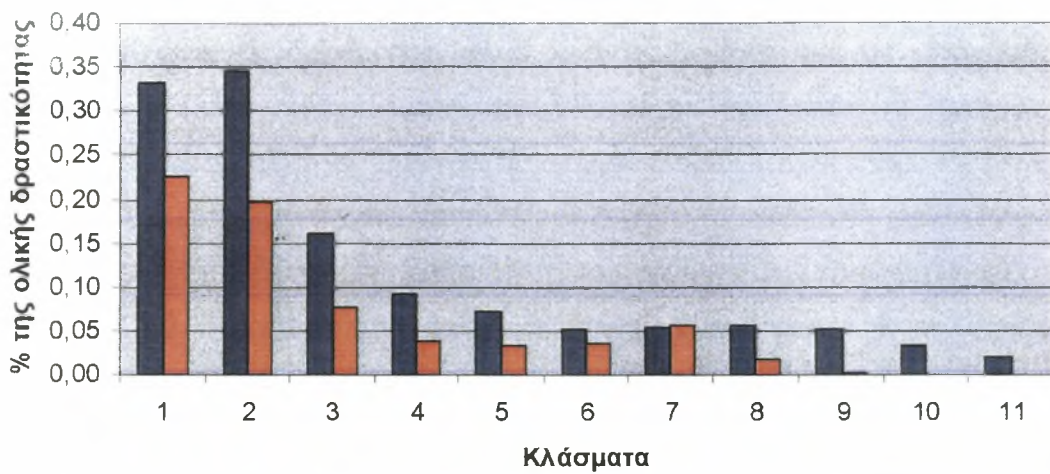
Εικόνα 5: Δραστικότητα της ουρικής οξειδάσης σε 10 κλάσματα, που έχουν απομονωθεί από το ήπαρ δύο διαφορετικών επιμύων (βλ. εικόνα 2).



Εικόνα 6: Δραστηριότητα ουρικής οξειδάσης σε 10 κλάσματα και στο αρχικό ομογενοποίημα, που απομονώθηκαν από το ήπαρ μυών με την ίδια διαδικασία όπως στους επίμυες.

#### ο Δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης (λυσσοσωμάτια)

Η όξινη φωσφατάση είναι ένα λυσοσωματικό ένζυμο. Όπως παρατηρούμε, υπάρχει μια ετερογενής κατανομή του, ελαττούμενη από τα μικρότερα προς τα μεγαλύτερα κλάσματα, με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα στα δύο πρώτα κλάσματα (εικόνα 7). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που περιμέναμε, συγκρινόμενα πάντα με προηγούμενες μετρήσεις που είχαμε από το ήπαρ μυών (εικόνα 8). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα λυσοσωμάτια είναι μικρότερα από τα υπεροξυσωμάτια στο ήπαρ των αρουραίων και συνεπώς, η απομόνωση και η διάλυση της μεμβράνης τους λειτούργησε σωστά με τον ίδιο τρόπο που έγινε και στο ήπαρ των μυών.



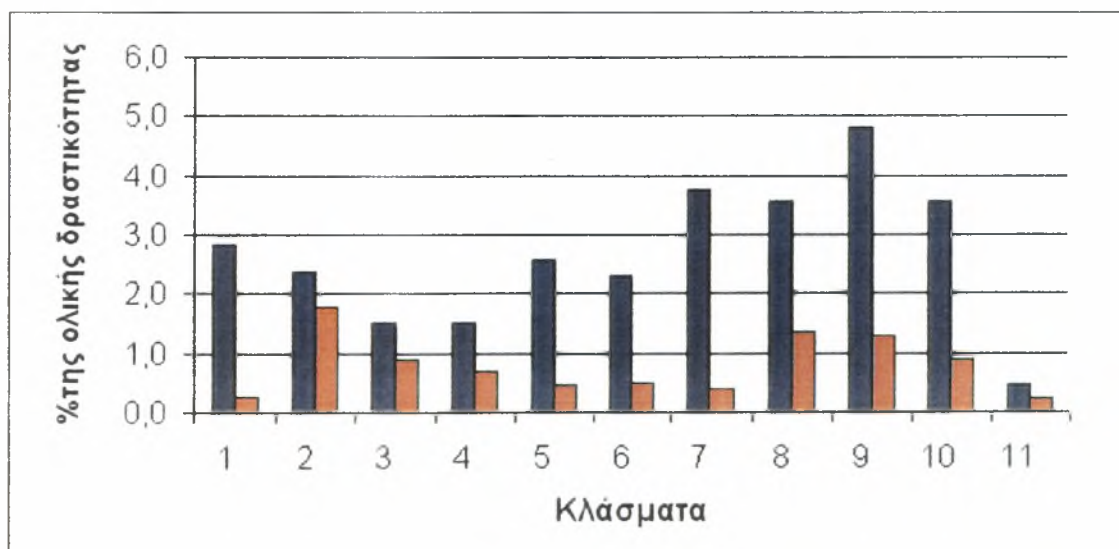
Εικόνα 7: Δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε 11 κλάσματα, που έχουν απομονωθεί από το ήπαρ δύο διαφορετικών επιμύων (βλ. εικόνα 2).



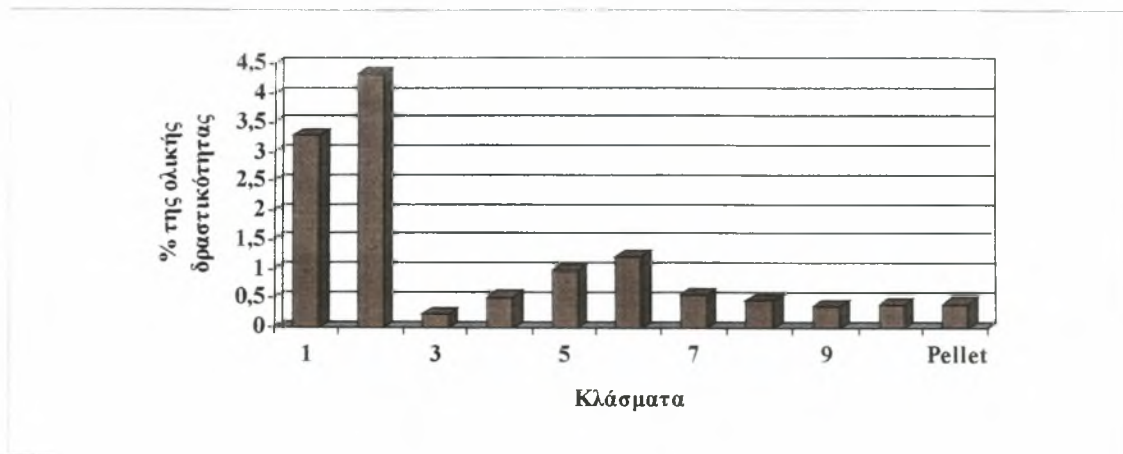
Εικόνα 8: Δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε 10 κλάσεις και στο αρχικό ομογενοποίημα, που απομονώθηκαν από το ήπαρ μυών με την ίδια διαδικασία όπως στους επίμυες.

### ο Δραστικότητα γλουταμινικής δεϋδρογονάσης (μιτοχόνδρια)

Η γλουταμινική δεϋδρογονάση είναι ένζυμο δείκτης για τα μιτοχόνδρια. Ύστερα από την «κλιμακωτή» φυγοκέντρηση και πριν τη βαθμιδωτή φυγοκέντρηση πυκνότητας σουκρόζης, ο όγκος των μιτοχονδρίων θα έπρεπε να είναι συγκεντρωμένος στο ίζημα. Μετά όμως τη βαθμιδωτή φυγοκέντρηση πυκνότητας σουκρόζης η δραστηριότητα του ενζύμου δεν ήταν αυξημένη στα κλάσματα 1-2, όπως ήταν αναμενόμενο, συγκρινόμενο πάντα με τις μετρήσεις στο ήπαρ μυών (εικόνα 10), αλλά οι μετρήσεις μας έδειξαν αυξημένη δραστικότητα στα τελευταία κλάσματα 7-10, αλλά και κάποια δραστηριότητα στα πρώτα κλάσματα (εικόνα 9). Από αυτά, λοιπόν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι υπήρχε σημαντική μόλυνση των μιτοχονδρίων στα υπεροξυσωματιακές κλάσματα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια του ήπατος των αρουραίων είναι μικρότερο από αυτά του ήπατος των μυών.



Εικόνα 9: Δραστικότητα γλουταμινικής δεϋδρογονάσης σε 11 κλάσματα, που έχουν απομονωθεί από το ήπαρ δύο διαφορετικών επιμύων (βλ. εικόνα 2).



Εικόνα 10: Δραστηριότητα γλουταμινικής δεϋδρογονάσης σε 10 κλάσματα και στο αρχικό ομογενοποίημα, που απομονώθηκαν από το ήπαρ μυών με την ίδια διαδικασία όπως στους επίμυες.

**Γενικά σχόλια στην εφαρμογή της διαδικασίας που αναπτύχθηκε για την απομόνωση υπεροξυσωματίων από το ήπαρ μυών και από το ήπαρ αρουραίων.**

Η απομόνωση των υπεροξυσωματίων από το ήπαρ μυών είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. διαχωρισμός των οργανιδίων με βάση το μέγεθός τους, με τη βοήθεια της κλιμακωτής διαφορικής φυγοκέντρωσης
2. επιλεκτική διάλυση της μεμβράνης των λυσοσωματίων, και
3. φυγοκέντρωση πυκνότητας σε γραμμική βαθμιδωτή συγκέντρωση σουκρόζης.

Αυτή η διαδικασία απομόνωσης είναι κατάλληλη για την απομόνωση των υπεροξυσωματίων από το ήπαρ μυών, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, που έχουν δώσει γύρω στα 30% απόδοση μετά τον καθαρισμό τους, η οποία είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη από ότι δίνουν οι κοινές μέθοδοι. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι πολύ γρήγορη σε σχέση με τις προηγούμενες, απαιτώντας μόλις 4 ώρες από τις 20 ώρες που χρειάζονται οι παραδοσιακές μέθοδοι για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Η μείωση στη διάρκεια απομόνωσης μας επιτρέπει να αποκτήσουμε ακέραια υπεροξυσωματίδια, διότι μία μεγάλης διάρκειας διαδικασία απομόνωσης κυστίδια που έχουν διαφύγει και συνεπώς έχουν χάσει μεγάλο μέρος των συστατικών τους.

Από την άλλη μεριά όμως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η συγκεκριμένη διαδικασία δεν είναι κατάλληλη για την απομόνωση υπεροξυσωματίων από το ήπαρ αρουραίων. Υπάρχει σημαντική μόλυνση των υπεροξυσωματιακών κλασμάτων από μιτοχόνδρια, ενώ η καταλάση και η ουρική οξειδάση είναι παρούσες σχεδόν σε όλα τα κλάσματα. Συνεπώς, από τα παραπάνω καταλαβαίνουμε ότι αυτή η διαδικασία απαιτεί σημαντικές αλλαγές, για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στους αρουραίους.



### *Western blotting:*

Η ECL Western blotting από τα εργαστήρια Amersham Bioscience είναι μία πολύ ευαίσθητη, μη ραδιενεργή μέθοδος που εκπέμπει φως και μας επιτρέπει να ανιχνεύουμε ακινητοποιημένα ειδικά αντιγόνα είτε άμεσα, είτε έμμεσα, χρησιμοποιώντας αντισώματα σημασμένα horseradish peroxidase (HRP). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή ανάλυση και ταχύτητα, ανιχνεύοντας ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών συγκρινόμενες με χρωματομετρικές και ραδιοενεργές μεθόδους, σε πολύπλοκα δείγματα κυττάρων. Τέλος, η ECL μπορεί να ανιχνεύσει αντιγόνα χρησιμοποιώντας μικρότερη ποσότητα αντισωμάτων σε σχέση με τις χρωματομετρικές ή ραδιοενεργές μεθόδους.

Μερικά από πλεονεκτήματα της μεθόδου ανίχνευσης με φθορισμό, περιγράφονται παρακάτω:

**Ευαισθησία:** Οι ανιχνευτές με τη χρήση φθορισμού επιτρέπουν την ευαίσθητη ανίχνευση πολλών βιολογικών μορίων. Οι κηλίδες που φθορίζουν και οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται είναι πολύ πιο ευαίσθητες από τις παραδοσιακές κολοριμετρικές μεθόδους για την ανίχνευση ολικού DNA, RNA και πρωτεϊνών.

**Ανίχνευση πολλών συγχρόνως χρωμάτων:** Η ανίχνευση πολλών συγχρόνως διαφορετικών χρωμάτων πάνω στο gel επιτρέπει την ανίχνευση και την ανάλυση πολλών στόχων. Η ικανότητα ανίχνευσης και ανάλυσης δύο ή περισσότερων σημασμένων στόχων του ίδιου δείγματος έχει μικρότερο οικονομικό κόστος και διαρκεί πολύ λιγότερο από τις κοινές μεθόδους.

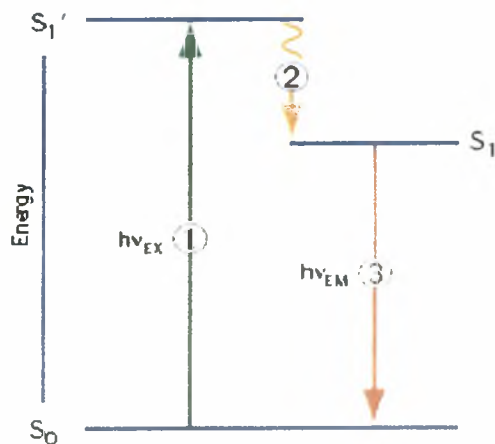
**Σταθερότητα:** Τα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες μόρια προσφέρουν πολλά ξεχωριστά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ραδιενεργώς σημασμένα μόρια, σε ό,τι αφορά τη σταθερότητα. Τα αντισώματα που είναι σημασμένα με φθορίζουσα ουσία και οι εκκινητές της PCR μπορούν να φυλαχθούν για περισσότερο από έξι μήνες, ενώ τα ραδιενεργώς σημασμένα αντισώματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ύστερα από ένα μήνα, και τα ραδιενεργώς σημασμένα νουκλεοτίδια και ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να διατηρηθούν για λιγότερο από μία εβδομάδα. Συνεπώς, τα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες αντιδραστήρια μπορούν να παρασκευαστούν σε μεγάλες ποσότητες, να τυποποιηθούν και να χρησιμοποιούνται σε διάρκεια μεγάλων περιόδων.

**Χαμηλός κίνδυνος:** Οι περισσότερες φθορίζουσες ουσίες δεν παρουσιάζουν δυσκολίες στον χειρισμό τους και στις περισσότερες περιπτώσεις η απλή χρήση γαντιών είναι αρκετή για την προστασία του ερευνητή. Το αντίθετο συμβαίνει με τα ραδιενεργά αντιδραστήρια, τα οποία είναι επικίνδυνα για την υγεία και απαιτούνται πιο σοβαρά μέτρα ασφαλείας. Επιπλέον, με τις φθορίζουσες ουσίες δεν υπάρχει το πρόβλημα των αποβλήτων, μπορούν εύκολα να αποτεφρωθούν ή και να φυλαχτούν. Τα ραδιενεργά απόβλητα, όμως, απαιτούν φύλαξη για πολλά χρόνια, σε ειδικούς χώρους.

### Διαδικασία φθορισμού:

Ο φθορισμός προκύπτει από μια διαδικασία που συμβαίνει όταν συγκεκριμένα μόρια (κυρίως πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες ή ετεροδακτύλιοι), τα οποία ονομάζονται φθορίζουσες ουσίες, απορροφούν φως. Η απορρόφηση του φωτός από έναν αριθμό από αυτά τα μόρια τα διεγείρει και τα ανεβάζει σε υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο, για ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Όταν πέφτουν ξανά στην κατώτερη ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπουν φθορίζον φως. Η διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τον φθορισμό, φαίνεται από ένα απλό ηλεκτρονιακό διάγραμμα (εικόνα 11).

Εικόνα 11: το διάγραμμα Jablonski μας δείχνει τη διαδικασία που συμπεριλαμβάνεται στη δημιουργία ενός διεγερμένου από απορρόφηση ηλεκτρονίου μορίου, και διαδοχική εκπομπή του φθορίζοντος φωτός. 1)διέγερση, 2)παραμονή σε κατάσταση διέγερσης, 3) εκπομπή

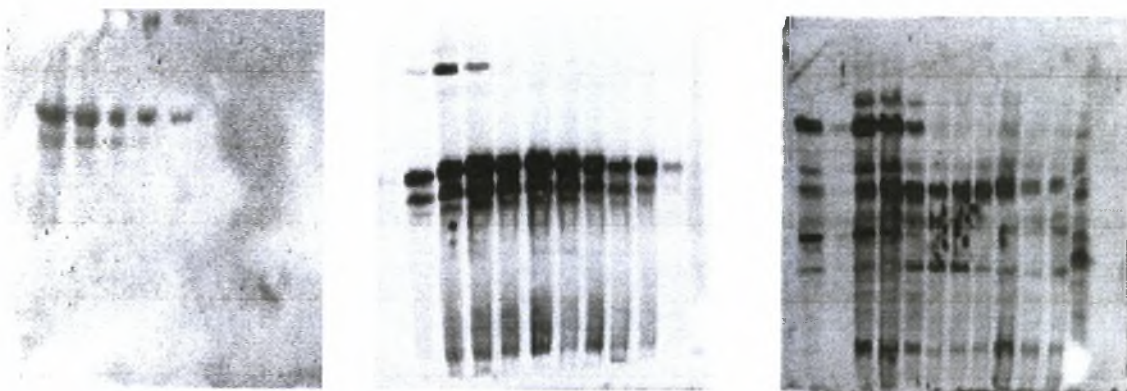


Στο πείραμά μας, χρησιμοποιήσαμε πρωταρχικά αντισώματα για την καταλάση, η οποία είναι ένα ένζυμο των 59kD, για την υδρολάση του εποξειδίου (52kD) και την D-αμινοοξική οξειδάση (ένζυμο που περιέχει δύο ισομορφές των περίπου 50kD η καθεμία).

Καταλάση (59kD)

D-αμινοοξική οξειδάση (50kD)

υδρολάση εποξειδίου (52kD)



Εικόνα 12: Western blotting με 3 διαφορετικά πρωταρχικά αντισώματα. Τα δείγματα περιέχουν 10 μg πρωτεΐνης για κάθε κλάσμα που χρησιμοποιήθηκε από το ήπαρ αρουραίων.

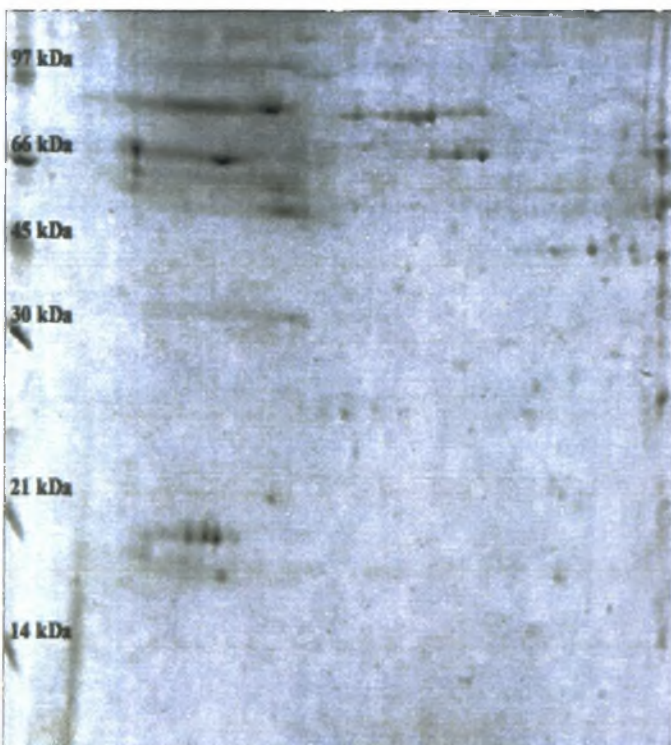
Στο Western blotting, εφόσον οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες, κινούνται κατά μήκος του gel προς το θετικά φορτισμένο άκρο. Το πρωταρχικό αντίσωμα προσδένεται ειδικά στις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει (στην περίπτωση μας, τρεις διαφορετικές), ενώ το δευτερογενές αντίσωμα προσδένεται μόνο στο πρωταρχικό αντίσωμα και το εξουδετερώνει. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, το οποίο θα βοηθήσει αργότερα να δούμε την πρωτεΐνη. Μετά το ξέπλυμα της μεμβράνης με συγκεκριμένο διάλυμα για την απομάκρυνση όλων των ανεπιθύμητων στοιχείων, μόνο οι πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στο αντίσωμα θα είναι ορατές.

Σύμφωνα με την εικόνα 12, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στην περίπτωση της υδρολάσης του εποξειδίου, το αντίσωμα ανιχνεύει όχι μόνο τις επιθυμητές, αλλά και άλλες πρωτεΐνες. Στη μεμβράνη της D-αμινοοξικής οξειδάσης βλέπουμε δύο ισομορφές του ενζύμου με μοριακά βάρη περίπου 50 kD η καθεμία. Τέλος, στην πρώτη μεμβράνη παρατηρούμε ότι υπάρχει κυρίως καταλάση.

*Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων:*

- **Coomassie brilliant blue**

Η χρώση κυανό του Coomassie απαιτεί μεγάλη ποσότητα συνολικών πρωτεϊνών για την ανίχνευσή τους. Η διαδικασία αυτή δεν λειτουργεί όταν υπάρχει ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης λιγότερη από 300  $\mu\text{g}$ . Συνεπώς, παρατηρήθηκαν μόνο λίγες κηλίδες στο 2-D gel ύστερα από χρώση του με κυανό του Coomassie (εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων του υπεροξυσωματιακού κλάσματος 9, που έχει απομονωθεί από ήπαρ αρουραίων (βλ. εικόνα 2). 250  $\mu\text{g}$  συνολικής πρωτεΐνης προστέθηκαν στο gel και χρωματίστηκε με την κολλοϊδή χρώση κυανό του Coomassie.

- Χρώση με άργυρο

Η τεχνική της χρώσης με άργυρο είναι πιο ευαίσθητη (εικόνα 13). Με τη διαδικασία αυτή μπορούμε να παρατηρήσουμε πρωτεΐνες που βρίσκονται σε χαμηλότερη ολική συγκέντρωση, της τάξης 50-100 μg.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων της υπεροξυσωματιακής κλάσης 9, που έχει απομονωθεί από ήπαρ αρουραίων (βλ. εικόνα 2). 100 μg πρωτεΐνης προστέθηκαν στο gel και χρωματίστηκε με άργυρο.

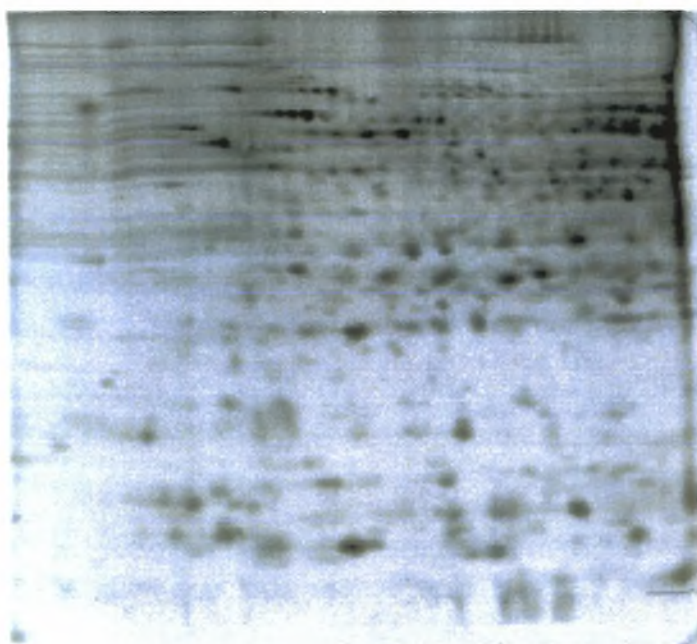
## ○ Χρώση με κυανικά

Η χρώση με κυανικά είναι η πιο ευαίσθητη από τις δύο παραπάνω χρωστικές, παρ' όλο που το κυανό του Coomassie είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο στην πρωτεομική ανάλυση.

Για να ανιχνεύσουμε διαφορές στη σύνθεση πρωτεϊνών από δύο διαφορετικά διαλύματα, η συμβατική μεθοδολογία των 2-D PAGE, στηρίζεται στην ανάλυση των εικόνων δύο διαφορετικών gel. Επειδή όμως υπάρχουν πάντα κάποιες διαφορές ανάμεσα στα gel, δεν μπορούν δύο διαφορετικές εικόνες να συγκριθούν άμεσα και χρειάζεται να τροποποιηθούν για να μπορούν να συγκριθούν και να γίνουν κάποιες μετρήσεις. Αντίθετα, η 2-D DIGE (2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) μπορεί να λύσει αυτό το πρόβλημα επιτρέποντας σε διαφορετικά δείγματα να τρέξουν στο ίδιο gel. Τα δείγματα αυτά, στη συνέχεια, αναλύονται σε διαφορετικές εικόνες, αλλά επειδή προέρχονται από το ίδιο gel, οι εικόνες τους μπορούν εύκολα να

τοποθετηθούν η μία πάνω στην άλλη και έτσι, άμεσα να συγκριθούν, χωρίς να χρειάζεται να γίνει κάποια τροποποίηση (Klose 1975).

Το gel της εικόνας 14 δείχνει μια τέτοια σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών δειγμάτων, ενός υπεροξυσωματιακού και μη-υπεροξυσωματιακού κλάσματος, σε αυτήν την περίπτωση, του 9 και 5 κλάσματος, αντίστοιχα.



**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων της υπεροξυσωματιακής κλάσης 9 και μη-υπεροξυσωματιακής 5, από ήπαρ αρουραίων (βλ. εικόνα 2). 250 μg πρωτεΐνης προστέθηκαν στο gel, το οποίο χρωματίστηκε με Cy5 & Cy3.

Παρατηρήσαμε, ότι οι περισσότερες από τις κηλίδες πάνω στο gel χρωματίστηκαν μπλε, που σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες που περιέχονταν στο μείγμα των δύο κλασμάτων 9 και 5, ήταν υπεροξυσωματιακές. Κάποιες κηλίδες χρωματίστηκαν κόκκινες, που σημαίνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες προέρχονταν από μη-υπεροξυσωματιακά κλάσματα. Τέλος, κάποιες κηλίδες είχαν χρωματιστεί και μπλε και κόκκινες. Το γεγονός ότι βρέθηκαν πρωτεΐνες που ανήκαν όχι μόνο σε υπεροξυσωμάτια, αλλά και σε άλλα οργανίδια, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα υπεροξυσωματιακά κλάσματα είχαν μολυνθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού. Σε αυτό το στάδιο του πειράματος, δεν είναι δυνατόν να καθορίσουμε σε ποια οργανίδια ανήκουν αυτές οι πρωτεΐνες. Η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry) μπορεί να το καθορίσει αυτό.

Η ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον διαχωρισμό πολύπλοκων δειγμάτων πρωτεϊνών. Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον χρωματισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων, πριν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, για διαφορική ανάλυση πολύπλοκων πρωτεϊνών στο ίδιο 2-D gel. Και αυτή η μέθοδος έχει κάποια μειονεκτήματα και περιορισμούς. Πρώτα από όλα, κάποιες κατηγορίες πρωτεϊνών, για παράδειγμα, οι υδρόφοβες, όπως είναι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, δεν μπορούν να διαχωριστούν καλά με αυτή τη μέθοδο. Λόγω του ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι πολύ λίγο διαλυτές στο buffer ενυδάτωσης του 2-D PAGE, πολύ συχνά κατακρημνίζονται και απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της ισοηλεκτρικής εστίασης (isoelectric focusing IEF). Επιπλέον, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι πολύ ετερογενείς σε πολλές περιπτώσεις, έτσι ώστε να συγκεντρώνονται σε ευρύ φάσμα ισοηλεκτρικών σημείων, κατά τη διάρκεια της IEF. Επιπρόσθετα, οι συγκεντρώσεις αυτών των πρωτεϊνών συνήθως είναι πιο κάτω από το όριο ανίχνευσής τους, κατά τον χρωματισμό των gel στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.

Τέλος, η ανάπτυξη της φθορίζουσας μεθόδου της διαφορικής ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, είναι ένας εύκολος και βολικός τρόπος για τη σύγκριση δύο διαφορετικών δειγμάτων, πάνω στο ίδιο gel.

## IV. Συμπεράσματα



Τα υπεροξυσωμάτια είναι οργανίδια που περιβάλλονται από μονή μεμβράνη και είναι παρόντα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Schäfer, K. Nau, A. Sickmann, R. Erdmann, H.E. Meyer 2001). Τα υπεροξυσωμάτια είναι πολύ σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του κυττάρου (Desvergne, and Wahli 1999) και γενικά για τη ζωή, αφού συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Δυστυχώς, όμως, συγκριτικά με άλλα οργανίδια, λίγα είναι γνωστά για αυτά και τις λειτουργίες τους.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε από τις ενζυμικές δοκιμασίες και το western blotting, βγάζουμε το συμπέρασμα ότι υπάρχει σημαντική μόλυνση των υπεροξυσωματιακών κλασμάτων από μιτοχόνδρια. Για αυτό το λόγο, το κύριο και σημαντικότερο συμπέρασμα μετά το πέρας του συγκεκριμένου πειράματος, είναι ότι πρέπει να γίνουν κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού, έτσι ώστε να είναι κατάλληλη να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα αρουραίων.

Μια βελτιωμένη μέθοδος για την απομόνωση υπεροξυσωματίων από ήπαρ αρουραίων, μπορεί να κάνει εφικτή την αναγνώριση καινούριων πρωτεϊνών των υπεροξυσωματίων και το πώς αυτές οργανώνονται μέσα στο οργανίδιο.

Απώλεια της λειτουργίας των υπεροξυσωματίων, μπορεί να μην είναι θανατηφόρα, αλλά σίγουρα προκαλεί πολλά προβλήματα και επηρεάζει τη ζωή των ανθρώπων.

Τελικά, μπορούμε να περιμένουμε νέα ενδιαφέροντα αποτελέσματα από μελέτες που γίνονται και βασίζονται στην πλήρη γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος και σε καινούριες τεχνικές ανάλυσης της έκφρασης των γονιδίων (serial analysis of gene expression SAGE). Αυτές οι τεχνικές μπορεί να μας βοηθήσουν να απαντηθούν κάποιες μελλοντικές ερωτήσεις όπως το πώς ανταποκρίνονται τα υπεροξυσωμάτια σε έκθεση σε πολλαπλασιαστές, και να αποκτήσουμε βαθύτερη γνώση για τις υπεροξυσωματιακές δυσλειτουργίες και ασθένειες (π.χ. παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, κ.α.) και με αυτόν τον τρόπο να σχεδιαστούν κλινικά φάρμακα για την αντιμετώπισή τους.

## V. Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του τμήματος Professor Stephan Nordlund που με υποδεχτηκε και με έφερε σε επαφή με τους υπεύθυνους του εργαστηρίου. Το ενδιαφέρον του για την πορεία και την εξέλιξη του πειράματός του έμεινε αμείωτο καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου. Επίσης, η παρουσίαση στο τέλος όλης της δουλειάς μου κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της παραμονής μου, σε όλους τους καθηγητές και φοιτητές με βοήθησε να καταλάβω σε βάθος το πείραμα και να εξοικειωθώ με τις παρουσιάσεις στην αγγλική γλώσσα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Professor Joe DePierre για την εγκάρδια υποδοχή μου στην ομάδα του, καθώς και τον Professor Buck Nelson, που συνεργάζεται μαζί του. Ο Professor Joe DePierre μου μετέφερε ακούραστα όλες τις γνώσεις του στον τομέα της τοξικολογίας και με βοήθησε να καταλάβω τη σημαντικότητα του πειράματος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Dr. Peter Chovanec που με βοήθησε ακούραστα στην εκμάθηση των τεχνικών για τη διεξαγωγή του πειράματος. Μου έμαθε να οργανώνω τον χρόνο του πειράματος και να μπορώ μόνη μου να ξεπερνώ όλες τις δυσκολίες κατά τη διάρκεια του πειράματος. Κοντά του κατάλαβα ότι το επάγγελμα του ερευνητή είναι και τρόπος ζωής.

Ευχαριστώ, τον συνάδελφό μου Martin Klose για τη φιλία και τη συναδελφικότητα που έδειξε και τη βοήθειά του στο πείραμα και για τις ευχάριστες και παραγωγικές ώρες στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή μου στην Ελλάδα, Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω σε αυτό το εργαστήριο και έτσι να γνωρίσω το πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης, τους ανθρώπους και τον τρόπο ζωής αυτής της υπέροχης χώρας. Ήταν μοναδική εμπειρία και ένα μάθημα ζωής για μένα.

## **VI. Αναφορές / Βιβλιογραφία**

**Aldred M.A., Morrison C., Gimm O., Hoang-Vu C., Krause U., Dralle H., Jhiang S., Eng C.** (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas. *Oncogene* **22**:3412-3416

**Angermuller S., Bruder G., Volkl A., Wesch H., Fahimi H.D.** (1987). Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur J Cell Biol* **45**:137-44.

**Antonenkov V.D., Sormunen R.T., Hiltunen J.K.** (2004). The behavior of peroxisomes in vitro: mammalian peroxisomes are osmotically sensitive particles. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**:1623-1635.

**Antonenkov V.D., Van Veldhoven P.P., Waelkens E., Mannaerts G.P.** (1997). Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. Sterol carrier protein 2/3-oxoacyl thiolase is involved in the metabolism of 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates. *J Biol Chem* **272**: 26023-31.

**Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P., Staels B., Auwerx J., Laville M., Vidal H.** (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of proliferator-activated receptors and liver X receptor- $\alpha$  in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**:1319-1327.

**Auwerx J.** (1999) PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* **42**:1033-1049

**Blackburn G.M., Gait M.J.** (1990). *Nucleic acids in chemistry and biology*. IRL Press, N.Y.

**Bowers W.E.**, (1973) Lysosomes in rat thoracic duct lymphocytes fractionated by zonal centrifugation. *J.Cell Biol.* **59**, 177-184.

**Braveman N., Chen L., Li P., et al.**, (2002). Mutation analysis of PEX7 in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype. *Hum. Mutat.* **20**:284-297

**Braverman N., Dodt G., Gould S.J., Valle D.** (1995). Disorders of peroxisome biogenesis. *Hum Mol Genet* **4** Spec No: 1791-1798.

**Bronfman M.** (1993). Possible role of CoA esters on xenobiotic-induced peroxisomal proliferation and non genotoxic carcinogenesis. In *Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and Medicine*. Chapter 10. G.Gibson & B.Lake eds.Taylor & Francis Ltd, London.

**Brown F.R. III, McAdams A.J., Cummins J.W., et al.**, (1982). Cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. *Johns Hopkins J. Med.* **151**:344-351

**Brui S., Westerveld A., Strijland A., et al.,** (1988). Genetic heterogeneity in the cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome and other inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions. A study using complementation analysis. *J. Clin. Invest.* **81**:1710-1715

**Carter J.H., Richmond R.E., Cater H.W., Potter C.L., Daniel F.B., DeAngelo A.B.** (1992). Quantitative image cytometry of hepatocytes expressing gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione S-transferase in diethylnitrosamine-initiated rats treated with Phenobarbital and/or phthalate esters. *J. Histochem* **40**:1105-1115

**Chang T.H., Szabo E.** (2000). Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisomes proliferator-activated receptor  $\gamma$  in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **60**:1129-1138

**Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J.** (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**:1866-1870

**Chen F., Law S.N., O'Malley B.W.** (1993) Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun* **196**:671-677

**Conway J.G., Tomaszewski K.E., Olson M.J., Cattley R.C., Marsman D.S., Popp J.A.** (1989). Relationship of oxidative damage to carcinogenicity with peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Wy-14643 (WY). *Carcinogenesis* **10**:513-520.

**Crane D.I., Holmes R., Masters C.J.,** (1982) Synthesis and incorporation of phospholipid by peroxisomes of mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 57-64.

**David R.M., Moore M.R., Cifone M.A., Finney D.C., Guest D.** (1999). Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci* **50**:195-205

**De Duve, C., Baudhuin, P.,** (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, **46**:323-357.

**DeAngelo A.B., Queral A.E., Garrett C.T.** (1985). Concentration-dependent inhibition of development of GGT positive loci in rat liver by the environmental contaminant di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Environ. Health Perspect.* **60**:381-385

**DeLuca J.G., Doebber T.W., Kelly L.J., Kemp R.K., Molon-Noblot S, Sahoo S.P., Ventre J., Wu M.S., Peters J.M., Gonzalez F.J., Moller D.E.** (2000). Evidence for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha-independent peroxisome proliferation: effects of PPAR-gamma/delta-specific agonists in PPARalpha-null mice. *Mol. Pharmacol.* **58**:470-476

**Desreumaux P., Dubuquoy L., Nutten S., Peuchmaur M., Englaro W., Schoonjans K., Derijard B., Desnergne B., Wahli W., Chambon P., Leibowitz M.D., Colombel J.F., Auwerx J.** (2001). Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoic X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) heterodimer: a basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* **193**:827-838

**Desvergne, W. Wahli.** (1999) Peroxisomes proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Rev.* **20**, 649-688.

**Dieuaide-Noubhani M., Asselberghs S., Mannaerts G.P., Van Veldhoven P.P.,** (\*1997). Evidence that multifunctional portein 2, and not multifunctional portein 1, is involved in the peroxisomal beta-oxidation of pristanic acid. *Biochem.* **325**:367-73.

**Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahly W.** (1992) Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68**:879-887

**Eibl G., Wente M.N., Reber H.A., Hines O.J.** (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**:522-529.

**Elstner E., Muller C., Koshikuza K., Williamson E.A., Park D., Asou H., Shintaku P., Said J.W., Heber D., Koeffler H.P.** (1998). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8806-8811

**Fahimi H.D.,** (1969). Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* **43**: 275-88.

Uchiyama A. Aoyama T, Kamijo K, Uchida Y, Kondo N, Orii T, Hashimoto T. 1996. Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **271**:30360-30365.

**Fajas L., Egler V., Reiter R., Hansen J., Kristiansen K., Depril M.B., Miard S., Auwerx J.** (2002) The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPAR $\gamma$  and adipocyte differentiation. *Dev Cell* **3**:903-910

**Fajas L., Egler V., Reiter R., Miard S., Lefebvre A.M., Auwerx J.** (2003) PPAR $\gamma$  controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene* **22**:4186-4193

**Fajas L., Auboef D., Raspe E., Schoonjans K., Lefebvre A.M., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart J.C., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs M.R., Staels B., Vidal H., Auwerx J.** (1997) Organisation, promoter analysis and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J Biol Chem* **272**:18779-18789

**Fournier B., Smeitink J.A., Dorland L., Berger R., Saudubray J.M., Poll-The BT.** (1994). Peroxisomal disorders: a review. *J Inherit Metab Dis* **17**: 470-86.

**Francis G.A., Fayard E., Picard F., Auwerx J.** (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* **65**:261-311

**Fujiki Y.,** (2000). Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* **476**:42-46

**Fujiki Y., Rachubinski R.A., Lazarow P.B.,** (1984). Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7127-7131

**Geisbrecht B.V., Collins C.S., Reuber B.E., Gould S.J.,** (1998). Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8630-8635

**Gelman L., Fruchart J.C., Auwerx J.,** (1999). An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell. Mol. Life Sci* **55**:932-943

**Gianello R., Nayudu R.,** (1993) Isolation of intestinal cell peroxisomes by rate-dependent banding in a vertical rotor. *Biochem. Mol. Biol.* **30**, 505-515

**Gonzales F.J., Peter J.M., Cattley R.C.,** (1998) Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor. *J. Natl Cancer Inst.* **23**, 1702-1709.

**Goldman B.M., Blobel G.,** (1978). Biogenesis of peroxisomes. Intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:5066-5070

**Greene M.E., Blumberg B., McBride O.W., Yi H.F., Kronquist K., Kwan K., Hsieh L., Greene G., Nimer S.D.,** (1995). Isolation of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expression* **4**:281-299

**Hasmall S.C., James N.H., McDonald N., Soames A.R., Roberts R.A.,** (2000). Species differences in response to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and PPAR-mediated gene expression. *Arch. Toxicol.* **74**:85-91

**Hettema E.H., Distel B., Tabak H.F.,** (1999): *Biochim. Biophys. Acta*, **1451**: 17-24

**Holta, E.,** (1977): Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: Purification and properties of polyamine oxidase. *Biochem.*, **16**:91-100

**Hu J.J., Hong J.Y., Lea M.A., Yang C.S.** (1998). Differential expression of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in Morris hepatomas and livers of tumor bearing rats. *Int J Oncol.* **12**:1049-53

**Imamura A., Tsukamoto T., Shimozawa N., et al.,** (1998). Temperature-sensitive phenotypes of peroxisome-assembly processes represent the milder forms of human peroxisome biogenesis disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 539-1543

**Inoue K., Kawahito Y., Tsubouchi Y., Kohno M., Yoshimura R., Yoshikawa T., Sano H.,** (2001). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**:727-732

**Issemann I., Gree S.,** (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**:645-650

**Issemann I., Prince R.A., Tugwood J.D., Green S.,** (1993). The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol.* **11**:37-47

**James N.H., Soames A.R., A.R., Roberts R.A.,** (1998). Suppression of hepatocytes apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen

di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB). *Arch. Toxicol.* **72**:784-790

**Jiang W.G., Douglas-Jones A., Mansel R.E.** (2003) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and the PPAR $\gamma$  coactivator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes. *Int J Cancer* **106**:752-757

**Johnson T.E., Holloway M.K., Vogel R., Rutledge S.J., Perkins J.J., Rodan G.A., Schmidt A.**, (1997). Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **63**:1-8

**Feizer I., Roggenkamp R., Harder W. and Veenhuis M.** (1992). Location of catalase in cristallin peroxisomes of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *FEMS* 583-590. *Microbiol. Lett.* **93**:7-12.

**Kersten S., Desvergne B., Wahly W.** (2000) Roles of PPARS in health and disease. *Nature* **405**:421-424

**Kliwer S.A., Forman B.M., Blumberg B., Ong E.S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D.J., Umesono K., Evans R.M.** (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:7355-7359

**Klose J.**, (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik.* **26**, 231-243.

**Knouff C., Auwerx J.** (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  calls for activation in moderation: Lessons from genetics and pharmacology. *Endocrine Reviews* **25**:899-918.

**Kubota T., Koshizuka K., Williamson E.A., Asou H., Said J.W., Holden S., Miyoshi I., Koeffler H.P.**, (1998). Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **58**:3344-3352

**Lake B.G.**, (1995). Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**:483-507

**Larsen T.M., Toubro S., Astrup A.** (2003) PPAR $\gamma$  agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**:147-161

**Lazarow, P.B.**, (1998). *The liver, Biology and Pathobiology*, 2<sup>nd</sup> edition, pp.241-254, Raven Press Ltd., N.Y

**Lazarow P.B., Fujiki Y.**, (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev. Cell Biol.* **1**:489-530

**Lazarow, P.B., Moser, H.W.**, (1995): *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R. et al., eds), pp. 2287-2324, McGraw-Hill

**Ledwith B.J., Johnson T.E., Wagner L.K., Pauley C.J., Manam S., Galloway S.M., Nichols W.W.**, (1996). Growth regulation by peroxisome proliferators: opposing activities in early and late G1. *Cancer Res.* **56**:3257-3264



**Lee C.H., Evans R.M.** (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in macrophage lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* **13**:331-335

**Maloney E.K., Waxman D.J.**, (1999). Trans-activation of PPAR and PPAR by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**:209-218

**Marsman D.S., Swanson-Pfeiffer C.L., Popp J.A.**, (1993). Lack of comitogenicity by peroxisome proliferator carcinogens, Wy-14,643 and clofibric acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **122**:1-6

**Martinez M.**, (1992). Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. *Brain Res.* **583**:171-182

**Mitchell A.M., Lhuguenot J.C., Bridges J.W., Elcombe C.R.**, (1985). Identification of the proximate peroxisome proliferators derived from di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80**:23-32

**Mitra J., Mason M.M., Olive M., Ktylov D., Gavrilova O., Marcus-Samuels B., Feigenbaum L., Lee E., Aoyama T., Eckhaus M., Reitman M.L., Vinson C.** (1998) Life without fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* **12**:3168-3181

**Moriwaki Y., Yamamoto T., Higashino K.**, (1999). Enzymes involved in purine metabolism - a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* **14**:1321-1340.

**Motley A.M., Hetteema E.H., Hogenhout E.M., et al.**, (1997). Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Natl. Genet.* **15**:377-380

**Mueller E., Smith M., Sarraf P., Kroll T., Aiyer A., Kaufman D.S., Oh W., Demetri G., Figg W.D., Zhou X.P., Eng C., Spiegelman B.M., Kantoff P.W.** (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:10990-10995

**Nagy L., Tontonez P., Alvarez J.G., Chen H., Evans R.M.** (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* **93**:229-240

**Oesterle D., Deml E.**, (1988). Promoting activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat liver foci bioassay. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **114**:133-136

**Page C., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J.A., Hoffman B.B.**, (1997). Integrated pharmacology. Disorders of lipid metabolism. London: Alfred place. **12**:270-271

**Palinski W., Glass C.K.** (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7614-7619

**Palmer C.N., Hsu M.H., Griffin K.J., Rausy J.L., Johnson E.F.**, (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression in human liver. *Mol. Pharmacol.* **53**:14-22

**Perrone C.A., Shao L., Williams G.M.,** (1998). Effect of rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferators on fatty acyl-CoA oxidase, DNA synthesis, and apoptosis in cultured human and rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **150**:277-286

**Peters J.M., Taubeneck M.W., Keen C.L., Gonzalez F.J.,** (1997). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) induces a functional zinc deficiency and teratogenesis during pregnancy independent of peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ . *Teratology* **56**:311-316

**Powers J.M., Moser H.W.,** (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol* **8**: 101-120.

**Purdue P.E., Zhang J.W., Skoneczny M., Lazarow P.B.,** (1997). Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Natl. Genet.* **15**:381-384

**Ricote M., Huang J.T., Welch J.S., Glass C.K.,** (1999). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J. Leucocyte Biol.* **66**:733-739

**Ricote M., Huang J., Fajas L., Li A., Welch J., Witztum J.L., Auwerx J., Ridker P.M., Cook N.R., Cheng S., Erlich H.A., Lindpaintner K., Plutkzy J., Zee R.Y.** (2003) Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -2 (PPAR $\gamma$ 2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:859-863

**Robbi M., Lazarow P.B.,** (1978). Synthesis of catalase of two cell-free protein synthesising system and in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4344-4348

**Roels F.** (1991). Peroxisomes. A personal account. Vub Press. Brussel.

**Rosen E.D., Spiegelman B.M.** (2001) PPAR- $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* **276**:33731-37734

**Saccone G.T., Sabine J.R.,** (1978). The lack of effect of fasting and alloxan-diabetes on the rate of fatty acid synthesis by some Morris hepatomas. *Cancer Lett.* **5**:35-8.

**Santos M.J., Imanaka T., Shio H., Lazarow P.B.,** (1988). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**:10502-10509

**Sarraf P., Mueller E., Jones D., King F.J., DeAngelo D.J., Partridge J.B., Holden S.A., Chen L.B. Singer S., Fletcher C., Spiegelman B.M.,** (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR gamma. *Natl. Med.* **4**:1046-1052

**Schäfer G., Nau K., Sickmann A., Erdmann R., Meyer H.E.,** (2001) Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **22**, 2955-2968.

**Setchell K.D., Bragetti P., Zimmer-Nechemias L., et al.,** (1992). Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome. *Hepatology* **15**:198-207

**Shearer B.G., Hoekstra W.J.** (2003) Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr Med Chem* **10**:267-280

**Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.**, (1996) *Anal. Chem.* **68**, 80-858.

**Slikker W., Andersen M.E., Bogdanffy M.S., Bus J.S., Cohen S.D., Conolly R.B., David R.M., Doerrer N.G., Dorman D.C., Gaylor D.W., Hattis D., Rogers J.M., Setzer R.W., Swenberg J.A., Wallace K.** (2004). Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: case studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* **201**:226-294.

**Smith-Oliver T., Butterworth B.E.**, (1987). Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat. Res.* **188**:21-28

**Spiegelman B.M.** (1998) PPAR- $\gamma$  adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47**:507-514

**Stryer L.** (1997). *Biochemistry II. Nucleotide biosynthesis.* **25**:673-675. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

**Subramani S.**, (1998): *Physiol. Rev.*, **78**:171-5

**Summary** of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* 1993; **269**:3015-3023. [Current recommendations from an expert panel on the evaluation of arteriosclerotic risk factors and the integration of pharmacologic and nonpharmacologic approaches to hyperlipidemia].

**Takahashi N., Okumura T., Motomura W., Fujimoto Y., Kawabata I., Kohgo Y.**, (1999). Activation of PPAR gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* **455**:135-139

**The peroxisome website;**<http://www.peroxisome.org>

**Thomopoulos G.,** (1995). Ο υποκυτταρικός κόσμος, **9**:243-248. University Studio Press.

**Titorenco V.I., Rachubinski R.A.**, (1998). The endoplasmatic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **23**:231-233

**Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M.**, (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR- $\gamma$ , a lip-activated transcription factor. *Cell* **79**:1147-1156

**Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.G., Thomazy V.A., Evans R.M.** (1998) PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**:241-252

**Urrea R., Bronfman M.** (1996). Species differences in the intracellular distribution of ciprofibril-CoA hydrolase. Implications for peroxisome proliferation. *FEBS Lett.* **389**:219-223

**Vamecq J., Latruffe N.**, (1999). Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* **354**:141-148

**Veenhuis M., Salomons F. A., Van Der Klei I.J.** (2000), Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis. *Microsc. Res.Tech.* **51**:584-600.

**Vidal-Puig A.J., Considine R.V., Jimenez-Linan M., Werman A., Pories W.J., Flier J.S., (1997).** Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight, loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **99**:2416-2422

**Wanders R.J., (1999).** Peroxisomal disorders: clinical, biochemical and molecular aspects. *Neurochem Res* **24**:565-580.

**Wanders R.J.A., Saelman D., Heymans H.A.S., et al., (1987).** Genetic relation between the Zellweger syndrome, infantile Reftsum's disease, and rhizomelic chondrodysplasia punctata. *N. Engl. J. Med.* **314**:787-788.

**Wanders R.J.A., Waterham H.R., (2004).** Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet* **67**:107-133.

**Ward J.M., Rice J.M., Creasia D., Lynch P., Riggs C., (1983).** Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and Phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* **4**:1021-1029.

**Ward J.M., Diwan B.A., Ohshima M., Hu H., Schuller H.M., Rice J.M., (1986).** Tumor-initiating and promoting activities of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in vitro and in vivo. *Environ. Health Perspect.* **65**:279-291.

**Ward J.M., Peters J.M., Parella C.M., Gonzalez F.J., (1998).** Receptor and non-receptor mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  null mice. *Toxicol. Pathol.* **26**:240-246.

**Wilson T.M., Brown P.J., Sternbach D.D., Henke B.R. (2000)** The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43**:527-550

**Yeldandi A.V., Chu R., Pan J., Zhu Y., Usuda N. (1996).** Peroxisomal purine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **804**: 165-175.

**Zhu Y., Qi C., Korenberg J.R., Chen X-N., Noya D., Rao M.S., Reddy J.K. (1995)** Structural organization of mouse peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (mPPAR $\gamma$ ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR $\gamma$  isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:7921-7925