

Energiarajoituksen ja resveratrolin vaikutus maksan NR4A-
tumareseptoreiden määrään kokeellisessa lihavuusmallissa

Jani Pirinen, LK

Opiskelijanumero: 013296186

Helsinki 18.5.2009

Tutkielma

Ohjaaja:

Professori Eero Mervaala

HELSINGIN YLIOPISTO

Biolääketieteen laitos, Farmakologia

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biolääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Jani Pirinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Energia rajoituksen ja resveratrolin vaikutus maksan NR4A-tumareseptoreiden määrään kokeellisessa lihavuusmallissa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2009	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 21	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Tutkimuksessa tutkittiin NR4A-ryhmän tumareseptoreiden määrän muutosta maksakudoksessa energia rajoituksen ja resveratrolin vaikutuksista. Tutkimus tehtiin hiirillä ja laboratoriomenetelmänä oli Western Blot.</p> <p>NR4A-tumareseptoriryhmään kuuluvat Nur77, Nurr1 ja NOR-1. Ne säätelevät useissa kudoksissa useita eri solunsisäisiä tapahtumia. Maksassa ne säätelevät eri metabolisia prosesseja, etenkin glukoneogeneesiä ja lipogeneesiä. Lipogeenisillä on merkitystä rasvamaksan syntyyn ja glukoneogeenisillä taas on merkitystä veren sokeripitoisuudelle ja lisääntynyt glukoneogeneesi on merkittävä tekijä Tyypin 2 Diabetes Mellitus-taudissa esiintyvän hyperglykemian kannalta.</p> <p>Saamiemme tulosten mukaan Nur77:n määrä nousee selvästi energia rajoituksen vaikutuksesta runsasrasvaista ravintoa syöneeseen kontrolliryhmään verrattuna. NOR-1:n määrä nousee selvästi suurella (4 g/kg) rehupitoisuudella resveratrolia. Nurr1:n tuloksissa ei löytynyt statistisesti merkittäviä eroja ryhmien välillä.</p> <p>Tulkintani mukaan resveratrol on potentiaalinen maksan rasvoittumisen estäjä ja glukoneogeneesiä lisäävä aine stimuloimalla NR4A-ryhmän tumareseptoreita maksassa. Täten resveratrol ei ainakaan hepatosyyttien NR4A-reitin kannalta selitä sitä tosiasiaa että resveratrol vähentää diabeettista hyperglykemiaa.</p> <p>(128 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords NR4A, Nur77, Nurr1, NOR-1, caloric restriction, resveratrol, liver			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Terkko			
Muuta tietoa – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaaja: Eero Mervaala			

1 Johdanto	1
2 Kirjallisuuskatsaus	2
3 Aineisto ja menetelmät	5
3.1 Tutkimusaineisto.....	5
3.2 Näytteiden preparoiminen	6
3.3 Western Blot-menetelmä	7
3.4 Western Blot-tulosten mittaaminen	9
3.5 Statistinen analyysi.....	9
4 Tulokset	10
4.1 Nur77	11
4.2 Nurr1	12
4.3 NOR-1.....	13
5 Pohdinta.....	14
6 Johtopäätökset	18
7 Lähteet.....	18

1 Johdanto

Tutkimuksessani mitattiin NR4A-tumareseptoreiden määrä eri hiirten maksoista, jolla voi olla merkitystä tyypin kaksi diabeetoksen kannalta (glukoneogeneesin kautta). Myös maksan rasvoittuminen on liittynyt NR4A-tumareseptoreiden aktiviteettiin (lipogeneesin kautta). NR4A-tumareseptoreiden perheeseen kuuluvat NR4A1 (Nur77, TR-3 tai NGFI-B), NR4A2 (Nurr1 tai NOT) ja NR4A3 (NOR-1 tai MINOR) (1). Tässä tekstissä tullaan käyttämään nimityksiä Nur77, Nurr1 ja NOR-1.

Tyypin kaksi Diabetes Mellitus on kasvava ongelma länsimaissa, ja se aiheuttaa veren glukoosipitoisuuden nousun, jolla on pitkään jatkuneena tiettyjä komplikaatioita. Näitä ovat muun muassa perifeeristen hermojen vauriot (diabeettinen neuropatia) sekä ääreisverenkierron huononemisesta johtuvat iho-ongelmat ja immuunijärjestelmän heikkeneminen. Diabetes tyyppi kahden tarkkaa patofysiologiaa ei tunneta, mutta lihavuuden (varsinkin runsas abdominaalinen viskeraalinen rasvakudos) on huomattu korreloivan vahvasti diabeetoksen kanssa. Tyypin kaksi diabeetoksen keskeinen syy hyperglykemiaan on insuliiniresistenssi. Insuliinia on veressä enemmän kuin terveessä henkilössä mutta insuliini-vaste on kuitenkin pienempi suurentuneesta määrästä huolimatta. Myös suurentuneella insuliinipitoisuudella veressä on itsessään haittoja. Veren glukoosipitoisuutta voi alentaa joko lisäämällä glukoosin siirtymistä verestä muihin kudoksiin (esimerkiksi luurankolihas) tai vähentämällä glukoosin siirtymistä maksasta vereen. Molemmilla tavoilla toimivia lääkkeitä on markkinoilla. Glukoneogeneesi on aineenvaihduntareitti, jossa glukoosia muodostetaan pienemmistä molekyyleistä, kuten pyruvaatista tai glyserolista.

Rasvamaksa liittyy runsaaseen alkoholinkäyttöön (alkoholirasvamaksa) mutta myös runsaaseen rasvaisen ravinnon syöntiin ja lihavuuteen. Rasvamaksalla tarkoitetaan rasvan kertymistä maksasoluihin (hepatosyytteihin) ja se voi johtaa vakavampiin maksasairauksiin (esimerkiksi maksakirroosi).

2 Kirjallisuuskatsaus

NR4A-tumareseptoreilla on lukuisia vaikutuksia monissa eri kudoksissa. Ne kuuluvat orporeseptoreiden ryhmään, eli niillä ei ole tunnettua ligandia, mutta niiden aktiviteettia säädellään muun muassa fosforylaatiolla. (2)

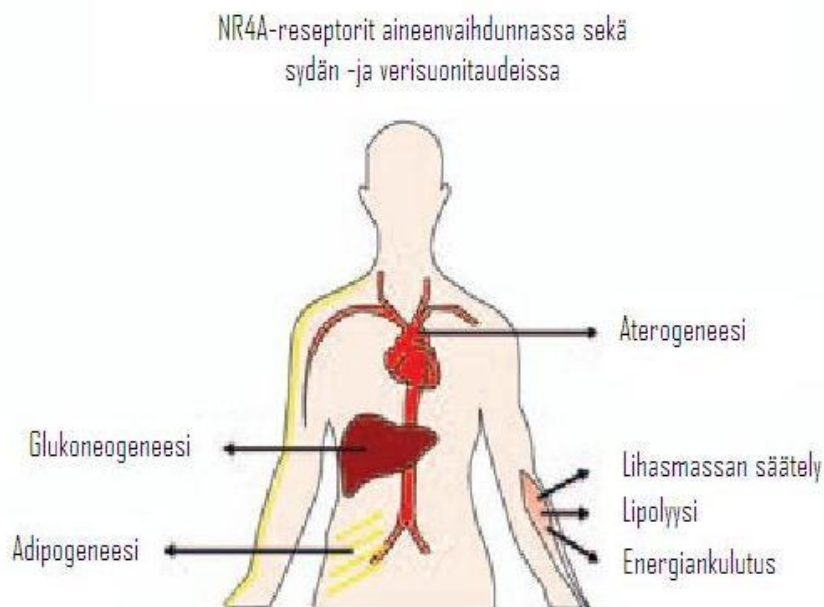
NR4A-reseptoreilla on muiden tumareseptoreiden tapaan keskeinen DNA:ta sitova kohta, C-terminaalinen ligandia sitova kohta sekä N-terminaalinen transaktivaatiokohta. DNA:ta sitova kohta on hyvin säilynyt (90 % homologia) ja sisältää kaksi sinkkisormea jotka ovat kontaktissa DNA:n kanssa. N-terminaalinen kohta sitoo ligandista riippumatonta koaktivaattoria ja tässä kohdassa on eri reseptoreiden välillä suuria eroja (30 % aminohappohomologia). Tämä N-terminaalinen kohta on NR4A-reseptoreilla erilainen kuin muilla tumareseptoreilla: se sisältää paljon hydrofobisia ja aromaattisia aminohappoja, ja tämän takia NR4A-reseptoreilla tuskin on luonnollista ligandia. Ligandin puutoksen takia NR4A-reseptoreiden ekspresion säätely sekä ko-aktivaattorit ja –repressorit ovat tärkeitä reseptoreiden aktiviteetin säätelyn kannalta. NR4A-reseptoreiden aktivaattoreihin kuuluvat muun muassa 6-merkaptopuriini (kaikki reseptorit), prostaglandiini A2 (NOR-1) sekä bentsamiditsolit (Nurr1). NR4A-ryhmän reseptoreiden ainoa tunnettu suoraan reseptoriproteiiniin sitoutuva aktivaattori on prostaglandiini A2. (3)

Makrofageissa NF- κ B-tulehdusvälittäjäketju lisää NR4A-reseptorien ekspressiota. Niiden tarkkaa merkitystä makrofageissa ei tiedetä, mutta niiden arvellaan säätelevän NF- κ B:n ilmentymistä negatiivisen palautteen tapaan. NF- κ B-ketju aktivoituu muun muassa LPS:n eli lipopolysakkaridin avulla. (3) Nurr1:n määrän makrofageissa tiedetään ainakin nousevan reumassa ja yksi tärkeä tulehdusgeeni jonka ekspressiota Nur77 lisää on IKKi. NR4A-reseptoreiden toiminta makrofageissa kiinnostaa tutkijoita reseptoreiden mahdollisen ateroskleroosiin liittyvän merkityksen takia. (4)

Rasvakudoksessa NR4A-reseptoreiden määrän tiedetään nousevan insuliinin vaikutuksesta (5). Preadiposyyteissä Nur77:n ekspressio nousee äkillisesti cAMP-agonistien vaikutuksesta, mutta se ei muutu muiden preadiposyyttien erilaistumista stimuloivien ärsykkeiden vaikutuksesta, kuten PPAR γ :n ligandien. Täten Nur77-reittiä ei pidetä välttämättömänä preadiposyyttien erilaistumisessa adiposyyteiksi. Tulehdusärsykkeet, kuten lipopolysakkaridi ja TNF- α , jotka ovat erilaistumisen vastavaikuttajia, lisäävät myös Nur77:n ekspressiota preadiposyyteissä. Retroviraalisen siirron avulla on tutkittu kaikkien NR4A-ryhmän reseptoreiden vaikutusta preadiposyytteihin, ja niiden on todettu vähentävän adipogeneesiä. Nur77:n kohdegeeneiksi adiposyyteissä on löydetty Gja1 (gap-junction protein alpha 1) sekä Tll1 (tolloid-like 1). (6)

Luurankolihasessa NR4A-reseptorit ovat kytköksissä adrenergisen stimulaation kanssa. Ainakin NOR-1:n ja Nur77:n määrä luurankolihasoluissa nousee β -reseptoreita stimuloivia lääkkeitä käytettäessä. β -reseptoreiden stimulaatio luurankolihasoluissa lisää solujen lipolyysiä, ja on siten kytköksissä kehon energia-aineenvaihduntaan. (1) Tämä lipolyysin lisääminen on myös ajateltu olevan mahdollinen mekanismi selektiivisen Nur77-agonistin käytölle laihdutuslääkkeenä (7). Nur77:n tiedetään myös olevan kytköksissä luurankolihasolun glukoosiaineenvaihduntaan. Nur77:n määrä nousee enemmän glykolyttisissä kuin oksidatiivisissa luurankolihasoluissa β -reseptoristimulaation seurauksena ja Nur77:n on näytetty lisäävän tärkeiden glukoosiaineenvaihduntaan liittyvien geenien, kuten GLUT4:n (insuliiniriippuvainen solukalvon glukoosinkuljettaja), fosfofruktokinaasin sekä glykogeenifosforylaasin ekspressiota. Nur77 on myös yksi välitysreitti hermolihasliitoksen stimulaation aiheuttaman energia-aineenvaihduntaan liittyvien geenien lisääntyneeseen ekspressioon. Jos luurankolihasolun hermotus poistetaan, myös Nur77:n ekspressio laskee. (8) NOR-1:n lisääntyneen aktiiviteetin tiedetään lisäävän luurankolihasolun hypertrofiaa jarruttamalla myostatiini-reitin aktiiviteettia, ja tämän ärsykkeenä toimii ainakin β -reseptoristimulaatio (9).

Maksassa NR4A-reseptorit säätelevät glukoneogeneettisten entsyymien ekspressiota, ja niillä on siten merkitys veren glukoositasapainolle. NR4A-reseptoreiden ei ole havaittu reagoivan insuliiniin ja sen aiheuttamaan solunsisäiseen viestintäkaskadiin maksassa (10). NR4A-reseptoreiden glukoneogeneesiä lisäävä vaikutus välittyy cAMP:n (syklinen adenosini-monofosfaatti) ja CREB:in (cAMP-elementtiä sitova proteiini) kautta, jota muun muassa adrenaliini ja glukagoni stimuloivat (11). Lihavuudella ja rasvaisella ravinnolla tiedetään olevan cAMP:ia lisäävä vaikutus hepatosyyteissä (12). NR4A-reseptoreiden toimintaa hepatosyyteissä käsitellän tarkemmin luvussa 6. Pohdinta.



Kuva muunnettu artikkelista (1).

Resveratrol on kasvipiperäinen polyfenoli, jota on mm. viinirypäleiden kuorissa. Resveratrol eristettiin ensimmäiseksi kiinalaisen perinnelääketieteen kasvista *Veratrum grandiforum* (13). Resveratrol vähentää diabeettisten hiirten hyperglykemia taipumusta ja se muun muassa normalisoi PEPCK:n (fosfoenolipyruvaattikarboxykinaasi) aktiivisuutta maksasoluissa (14). PEPCK on glukoneogeneettinen entsyymi jonka ekspressiota cAMP:in välittämä viestintäreitti stimuloi, mutta se kuuluu viestintäreitin toiseen haaraan kuin NR4A-reseptorit (11).

Resveratrolilla on tunnettu olevan useita farmakologisia vaikutuksia eri puolilla kehoa. Se on herättänyt erityistä mielenkiintoa ateroskleroosia hidastavan vaikutuksensa takia. Muun muassa Ranskan paradoksi, eli se että ranskalaisilla on vähemmän sydän- ja verisuonitautitapauksia kuin muilla länsimaalaisilla runsaasti tyydyttyneitä rasvoja sisältävästä ruokavaliostaan huolimatta, on yritetty selittää ranskalaisten runsaasti juoman punaviinin sisältämällä resvetrolilla (13). Resveratrolin ateroskleroosia hidastaviin vaikutuksiin kuuluu muun muassa LDL:n hapettumisen esto, trombosyyttiaggregaation muuttaminen, verisuonten sileälihassolujen proliferaation esto, makrofagien aiheuttaman tulehduksen vähentäminen sekä veren lipoproteiinitasojen muuttaminen (15). Resveratrolin on myös todettu vähentävän insuliinin eritystä haimasta (16). Resveratrolin vaikutuksia hepatosyyttien soluviestintään käsitellään tarkemmin luvussa 6. Pohdinta.

3 Aineisto ja menetelmät

Tutkimus on biokemiallinen analyysi eläinkokeesta. Tutkimuksen kohteena ovat NR4A-ryhmän tumareseptorit hiirten maksoissa. Hiirten maksakudokset on homogenoitu ja preparoitu Western Blot-menetelmää varten ja tämän jälkeen ajettu elektroforeesissa ja blotattu membraanille. Reseptoriproteiinien määrä on tämän jälkeen mitattu. Western Blot-tulokset on sen jälkeen analysoitu statistisesti.

3.1 Tutkimusaineisto

Tutkimuksessa käytin vuoden 2007 lopulla Kuopiossa toteutetun kokeen C57Bl/6J uroshiirien maksoista saatuja kudospaloja. Tutkimuksessa oli 100 eläintä jotka jaettiin viiteen ryhmään. Näistä eläimistä minä analysoin 45 maksaa, eli yhdeksän jokaista ryhmää kohti.

Ryhmälle 1 syötettiin runsasrasvaista (60 % kokonaisenergiasta rasvasta) ravintorehua ad libitum. Ryhmä 1 simuloi länsimaalaista dieettiä ja toimi kontrolliryhmänä. Ryhmälle 2 syötettiin myös runsasrasvaista rehua, mutta lisäksi näille hiirille syötettiin rehun mukana resveratrolia 2 mg/kg. Ryhmän 3 hiirille lisättiin resveratrolia 4 g/kg rehuun, joka myös oli samanlaista kuin ryhmillä 1 ja 2. Tämä rehupitoisuus resveratrolia vastaa noin 150 mg/kg päivä-annosta ryhmässä 2 ja 300 mg/kg ryhmässä 3. Ryhmä 4 sai runsasrasvaista ravintorehua mutta energian saantia rajoitettiin seitsemäänkymmeneen prosenttiin ad libitum-määrästä. Ryhmälle 5 syötettiin matalarasvaista (10% kokonaisenergiasta rasvasta) ravintorehua ad libitum. Ryhmän 4 hiirten keskipaino oli 43 g, ryhmän 2 41 g, ryhmän 3 42 g, ryhmän 4 27 g ja ryhmän 5 35 g.

Tutkimuksen kesto oli 12 viikkoa, jonka aikana seurattiin tutkittavien koe-eläinten painonkehitystä, ravinnonkulutusta ja verenpainetta. Lisäksi mitattiin kerran rasvakudoksen määrä ja tutkittiin aineenvaihduntaa erikoislaitteiden avulla. Hiirten rasvaprosenttien keskiarvoiksi saatiin ryhmässä 1 51 %, ryhmässä 2 51 %, ryhmässä 3 50 %, ryhmässä 4 36 % ja ryhmässä 5 39 %.

3.2 Näytteiden preparoiminen

Käytin biokemiallisessa analyysissä paloja hiirten maksoista, jotka oli hiirten tapon jälkeen dissekoitu pois. Jokaisen näytteen preparoimiseen käytin noin neljäsosan hiiren maksasta.

Ensin kudospalat jäädytetään nestetyypellä ja jauhetaan homogeeniseksi massaksi morttelin avulla. Tämän jälkeen kudoshomogenaatti kaadetaan koeputkeen nestetyypen kanssa ja laitetaan koeputki pystyyn jäihin kunnes tyyppi on haihtunut. Tyyppi haihduttua massaan lisätään Elisa-puskuria noin puoli millilitraa ja sekoitus sentrifugoidaan.

Sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan supernatantti erilliseen koeputkeen ja määritetään sen proteiinipitoisuus. Proteiinipitoisuus täytyy määrittää, kun

kudoshomogenaatin määrä ei ole tarkalleen tunnettu. Proteiinipitoisuus määritetään lisäämällä supernatanttiin Bio-Rad Protein Assay-reagenssia, joka sitoutuu emäksisiin ja aromaattisiin aminohappotähteisiin, etenkin arginiiniin, ja värjää proteiinit absorboimaan 595-nanometristä valoa. Liuoksen absorbanssi mitataan spektrofotometrin avulla, ja absorbanssi on suoraan verrannollinen supernatantin proteiinipitoisuuteen. Spektrofotometrin kalibroimiseksi tehdään kalibrointikäyrä naudun seerumin albumiinia sisältävästä standardiliuoksesta samalle kuoppalevyille kuin näytteet, ja verrataan jokaisen näytteen absorbanssia kalibrointikäyrään.

Kun proteiinipitoisuus on määritetty, supernatantit laimennetaan veteen siten, että jokaisen näytteen proteiinipitoisuudeksi tulee 4 µg/µl. Täten näytteet ovat vertailukelpoisia lisätyn Elisapuskurin määrästä huolimatta. Laimennettua näytettä otetaan 5 µl erilliseen putkeen ajonäytettä varten, johon lisätään myös 5 µl Elisa-puskuria ja 10 µl LSB-puskuria. Täten jokaiseen ajonäytteeseen tulee 20 µg proteiinia, ja näytteen kokonaistilavuudeksi tulee 20 µl.

3.3 Western Blot

Ajonäytteet ajetaan SDS-Page-geelielektroforeesissa ensin 100 V jännitteellä puoli tuntia ja sen jälkeen kaksi ja puoli tuntia 110 V jännitteellä. Täten näytteen eri proteiinit saadaan eroteltua toisistaan niiden molekyyllipainon perusteella: kevyet proteiinit ajautuvat pitkän matkan ja raskaat lyhyen. Geelille lisätään myös yhteen kaivoon proteiineille tarkoitettu painomarkkeri, joka havainnollistaa muissa kaivoissa olleiden proteiinien kulkeutumista geelissä.

Elektroforeesiajon jälkeen geelit laitetaan blottauslaitteeseen, jossa ne ajetaan 190mA virralla kaksi tuntia. Blottauslaitteeseen tulee geelien lisäksi fluoresenssimembraanit geelien alle sekä kahdet suodatinpaperit geelien päälle ja kahdet fluoresenssimembraanien alle. Tällöin proteiinit ajautuvat geelistä fluoresenssimembraanille ja ne muodostavat membraanille saman kuvion kuin

geelillä, eli ne ovat järjestyksessä molekyylipainon mukaan yhdellä akselilla ja näytenumeron mukaan toisella.

Membraanit laitetaan blottauksen jälkeen 5 % maito-TBS-Tween-liuokseen blokkaukseen, jossa ne pidetään kaksi tuntia, ravistelijan niitä koko ajan pitäen liikkeessä. Blokkauksen tarkoituksena on estää vasta-aineita sitoutumasta muuhun kuin haluttuun proteiiniin.

Blokkauksen jälkeen membraanit laitetaan TBS-Tween-maitoliuokseen, johon on lisätty ykkösvasta-ainetta, seuraavaan työpäivään asti (16 tuntia) kylmähuoneeseen ravistelijan niitä koko ajan pitäen liikkeessä. Ykkösvasta-aineena käytin Nur77-reseptorin kannalta Santa Cruz Biotechnology inc. Nur77 (M-210):sc-5569 pitoisuudessa 1:2000. Nurr1 reseptorin kannalta ykkösvasta-aineena käytin Santa Cruz Biotechnology inc. Nurr1 (N-20):sc-991 pitoisuudessa 1:500. NOR-1-ykkösvasta-aineenani oli Santa Cruz Biotechnology inc. NOR-1 (H-180):sc-30154 pitoisuudessa 1:8000.

Ykkösvasta-aineinkubaation jälkeen membraanit pestään viisi minuuttia kolmeen kertaan TBS-Tween-liuoksella. Pesun jälkeen membraanit laitetaan kahdeksi tunniksi TBS-Tween-maitoliuokseen, johon on lisätty kakkosvasta-ainetta (Chemicon International Sheep Anti-rabbit IgG) pitoisuuteen 1:5000. Kun kakkosvasta-aineinkubaatio on valmis, membraaneille laitetaan Amersham ECL Plus-fluoresenssiliuosta, joka sitoutuu kakkosvasta-aineeseen ja säteilee fluoresenssisäteilyä.

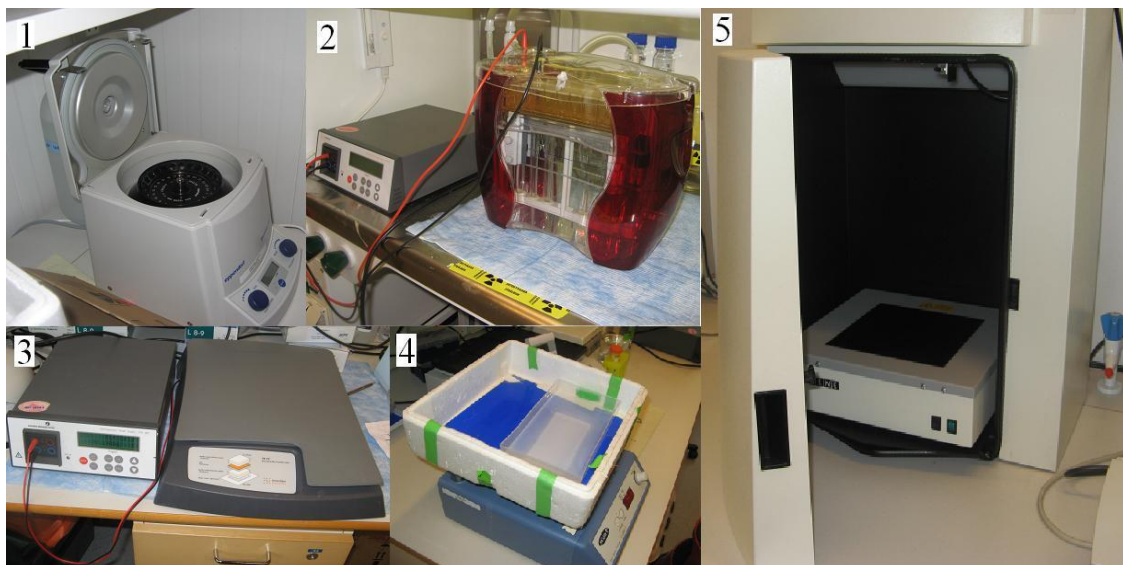
Fluoresenssiliuoksen lisäämisen jälkeen membraanit odottavat viisi minuuttia, jolloin ECL-liuos reagoi vasta-aineiden kanssa. Tämän odotuksen jälkeen fluoresenssisäteily pitää mitata tunnin sisällä. Mittaus tapahtuu laittamalla membraanit pimiössä filmikasettiin, johon myös laitetaan filmi tietyksi ajaksi (valotusaika). Valotusaika oli minun kokeiden kannalta kymmenen sekuntia.

Tämän jälkeen filmi kehitetään käyttäen kehitettä ja kiinnitettä, jolloin niihin jää tutkittavan proteiinin kohdalle fluoresenssisäteilyn aiheuttama musta täplä.

3.4 Western Blot-tulosten mittaaminen filmiltä

Kehitetyistä filmeistä mitataan täplän tiheys jokaista näytettä kohti densitometrin avulla. Mitä suurempi haetun proteiinin pitoisuus näytteessä on, sitä enemmän ykkösvasta-ainetta kyseiselle kohdalle sitoutuu. Suurempi määrä ykkösvasta-ainetta taas sitoo enemmän kakkosvasta-ainetta ja suurempi määrä kakkosvasta-ainetta taas sitoo enemmän fluoresenssiluosta, mikä johtaa vahvempaan fluoresenssisäteilyyn ja vahvemman täplän muodostumiseen filmille. Densitometrin antamia tiheyksiä voidaan verrata keskenään, mutta ne eivät ole kvantitatiivisia muihin tutkimuksiin verrattaessa.

Käytin ryhmää 1 kontrolliryhmänä. Tämän ryhmän näytteiden keskiarvoksi laitoin 1,0 yksikköä, ja jokainen samalla geelillä ajettu näyte sai vertailukelpoisen numeerisen arvonsa jakamalla näytteen densitometri tiheys kontrolliryhmän tiheyden keskiarvolla.



1.Sentrifiugi jolla näytteet sentrifugoidaan ennen proteiinipitoisuuksien määrittystä 2.Geielektroforeesilaitte 3.Western Blot-laitte 4.Ravistelijaite membraanien blokkaukseen ja vasta-aineinkubaatiota varten 5.Densitometri

3.5 Statistinen analyysi

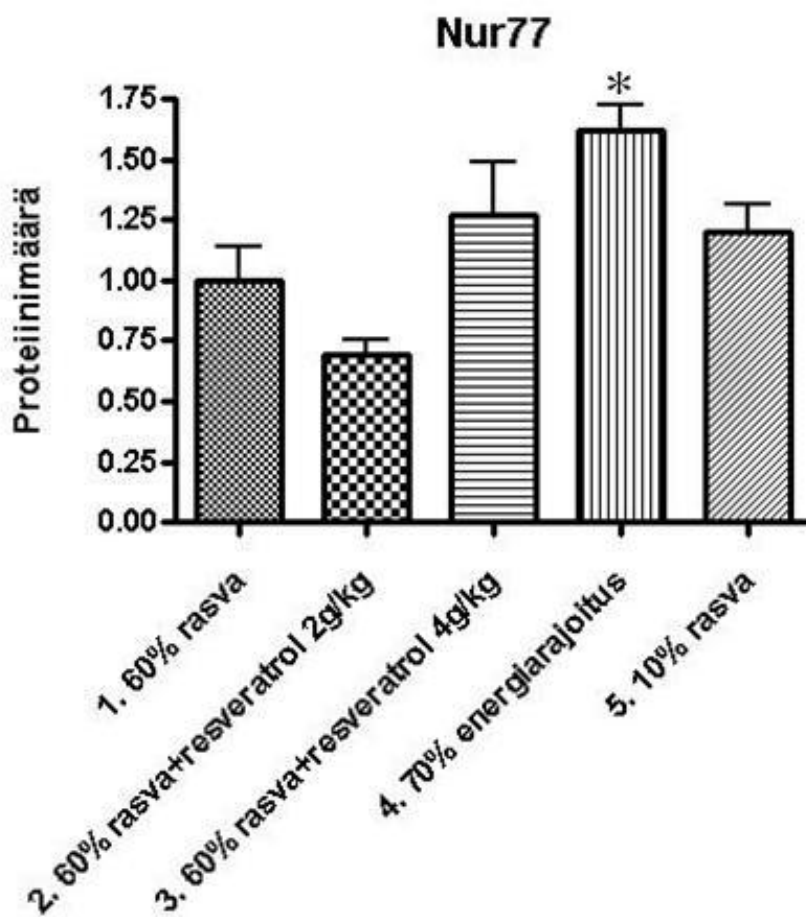
Statistisessa analyysissä käsiteltiin jokaisen hiiren densitometritulosta kahden koekerran keskiarvona. Kustakin reseptorityypistä tein parivertailuja kontrolliryhmän ja muiden neljän hiiriryhmän kesken. Käytin normaalivarianssianalyysiä (ANOVA) ja statistisen merkittävyyden mittaamiseen Dunnettin testiä. Dunnettin testin vertailuryhmänä oli aina ryhmä 1. Tällä tapaa tutkin jos ryhmillä 2-5 olisi merkittävää muutosta kontrolliin verrattuna. Tässä tutkimuksessa löydös on todettu merkittäväksi jos $p < 0.05$.

4 Tulokset

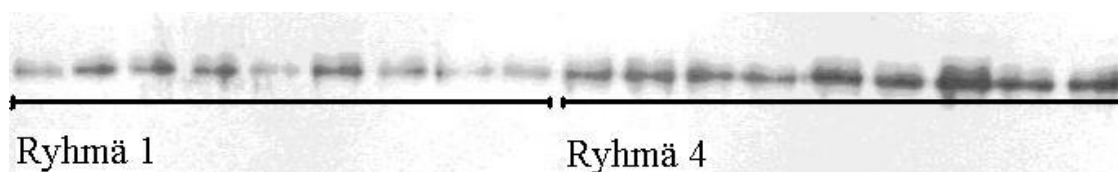
Tulosten esittely on tehty ryhmien näytteiden keskimääräisen proteiinipitoisuuden vertailuna kontrolliryhmän näytteiden keskimääräiseen proteiinipitoisuuteen. Jokaisella membraanilla on luotettavuuden vuoksi laskettu uudelleen kontrolliryhmän densitometriheyksien keskiarvo, johon toisen samalla membraanilla olleen ryhmän näytteet on verrattu.

Tuloksista on jokaisen reseptorin kannalta tehty pylväskuvio selkeyden vuoksi. Jokaisen pylvään yhteyteen on piirretty myös s.e.m., eli standardi virheen keskiarvo. Myös Western Blotin densitointivaiheessa otettuja kuvia on näytetty niiden ryhmien kannalta, joista on löytynyt statistisesti merkittäviä tuloksia.

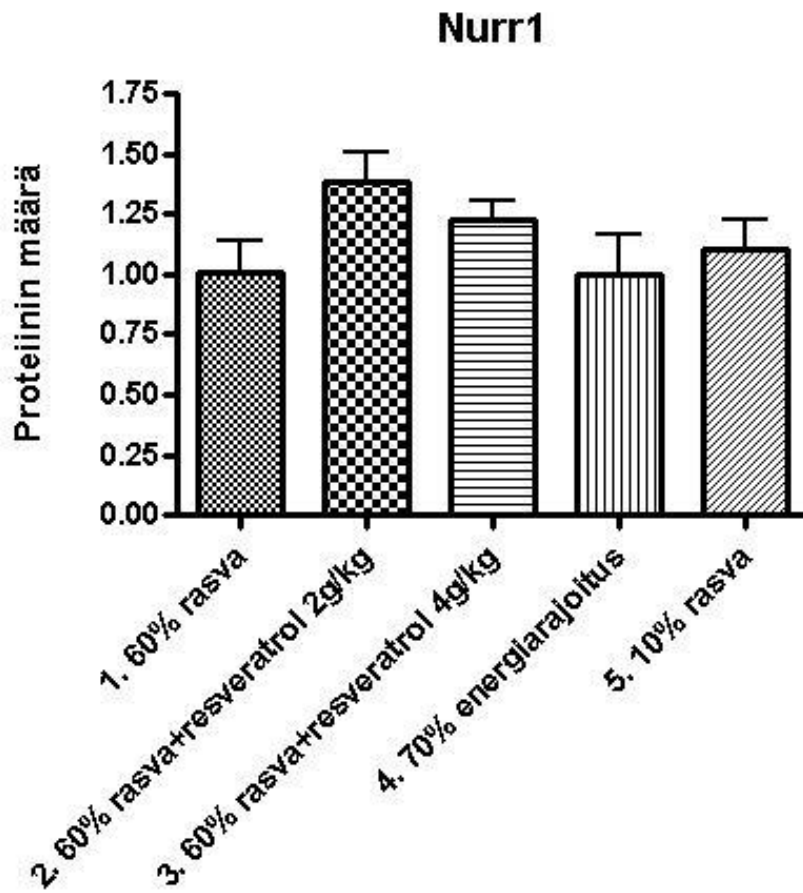
4.1 Nur77



Vähiten Nur77-proteiinia oli ryhmällä 2 (60 % rasva+resveratrol 4 g/kg) ja eniten oli ryhmällä 4 (70 % energiarajoitus). Ryhmällä 4 oli statistisesti merkittävä määrä enemmän proteiinia kuin kontrolliryhmällä. Muita statistisesti merkittäviä löydöksiä ei Nur77-reseptorin kannalta löytynyt tässä tutkimuksessa.

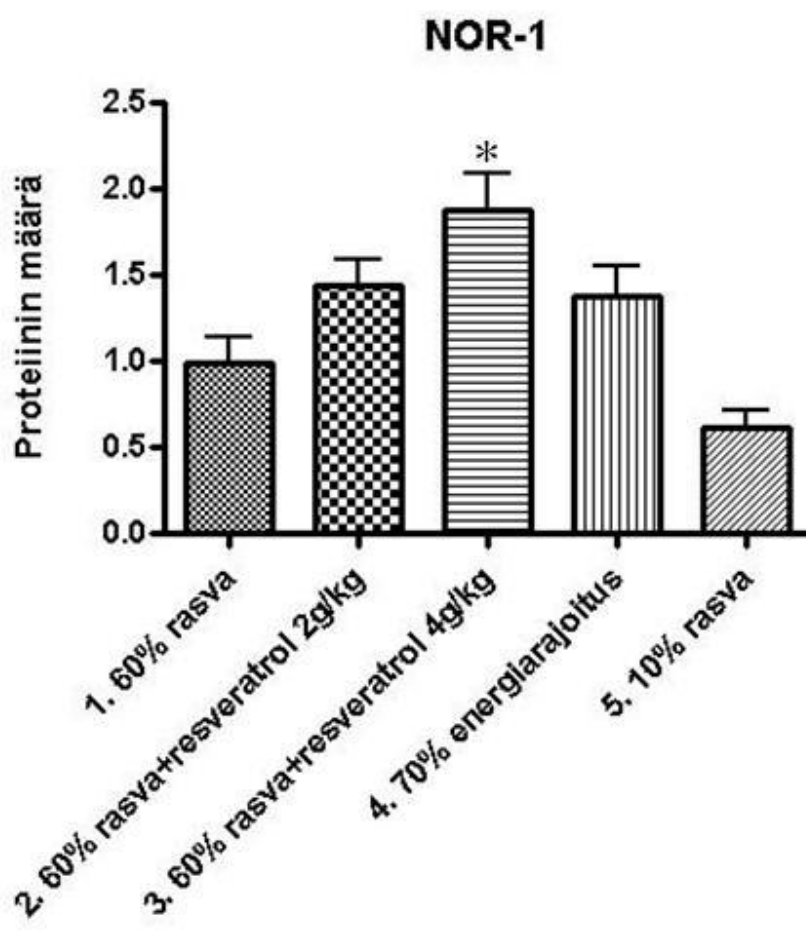


4.2 Nurr1

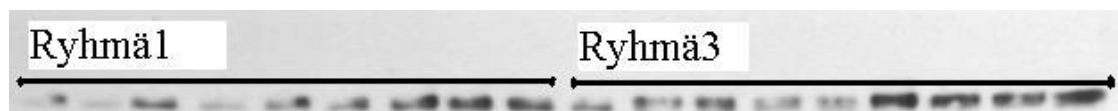


Nurr1-reseptorin kannalta proteiinin määrä oli melko tasainen eri ryhmien välillä. Vähiten proteiinia oli ryhmällä 1, toiseksi vähiten ryhmällä 4. Ryhmällä 2 oli eniten reseptoriproteiinia ja statistisesti merkittäviä eroja kontrolliryhmään ei löytynyt.

4.3 NOR-1



NOR-1 reseptorin kannalta ryhmissä 2, 3 ja 4 oli enemmän proteiinia kuin kontrolliryhmässä ja ryhmällä 5 taas huomattavasti vähemmän kuin kontrolleilla. Statistista merkitystä on ryhmien 1 ja 3 tulosten välillä ($p < 0,01$)



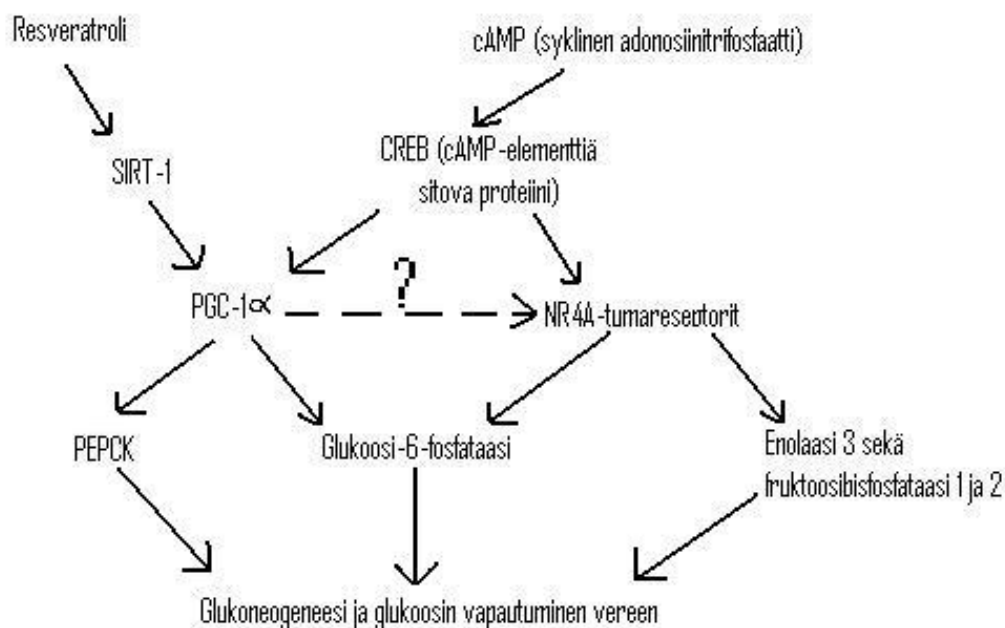
5 Pohdinta

Tulokseni osoittavat, että glukoneogeneesiä lisäävien NR4A-ryhmän tumareseptoreiden määrä on yleisesti ottaen suurempi energiarajoitetuissa (kevyissä) hiirissä kuin ad libitum rasvaista ravintoa syöneissä (lihavissa) hiirissä. Tyypin kaksi diabetekseen liittyy lisääntynyt glukoneogeneesi, jonka yhtenä komponenttina toimii cAMP:in välittämä reitti, johon myös NR4A-tumareseptorit liittyvät. Myös NR4A-ryhmän tumareseptoreiden määrän on näytetty olleen suurentunut diabeettisten hiirten maksoissa. (5)

Tyypin kaksi diabetes (DM2) korreloi vahvasti ylipainon kanssa, mutta täytyy muistaa että ylipaino ja DM2 eivät ole yksi ja sama asia. Jotta DM2 kehittyisi, siihen menee yleensä paljon aikaa ylipainoisilta eläimiltä. Tässä kokeessa olleet eläimet tapettiin kahdentoista viikon ikäisinä, eli varsin nuorina. Mitään diabetestestejä ei tehty, mutta epätodennäköistä olisi, että tyypin kaksi diabetes olisi kehittynyt näin nuorille hiirille.

Mikäli myös ryhmän 1 lihavat hiiret eivät ole olleet diabeettisia, löytyy tuloksiini järkevä selitys. Krooninen energiarajoitus lisää maksan glukoneogeneesiä nuorissa hiirissä (17), mikä on loogista koko kehon energiatasapainon kannalta: Kun ruoasta saatuja energiaa tuottavia ravintoaineita on vähän, täytyy maksan lisätä glukoosintuotantoaan jottei syntyisi energianvajausta perifeerisissä kudoksissa.

Aiemmassa tutkimuksessa (17) PEPCK oli ainoa glukoneogeneettinen entsyymi, jonka aktiivisuus on merkittävästi suurempi energiarajoitetuissa nuorissa hiirissä kuin nuorissa kontrolleissa. Toisen tutkimuksen (18) mukaan sekä PEPCK:n että glukoosi-6-fosfaatin aktiivisuudet nousevat energiarajoituksessa. Glukoosi-6-fosfaatin aktiivisuuden ollessa tutkimuksessa (18) noussut, viittaa tämä myös samaan suuntaan kuin kyseinen tutkimus, sillä NR4A-tumareseptoreiden tiedetään lisäävän glukoosi-6-fosfaatin ekspressiota (11).



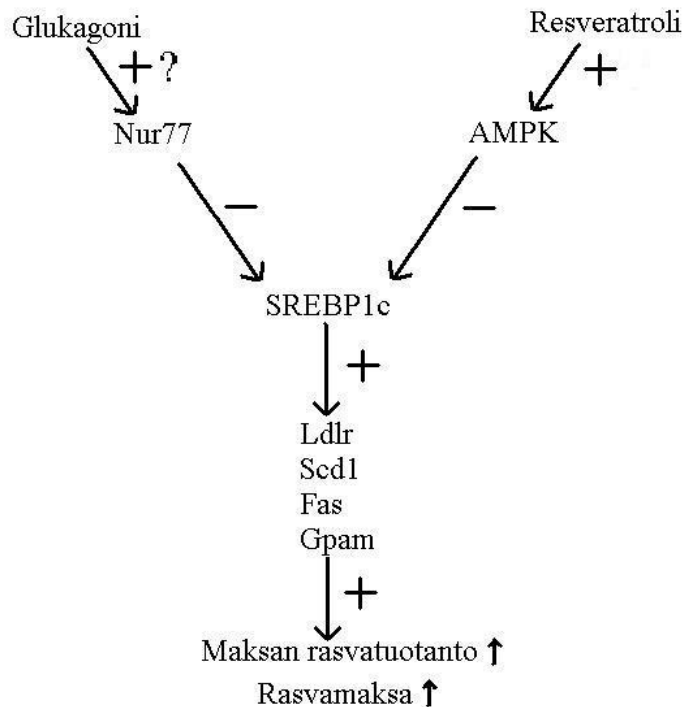
Resveratrolin tiedetään lisäävän SIRT-1-proteiinin aktiivisuutta (13). SIRT-1 taas aktivoi PGC-1 α -tumareseptorikoaktivaattoria (19). Täten resveratrolin osallistuu samaan glukoneogeneesiä aktivoivaan viestintäketjuun kuin NR4A-tumareseptorit, tosin ketjun eri haaraan. PGC-1 α - ja NR4A-haarojen välillä on löydetty yhteys muista solutyypeistä: PGC-1 α aktivoi Nurr1-reseptoria, ja tämän yhteyden on arveltu olevan olemassa myös maksassa (kysymysmerkki ylläolevassa kaavakuvassa) (11). Täten NR4A-reseptoreiden määrän nousu resveratrolin ansiosta voisi selittyä. Tosin tulokseni suurimmaksi osin vain näytti positiivisia trendejä resveratrolin aiheuttamien muutosten kannalta, paitsi NOR-1:n kohdalla, jossa tulos oli statistisesti merkittävä. Myös Nurr1-määrän kannalta tulokseni oli hieman erikoinen: miksi proteiinimäärä nousi enemmän pienemmällä resveratroliaannoksella? Tämä erikoinen tapaus vaatii lisäselvitystä, mutta yksi syy ilmiöön voisi olla koko kehon energiahomeostaasi, sillä resveratrolin tiedetään muun muassa olevan insuliiniherkistäjä (13) ja myös vähentävän

insuliinin eritystä haimasta (16). Tämä pieni ero voi myös olla sattumaa, eikä löydös ole tilastisesti merkittävä.

Lihavuus ja rasvainen ravinto lisää myös maksan rasvoittumisen riskiä. Rasvamaksa joka ei ole alkoholin aiheuttama johtaa maksakirroosiin 20%:ssa tapauksista. Nur77-reseptorin lisääntyneen aktiivisuuden on näytetty vähentävän maksan rasvoittumista vähentämällä SREBP1c-geenin ekspressiota hepatosyyteissä. SREBP-1c (Sterolin säätelijäelementtiä sitova proteiini 1) on transkriptiotekijä, joka lisää maksan rasva-aineenvaihdunnalle tärkeiden geenien ekspressiota. Näihin geeneihin kuuluvat Ldlr (LDL-reseptori), Scd1 (Stearoyyli-koentsyymi-A-desaturaasi-1), FAS (rasvahapposyntaasi) sekä Gpam (glyseroli-3-fosfaatti asyyli transferaasi). (20) Tämän perusteella on täysin loogista, että energiarajoitus (ryhmä 4) on lisännyt Nur77-reseptorin määrää, koska kehon ollessa energiavajaustilassa, maksan täytyy vapauttaa saamansa rasvat.

Resveratrolin tiedetään myös vähentävän maksan rasvoittumista. Tämän arvellaan tapahtuvan osittain SIRT-1-reitin kautta (SIRT-1 vähentää insuliiniresistenssiä) mutta sen arvellaan myös osittain tapahtuvan AMPK:n (adenosiinimonofosfaatti-riippuvainen kinaasi) kautta. (21) Koska AMPK on adenosiinimonofosfaattiriippuvainen, se aktivoituu solun ollessa katabolisessa tilassa, ja täten AMPK:n voi olettaa olevan aktivoitunut energiarajoituksessa. AMPK liittyy Nur77:n lailla maksan rasva-aineenvaihduntaan siten, että aktivoitunut AMPK vähentää SREBP-1c:n ekspressiota. Muun muassa glukagonin tiedetään aktivoivan viestintäreitin, jonka yhtenä välitekijänä on Nur77. Glukagonin ja Nur77:n välissä on kyseisessä reitissä myös välitekijöitä, muun muassa cAMP. (20) Nur77:llä, tai muilla NR4A-ryhmän tumareseptoreilla, ei ole huomattu yhteyttä AMPK:iin. Resveratrolin kuitenkin vaikuttaen SREBP1c:tä jarruttavasti AMPK:n kautta, voi resveratrolilla todeta olevan suotuisa vaikutus maksan rasvoittumiselle saman transkriptiotekijän kautta kuin Nur77, vaikka resveratrolia ei merkittävässä määrin vaikuttanut Nur77-proteiinin määrään minun tutkimissani maksoissa. Resveratrolilla ei ollut merkitystä hiirten

paino- ja rasvaprosenttikehitykselle mittausten mukaan, joten se ei ainakaan selitä metabolisia vaikutuksia.



Mielenkiintoisena havaintona tutkimuksessa (21) on ollut resveratrolin epäsuotuisa vaikutus veren lipidiprofiiliin: HDL laskee ja LDL nousee. LDL:n nousu helposti selittyy siten, että LDL-partikkeleita ei poisteta verestä yhtä tehokkaasti, kun resveratrolin aiheuttaman SREBP-1c:n jarruttamisen takia LDL-reseptoreiden ekspressio on vähentynyt hepatosyyteissä. Samoin HDL:n lasku voi selittyä siten, että SREBP-1c:n aiheuttama maksan rasvasynteesi, ja siten HDL:n poistuminen vereen on hidastunut. Veren lipidiprofiilin muuttuminen epäsuotuisammaksi resveratrolin ansiosta ei kuitenkaan tarkoita resveratrolin olevan riskitekijä ateroskleroosin syntymiselle, vaan päinvastoin: resveratrol vähentää tulehdusgeenien ilmentymistä ja vähentää täten ateroskleroosiin liittyvää tulehdusta valtimonseinämän tunica intimassa (22). Toisen tutkimuksen (15) mukaan resveratrol taas HMG-CoA reduktaasin ekspressiota vähentämällä antaa korkeamman Apo A1-arvon (HDL:n sisältämä proteiini) ja alemman Apo B-

arvon (LDL:n sisältämä proteiini) kuin korkearasvaista ravintoa syöneellä kontrolliryhmällä.

6 Johtopäätökset

Tutkimukseni mukaan resveratrolin vaikutus maksan NR4A-reittiin ei selitä resveratrolin Diabetes tyyppi kahdelta suojaavaa vaikutusta. Sen sijaan resveratrolin on maksan NR4A-metabolian kannalta potentiaalinen aine suojaamaan maksaa rasvoittumiselta.

7 Lähteet

- (1) NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? Thijs W.H. Pols, Peter I. Bonta, Carlie J.M. de Vries. *Current Opinion in Lipidology*, 18:515–520 (2007).
- (2) The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. José Martínez-González, Lina Badimon. *Cardiovascular Research* 65: 609– 618 (2005).
- (3) NR4A Nuclear Receptors in Atherosclerosis and Vein-Graft Disease. Peter I. Bonta, Thijs W.H. Pols, Carlie J.M. de Vries. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:105–111.
- (4) Regulation of Macrophage Inflammatory Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor Nur77. Liming Pei, Antonio Castrillo, Peter Tontonoz. *Molecular Endocrinology* 20(4):786–794, 2006.

(5) NR4A Orphan Nuclear Receptors Modulate Insulin Action and the Glucose Transport System. Yuchang Fu, Liehong Luo, Nanlan Luo, Xiaolin Zhu, W. Timothy Garvey. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 282, NO. 43, pp. 31525–31533 (2007).

(6) Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1 and Nor1. Lily C. Chao, Steven J. Bensinger, Claudio J. Villanueva, Kevin Wroblewski, Peter Tontonoz. Molecular Endocrinology. October 22, 2008 doi:10.1210/me.2008-0161.

(7) Nur77 Regulates Lipolysis in Skeletal Muscle Cells. Megan A. Maxwell, Mark E. Cleasby, Angus Harding, Annika Stark, Gregory J. Cooney, George E. O. Muscat. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 13, Issue of April 1, pp. 12573–12584, 2005.

(8) Nur77 Coordinately Regulates Expression of Genes Linked to Glucose Metabolism in Skeletal Muscle. Lily C. Chao, Zidong Zhang, Liming Pei, Tsugumichi Saito, Peter Tontonoz, Paul F. Pilch. Molecular Endocrinology 21(9):2152–2163, 2007.

(9) The Orphan Nuclear Receptor, NOR-1, Is a Target of β -Adrenergic Signaling in Skeletal Muscle. Michael A. Pearen, James G. Ryall, Megan A. Maxwell, Naganari Ohkura, Gordon S. Lynch, George E. O. Muscat. Endocrinology 147(11):5217–5227, 2006.

(10) NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. Liming Pei, Hironori Waki, Bhavapriya Vaitheesvaran, Damien C Wilpitz, Irwin J Kurland, Peter Tontonoz. Nature Medicine, doi:10.1038/nm1471 (2006).

(11) Discovering orphans' sweet secret: NR4A receptors and hepatic glucose production. Mauricio Berriel Diaz, Ulrike Lemke, Stephan Herzig. *Cell metabolism* DOI 10.1016/j.cmet.2006.10.005 (2006).

(12) Regulation of mouse hepatic genes in response to diet induced obesity, insulin resistance and fasting induced weight reduction. Michael Raab, John Bullen, Joanne Kelleher, Christos Mantzoros Gregory Stephanopoulos. *Nutrition & Metabolism* 2005, 2:15 doi:10.1186/1743-7075-2-15 (2005).

(13) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Joseph A. Baur, David A. Sinclair. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY* doi:10.1038/nrd2060 (2006).

(14) Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. Tzong-Cherng Chi, Win-Pin Chen, Tsung-Li Chi, Tzong-Fu Kuo, Shoei-Sheng Lee, Juei-Tang Cheng, Ming-Jai Su. *Life Sciences* 80 (2007) 1713–1720.

(15) Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. Il Jin Cho, Ji Yun Ahn, Suna Kim, Myung Sook Choi, Tae Youl Ha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367 (2008) 190-194.

(16) The insulin-suppressive effect of resveratrol — An in vitro and in vivo phenomenon. Tomasz Szkudelski. Elsevier Inc. 2007 doi: 10.1016/j.lfs.2007.12.008

(17) Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. Kevork Hagopian, Jon J. Ramsey, Richard Weindruch. *Experimental Gerontology* 38 (2003) 267–278.

(18) Lifespan Extension by Caloric Restriction: An Aspect of Energy Metabolism. HARUYOSHI YAMAZA, TAKUYA CHIBA, YOSHIKAZU HIGAMI, ISAO SHIMOKAWA. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 59:325–330 (2002).

(19) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. Joseph T. Rodgers, Carlos Lerin, Wilhelm Haas, Steven P. Gygi, Bruce M. Spiegelman, Pere Puigserver. NATURE |VOL 434 | 3 MARCH (2005).

(20) Nur77 modulates hepatic lipid metabolism through suppression of SREBP1c activity. Thijs W.H. Pols, Roelof Ottenhoff, Mariska Vos, Johannes H.M. Levels, Paul H.A. Quax, Joost C.M. Meijers, Hans Pannekoek, Albert K. Groen, Carlie J.M. de Vries. Biochemical and Biophysical Research Communications 366 (2008) 910–916.

(21) Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. Jing SHANG, Lu-lu CHEN, Fang-xi XIAO, Hui SUN, Hong-cheng DING, Hu XIAO. Acta Pharmacol Sin 2008 Jun; 29 (6): 698–706.

(22) Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. Dipak K. Das, Nilanjana Maulik. Molecular Interventions 2006 Feb;6(1):36-47.