

# ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

# ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διερεύνηση της σχέσης δομής-λειτουργίας ανθρώπινων απολιποπρωτεϊνών με τη χρήση βιοφυσικών τεχνικών: ΑποΕ και δυσλιπιδαιμίες.

> ΔΗΜΗΤΡΑ ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ

> > AOHNA

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2013

### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διερεύνηση της σχέσης δομής-λειτουργίας ανθρώπινων απολιποπρωτεϊνών με τη χρήση βιοφυσικών τεχνικών: ΑποΕ και δυσλιπιδαιμίες.

# ΔΗΜΗΤΡΑ ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ

**A.M.:** 62718

## ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

# ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Ευστράτιος Στρατίκος, Ερευνητής Β', Ι.Ρ.Ρ.Π., Ε.ΚΕ.Φ.Ε. Δημόκριτος

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Ευστράτιος Στρατίκος, Ερευνητής Β', Ι.Ρ.Ρ.Π., Ε.ΚΕ.Φ.Ε. Δημόκριτος Κωνσταντίνος Δημόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Κωνσταντίνος Βοργιάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ Αθανασία Σιαφάκα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Β', Ι.Β., Ε.ΚΕ.Φ.Ε. Δημόκριτος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 23/04/2013

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε (αποΕ) είναι βασικό συστατικό του συστήματος μεταφοράς λιπιδίων μέσω λιποπρωτεϊνών. Φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο της αποΕ έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση δυσλιπιδαιμιών. Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί πως κάποιες τεχνητά μεταλλαγμένες μορφές της αποΕ δρουν θεραπευτικά έναντι δυσλιπιδαιμιών σε πειραματικά μοντέλα ζώων.

Η αποΕ χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή θερμοδυναμική σταθερότητα και σημαντική δομική πλαστικότητα, χαρακτηριστικά απαραίτητα για τη λειτουργία της. Η ιδιαιτερότητα των δομικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αποΕ καθιστά δύσκολη την κατανόηση της πολύπλοκης σχέσης δομής- λειτουργίας της και κατά συνέπεια του ρόλου της στις ανθρώπινες ασθένειες. Στην παρούσα διατριβή υποθέσαμε πως η συσχέτιση σπάνιων κληρονομούμενων μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ με την εμφάνιση δυσλιπιδαιμιών ή θεραπευτικής δράσης έναντι αυτών βασίζεται σε αλλαγές στις δομικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες του μορίου.

Για να προσεγγίσουμε τη μοναδική σχέση δομής- λειτουργίας της αποΕ πραγματοποιήσαμε βιοφυσική μελέτη στο μόριο της αποΕ στην οποία εισάγαμε φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ (ΥΛΠ ΙΙΙ) ή λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (ΛΠΣ), καθώς και τεχνητές μεταλλάξεις που σχετίζονται με θεραπευτική δράση έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας. Η πειραματική προσέγγιση που πραγματοποιήσαμε περιλαμβάνει την εισαγωγή μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, την παραγωγή ανασυνδυασμένων μορφών της αποΕ από κατάλληλα κυτταρικά συστήματα, τον καθαρισμό τους και ακολούθως, τη λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, τη θερμική και χημική αποδιάταξη των μορίων, τη μελέτη της υδροφοβικότητας της αποΕ με χρήση φθορίζοντος ιχνηθέτη, τον υπολογισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου με δυναμική σκέδαση φωτός, τη μελέτη της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση, καθώς και το σχηματισμό και χαρακτηρισμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένα ή μη μόρια αποΕ.

Τα αποτελέσματα υπέδειξαν πως η εισαγωγή μεταλλάξεων- ακόμη και σημειακών-στο μόριο της αποΕ μπορεί να επάγει δραματικές αλλαγές στη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα του μορίου ανάλογα με τη θέση και φύση των μεταλλάξεων. Επίσης η ανάλυση υπέδειξε ότι όλες οι μελετηθείσες μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ επηρεάζουν τα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά του μορίου, υποδεικνύοντας σε μερικές περιπτώσεις πιθανούς μηχανισμούς παθογένεσης και επιβεβαιώνοντας τη διαγνωστική αξία αυτών των μεταλλάξεων. Τέλος, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τη σημασία της συσσωμάτωσης της αποΕ στην παθογένεση ανθρώπινων ασθενειών καθώς και την επίδραση του πολυμορφικού υποβάθρου των μεταλλάξεων στις θερμοδυναμικές και δομικές ιδιότητες της αποΕ.

### ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ: Βιοχημεία, Βιοφυσική

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:** απολιποπρωτεΐνη Ε, θερμοδυναμική σταθερότητα, δυσλιπιδαιμίες, αλλαγές διαμόρφωσης

#### ABSTRACT

Apolipoprotein E (apoE) is a major component of the lipoprotein transport system in humans. Naturally occurring mutations in apoE gene have been linked with the development of dyslipidemias. Furthermore, it has been shown that some artificially mutated forms of apoE can act theurapeutically against dyslipidemias in experimental animal models.

ApoE is characterized by relatively low thermodynamic stability and significant structural plasticity, both properties being necessary for its function. The unusual structural and thermodynamic properties of apoE have limited our understanding of the structure-function relationship in this molecule and consequently, its exact role in the pathogenesis of human disease. During the course of this work, we hypothesized that the association of rare inherited mutations in the molecule of apoE with the occurrence of dyslipidemias, or therapeutic action against them, is linked to changes in the structural and thermodynamic properties of the molecule. To address this, we analyzed naturally-occurring apoE variants that are associated with the development of type III hyperlipoproteinemia (HLP III) or lipoprotein glomerulopathy (LPG), as well as artificial mutations linked with therapeutic properties towards hypertriglyceridemia in mouse models. We used recombinant DNA technology approaches to generate the desired mutations and subsequently produced the recombinant forms of apoE in appropriate cellular expression systems. The recombinant protein variants were purified to homogeneity and their biophysical properties were analyzed using circular dichroism, thermal and chemical denaturation, a hydrophobic fluorigenic probe, dynamic light scattering and controlled proteolysis. We also studied the apoE variants' ability to form lipoprotein particles, as well as the particles' thermodynamic stability and their tendency to accumulate.

Our results, taken as a whole, suggest that the insertion of even point mutations in the molecule of apoE can cause dramatic changes to the thermodynamic stability and structural plasticity of the molecule depending on the location and the nature of the mutation. All of the studied mutations in the molecule of apoE affect, to at least some degree, apoE's structural and thermodynamic properties, and in some cases these changes point to potential mechanisms of pathogenesis for the disease. Finally, our data highlight the importance of the aggregation properties of apoE in the pathogenesis of LPG, as well as the role of the natural allelic background on the repercussions of the mutations to the thermodynamic and structural properties of apoE.

### **SUBJECT AREAS**: Biochemistry, Biophysics

**KEYWORDS**: apolipoprotein E, thermodynamic stability, dyslipidemias, conformational changes

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 [ΕΙΣΑΓΩΓΗ]	23
1.1 Σύσταση, κατηγοριοποίηση και χαρακτηριστικά	23
.1.2 Το μονοπάτι των χυλομικρών	24
1.3 Το μονοπάτι VLDL/ IDL/ LDL	25
1.4 Το μονοπάτι των HDL	26
1.4.1 Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 [Η απολιποπρωτεΐνη Ε]	28
2.1 Απολιποπρωτεΐνες	28
2.2 Κύριες λειτουργίες των απολιποπρωτεϊνών	28
2.3 Η απολιποπρωτεΐνη Ε (αποΕ)	29
2.3.1 Βιοσύνθεση της αποΕ	29
2.3.2 Ρύθμιση των επιπέδων της αποΕ	30
2.4 Λειτουργίες της αποΕ	31
2.4.1 Λειτουργικός ρόλος της αποΕ κατά την ανακύκλωσή της στα ηπατοκύτταρα	31
2.4.2 Λειτουργικός ρόλος της αποΕ κατά την ανακύκλωσή της στα μακροφάγα	33
2.4.3 Συμμετοχή της αποΕ στη συγκρότηση HDL σωματιδίων (HDL-E)	34
2.4.4 Αθηροπροστατευτικός ρόλος της αποΕ	35
2.5 Δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ	35
2.5.1 Δομή της αποΕ κατά την αλληλεπίδρασή της με λιπίδια	38
2.5.2 Κατάσταση «molten globule» και αποΕ	41
2.5.3 Διαφορές στη δομή των αποΕ2, Ε3 και Ε4	43
2.5.3.1 Διαφοροποίηση της δομής της αποΕ2 σε σχέση με την αποΕ3 και Ε4	44
2.5.3.2 Διαφοροποίηση της δομής της αποΕ4 σε σχέση με την αποΕ2 και Ε3	45
2.6 Διαφοροποίηση της ανθρώπινης αποΕ συγκριτικά με την αποΕ του ποντικού και άλλων ειδών	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 [Βιοφυσικές τεχνικές για τη μελέτη δυναμικών	48
3.1 Τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας των απολιποπρωτεϊνών	48

3.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού	49
3.2.1 Στοιχεία δευτεροταγούς δομής της αποΕ	51
3.2.2 Θερμική αποδιάταξη της αποΕ με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού	52
3.3 Φασματοσκοπία φθορισμού	55
3.3.1 Χημική αποδιάταξη της αποΕ	56
3.3.2 Ιχνηθέτηση των υδρόφοβων περιοχών πρωτεΐνης με εξωγενή φθορίζοντα μόρια	62
3.3.3 Πρόσδεση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS στην αποΕ	62
3.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	66
3.4.1 Μελέτη της υδροδυναμικής ακτίνας της αποΕ με δυναμική σκέδαση φωτός	68
3.5 Διαλυτοποίηση DMPC κυστιδίων από απολιποπρωτεΐνες	69
3.5.1 Μελέτη της αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από την αποΕ	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 [Συσχέτιση της αποΕ με παθολογικές καταστάσεις]	74
4.1 Ασθένειες που σχετίζονται με την αποΕ	74
4.1.1 Συσχέτιση της αποΕ με καρδιαγγειακά νοσήματα	74
4.1.2 Συσχέτιση της αποΕ με την υπερτριγλυκεριδαιμία	75
4.1.3 Συσχέτιση της αποΕ με την υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ (ΥΛΠ ΙΙΙ)	76
4.2 Συσχέτιση της αποΕ με νευροπαθολογικές καταστάσεις	78
4.2.1 Συσχέτιση της αποΕ με τη νόσο του Alzheimer	79
4.3 Συσχέτιση της αποΕ με τη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (ΛΠΣ)	80
4.3.1 Προσπάθειες προσέγγισης του μηχανισμού παθογένεσης της ΛΠΣ	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 [ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ]	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 [ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ]	87
6.1 Μετασχηματισμός	87
6.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος και επίστρωση τρυβλίων	87
6.1.1.1 Επίστρωση τρυβλίων LB-αγαρ για διαλογή χρώματος (Έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης μεταλλαξιγένεσης)	88
6.1.2 Παραγωγή δεκτικών για μετασχηματισμό κυττάρων E.coli	88
6.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	89

6.1.3.1 Μετασχηματισμός των υπερ-επιδεκτικών XL10-Gold κυττάρων με πλασμιδιακό DNA που έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση	. 90
6.2 Μεταλλαξιγένεση	. 91
6.2.1 Αρχή της τυποποιημένης μεθόδου μεταλλαξιγένεσης «QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis Kit (Agilent)»	
6.2.2 Σχεδιασμός Εκκινητών (Primers) για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία πλασμιδιακού DNA	
6.2.3 Εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit»	93
6.3 Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	94
6.3.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης	94
6.3.2 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση και προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	
6.3.3 Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση	96
6.4 Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με την τυποποιημένη δοκιμασία «QIAprep Spin Miniprep Kit» της QIAGEN	. 96
6.4.1 Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA που έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση	
6.5 Ποσοτικοποίηση συστατικών διαλύματος	98
6.5.1 Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο διπλή δέσμης	IS 98
6.5.2 Μέτρηση απορρόφησης διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nano-Drop	. 99
6.5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Lowry	. 100
6.5.4 Χρήση τυποποιημένης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό χοληστερόλης	. 100
6.5.5 Χρήση τυποποιημένης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό φωσφολιπιδίων	102
6.5.6 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett	102
6.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	104
6.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	104
6.6.1.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου	. 104
6.6.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή	. 105
6.6.1.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση	. 106
6.6.2 Ηλεκτροφόρηση πηκτής διαβαθμισμένης πυκνότητας	106

6.6.2.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας	106
6.6.2.2 Προετοιμασία και διαχωρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση	108
6.6.3 Χρώση της πηκτής προς εμφάνιση των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί	108
6.6.3.1 Χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Blue	108
6.6.3.2 Χρώση των λιπιδικών συστατικών των δειγμάτων με τη χρωστική Sudan Black B	109
6.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση (ανοσοαποτύπωση Western)	109
6.8 Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης 3C- His πρωτεάσης	111
6.8.1 Έκφραση της 3C- Ηίs πρωτεάσης	111
6.8.2 Απομόνωση και καθαρισμός της 3C- His πρωτεάσης	112
6.9 Έκφραση απολιποπρωτεϊνών Ε3 σε σύστημα E.coli και καθαρισμός	114
6.9.1 Έκφραση της χιμαιρικής Trx-αποΕ3	114
6.9.2 Απομόνωση και καθαρισμός της χιμαιρικής Trx-αποE3 (52kDa) με στήλη συγγενείας Ni-NTA	115
6.9.3 Αντίδραση αποκοπής της ετικέτας «θειορεδοξίνη- 6 ιστιδίνες» από τη χιμαιρική Trx-αποE3 με 3C-His πρωτεάση	117
6.9.4 Απομόνωση της καθαρής 34kDa- απολιποπρωτεΐνης από τα προϊόντα της αντίδρασης	119
6.10 Έκφραση απολιποπρωτεϊνών σε σύστημα κυττάρων ΗΤΒ-13 και καθαρισμός	120
6.10.1 Ανάπτυξη και διατήρηση καλλιέργειας κυττάρων ΗΤΒ-13 σε φιάλες επίπεδης επιφάνειας	120
6.10.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων ΗΤΒ-13	120
6.10.3 Μεταφορά και ανάπτυξη ΗΤΒ-13 κυττάρων σε κυλινδρικά δοχεία (Roller bottles)	121
6.10.4 Επιμόλυνση ΗΤΒ-13 κυττάρων με τη χρήση αδενοϊών και συγκομιδή του μέσου με την εκφρασμένη πρωτεΐνη	122
6.10.5 Απομόνωση και καθαρισμός απολιποπρωτεϊνών με το πρωτόκολλο σχηματισμού πρωτεολιποσωμάτων/ υπερφυγοκέντρησης-είπλευσης/απολιπιδίωσης	123
6.10.5.1 Διαπίδυση του μέσου έναντι 25mM ΝΗ₄ΗCO₃ και λυοφιλίωση του διαλύματος της ακαθάριστης πρωτεΐνης μέχρι ξηρού	124
6.10.5.2 Σχηματισμός πρωτεολιποσωμάτων	124
6.10.5.3 Δημιουργία βαθμίδωσης πυκνότητας και υπερφυγοκέντρηση	125

6.10.5.4 Διαχωρισμός κλασμάτων και ανάλυση δείγματος από κάθε κλάσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες	126
6.10.5.5 Απολιπιδίωση των κλασμάτων που περιλαμβάνουν καθαρή απολιποπρωτεΐνη	126
6.11 Καθαρισμός απολιποπρωτεϊνών με τη χρήση	129
6.11.1 Παρασκευή πληρωτικού υλικού στήλης εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης	129
6.11.2 Προετοιμασία δείγματος πριν τη φόρτωση στη στήλη	129
6.11.3 Εξισορρόπηση της στήλης και καθαρισμός αποΕ	130
6.12 Αντίδραση απογλυκοζυλίωσης της αποΕ με τη χρήση του ενζύμου νευραμινιδάση…	130
6.13 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) με αποΕ3	13 <sup>-</sup>
6.14 Πέψη της «ελεύθερης λιπιδίων» ή «εντός λιποπρωτεϊνών» αποΕ με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστάση	132
6.15 Προετοιμασία δειγμάτων για βιοφυσική μελέτη	133
6.16 Πειράματα φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού	13
6.16.1 Λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού και επεξεργασία	134
6.16.2 Θερμική αποδιάταξη της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ, επεξεργασία και εξαγωγή αποτελεσμάτων	134
6.16.2.1 Πειράματα μελέτης της αντιστρεπτότητας της θερμικής αποδιάταξης της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ	136
6.16.3 Θερμική αποδιάταξη λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν	136
6.17 Πειράματα φθορισμομετρίας	13
6.17.1 Χημική αποδιάταξη	13
6.17.2 Πρόσδεση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS	13
6.18 Πείραμα διαύγασης αιωρήματος DMPC από αποΕ	139
6.18.1 Παρασκευή αιωρήματος DMPC	139
6.18.2 Κινητική διαύγασης αιωρήματος DMPC από αποΕ	14(
6.19 Πειράματα Δυναμικής Σκέδασης φωτός (DLS)	14 <sup>-</sup>
6.20 Λήψη εικόνων των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιλαμβάνουν αποΕ με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας	14
6.21 Πείραμα συσσωμάτωσης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» έπειτα από επώαση με τη φωσφολιπάση Α2	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 [ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ]	14:

7.1 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΥΛΠΙΙΙ σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου	143
7.1.1 Έκφραση και καθαρισμός της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων Ε3 R145C, Ε3 K146E και Ε3 R136S σε σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων, HTB-13	144
7.1.2 Μελέτη της ελικότητας των E3R145, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού	147
7.1.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των E3R145C, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου	148
7.1.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των E3R145C, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου	150
7.1.5 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των E3R145C, E3K1463, E3R136S και της αποE3 αγρίου τύπου στο διαλύτη	153
7.1.6 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις E3R145C, E3K146E, E3R136S και την αποE3 αγρίου τύπου	154
7.1.7 Μελέτη της υδροδυναμικής διαμέτρου των αποΕ3 R145C, K146E και R136S συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	155
7.2 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΛΠΣ σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου	156
7.2.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων E3R145P, R147P και R158P σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων	157
7.2.2 Μελέτη της ελικότητας των E3R145P, E3R147P και E3R158P σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού	160
7.2.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων της αποΕ3 που σχετίζονται με ΛΠΣ σε αντιπαραβολή με την αποΕ αγρίου τύπου	162
7.2.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των E3R145P, E3R147P και E3R158P σε αντιπαραβολή με την αποE3 αγρίου τύπου	164
7.2.5 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των E3R145P, E3R147P, E3R158P και της αποE3 αγρίου τύπου στο διαλύτη	165
7.2.6 Μελέτη της κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των E3R145P, E3R147P, E3R158P και της αποE3 αγρίου τύπου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	166
7.2.7 Μελέτη της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση των E3R145P, E3R147P, E3R158P σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου	168
7.2.8 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις E3R145P, E3R147P, E3R158P και την αποE3 αγρίου τύπου	170

7.2.9 Παρασκευή ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν αποΕ3 αγρίου τύπου ή καθεμία από τις μεταλλάξεις της (E3R145P,
E3R147Ρ και E3R158Ρ)
7.2.9.1 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας των αποΕ ως συστατικών λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων
7.2.9.2 Μελέτη της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση των E3R145P, E3R147P, E3R158P εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου
7.2.9.3 Μελέτη της κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P σε αντιπαραβολή με τα σωματίδια rHDL- E3wt, με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός
7.2.9.4 Μελέτη της μορφολογίας και του μεγέθους των rHDL-E3R145P, rHDL- E3R147P και rHDL-E3R158P σε αντιπαραβολή με τα σωματίδια rHDL-E3wt, με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας
7.2.9.5 Μελέτη της συσσωμάτωσης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιέχουν μεταλλαγμένη ή μη αποΕ3 έπειτα από επώαση με φωσφολιπάση A2 σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου
3 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας των μεταλλάξεων που σχετίζονται με ραπευτική δράση έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας σε αποΑ-Ι⁻՛⁻ και αποΕ⁻՛⁻ ποντίκια
7.3.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός των αποE4mutC, αποE2mutC και των αποE4 και αποE2 αγρίου τύπου σε σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων, HTB-13
7.3.2 Μελέτη της επίδρασης της τριπλής μετάλλαξης [Leu261Ala/Trp264Ala/Phe265Ala] στη δευτεροταγή δομή των αποΕ2 και αποΕ4
7.3.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των αποΕ2mutC και αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου
7.3.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποE2mutC και αποE4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποE2 και αποE4 αγρίου τύπου
7.3.5 Ιχνηθέτηση των υδρόφοβων επιφανειών των μεταλλαγμένων και μη αποΕ2 και αποΕ4 με ANS
7.3.6 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις αποE2mutC και αποE4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποE2 και αποE4 αγρίου τύπου αντίστοιχα
ΕΦΑΛΑΙΟ 8 [ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ]
Ι Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομής- τουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με τη νόσο ΥΛΠΙΙΙ νκοιτικά με την αποΕ3 ανοίου τύπου

8.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομής-	
λειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με τη νόσο ΛΠΣ συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου	192
8.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ που σχετίζονται με θεραπευτική δράση έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας συγκριτικά με την αντίστοιχη αποΕ αγρίου τύπου	194
8.4 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλάξεων της αποΕ που σχετίζονται με δυσλιπιδαιμίες και εξαγωγή συμπερασμάτων	195
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	197
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΑ	198
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	200

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Γραφική παράσταση της απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων χοληστερόλης σε συνάρτηση με τη μάζα της περιεχόμενης χοληστερόλης	101
Σχήμα 2. Η συσκευή βαθμίδωσης Hoefer SG 100 gradient maker	107
Σχήμα 3. Ανάλυση δειγμάτων από το διάλυμα ενζυμικών αντιδράσεων πέψης της χιμαιρικής Trx-αποE3 wt από τη 3C-πρωτεάση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	118
Σχήμα 4. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος από τα κλάσματα 1-11 (πηκτή Α) και 12-19 (πηκτή Β) που διαχωρίστηκαν έπειτα από την υπερφυγοκέντρηση του διαλύματος διαβαθμισμένης πυκνότητας	145
Σχήμα 5. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των αποΕ3, μεταλλαγμένων και μη	146
Σχήμα 6. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των απογλυκοζυλιωμένων και μη αποΕ3, που εκφράστηκαν σε σύστημα ΗΤΒ-13 κυττάρων	146
Σχήμα 7. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της, Ε3 R145C, Ε3 K146E και Ε3 R136S. Ένθετο: Ραβδόγραμμα της % ελικότητας κάθε μορφής της αποΕ3, μεταλλαγμένης και μη	147
Σχήμα 8. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης κάθε μετάλλαξης (αποΕ3 R145C, K146E, R136S) σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου	149
Σχήμα 9. Μελέτη της αντιστρεπτότητας της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου	151

Σχήμα 10. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων E3 R145C, E3 K146E και E3 R136S σε αντιπαραβολή με την αποE3 αγρίου τύπου	152
Σχήμα 11. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία αποΕ3 αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της	153
Σχήμα 12. Γραφική παράσταση της κινητικής διαύγασης αιωρήματος DMPC κυστιδίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με την αποΕ3 αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της	154
Σχήμα 13. Διασπορά πληθυσμών της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της συναρτήσει της υδροδυναμικής διαμέτρου των μορίων της πρωτεΐνης	155
2χημα 14. Αναλυση του πλασμιοιακου DNA «pE132a-E3wt-3C» και των «pE132a- E3R145P-3C», «pET32a-E3R147P-3C» και «pET32a-E3R158P-3C» σε πηκτή αγαρόζης 0,1%w/v	158
Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση της αμινοξικής αλληλουχίας των αποΕ πριν και μετά τα τρία στάδια καθαρισμού τους	159
Σχήμα 16. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου από διαφορετικά στάδια απομόνωσης και καθαρισμού της	160
Σχήμα 17. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου και των σημειακών μεταλλάξεων E3R145P, E3R147P και E3R158P μετά τον καθαρισμό τους	160
Σχήμα 18. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού μεταλλάξεων της αποΕ που σχετίζονται με ΛΠΣ και της αποΕ3 αγρίου τύπου	161
Σχήμα 19. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την απώλεια ελικότητας που προκαλεί στην αποΕ3 αγρίου τύπου η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P KAI R158P	162
Σχήμα 20. Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων αποΕ3 έναντι της αποΕ3 αγρίου τύπου	163
Σχήμα 21. Φαινόμενη μεταβολή της ενθαλπίας που παρουσίασε η αποΕ3 αγρίου τύπου και οι μεταλλάξεις της κατά την θερμική τους αποδιάταξη	164
Σχήμα 22. Προφίλ χημικής αποδιάταξης καθεμίας από τις μεταλλάξεις E3R145P, E3R147P και E3R158P σε αντιπαραβολή με το προφίλ αποδιάταξης της αποE3 αγρίου τύπου	164
Σχήμα 23. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων E3R145P, E3R147P και E3R158P	165

Σχήμα 24. Α. Λόγος του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS παρουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS απουσία πρωτεΐνης Β. Μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού του ANS προσδεδεμένου στις μεταλλαγμένες αποΕ3 και την αποΕ3 αγρίου τύπου σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift)	166
Σχήμα 25. Κανονικοποιημένη κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της κατ' όγκο δείγματος, έπειτα από επώαση 4 ή 24h στους 37°C, ή απουσία επώασης	167
Σχήμα 26. Μεταβολή της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της, έπειτα από επώαση 4 ή 24h στους 37°C, ή απουσία επώασης Σχήμα 27. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12% w/v) των δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της έπειτα από επώασή τους απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ελαστάσης, θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης για 1h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	168 169
Σχήμα 28. Α. Κινητική αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από την αποΕ3 αγρίου τύπου και τις μεταλλάξεις της. Β. Ραβδόγραμμα των σταθερών ταχύτητας της βραδείας φάσης της κινητικής αναμόρφωσης	171
Σχήμα 29. Α. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιέχουν αποΕ3 αγρίου τύπου ή μεταλλάξεις της. Β. Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό ελικότητας στα 222nm που περιλαμβάνουν οι μεταλλαγμένες και μη αποΕ3 εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων	172
Σχήμα 30. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων και μη αποΕ3 που αποτελούν τα πρωτεϊνικά συστατικά ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL»	173
Σχήμα 31. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των θραυσμάτων της αποΕ που προκύπτουν έπειτα από πρωτεόλυση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL-E» από τη θρυψίνη	173
Σχήμα 32. Κανονικοποιημένη διασπορά της υδροδυναμικής διαμέτρου των rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P κατ' όγκο δείγματος	174
Σχήμα 33. Χαρακτηριστικά μικρογραφήματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που παρουσιάζουν τα δισκοειδή σωματίδια rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P	175
Σχήμα 34. Κατανομή του μεγέθους των δισκοειδών rHDL σωματιδίων που περιείχαν αποΕ3 αγρίου τύπου ή μεταλλάξεις τους, όπως προοέκυψε από ανάλυσή τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία	176

Σχήμα 35. Κανονικοποιημένη κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιλαμβάνουν την αποΕ3 αγρίου τύπου ή τις μεταλλάξεις της έπειτα από επώασή τους στους 37°C για 24h παρουσία 100ng/mL φωσφολιπάση A <sub>2</sub>	78
Σχήμα 36. Α. Ανάλυση των αποΕ2mutC, αποΕ4mutC, αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Β. Ανοσοαποτύπωση των ζωνών των παρπάνω πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	80
Σχήμα 37. Η ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες- με συγκέντρωση SDS μικρότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση μυκιλλίων- δεν επηρέασε τη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των αποΕ	81
Σχήμα 38. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των μεταλλαγμένων και μη μορφών της αποΕ έπειτα από επώασή τους στους 37°C για 4h, απουσία (-) ή παρουσία (+) της νευραμινιδάσης	82
Σχήμα 39. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ4 αγρίου τύπου (Β)	83
Σχήμα 40. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με αυτό της αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC συγκριτικά με αυτό της αποΕ4 αγρίου τύπου (Β)	84
Σχήμα 41. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC απογλυκοζυλιωμένης και μη	86
Σχήμα 42. Προφίλ χημικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ4 αγρίου τύπου (Β)	86
Σχήμα 43. Φάσματα εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη ANS απουσία αποΕ και παρουσία των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου μορφών της	87
Σχήμα 44. Κινητική αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC απουσία αποΕ, παρουσία αποΕ2mutC και αποΕ2 αγρίου τύπου, καθώς και παρουσία αποΕ4mutC και αποΕ4	88

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μοντέλο λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σε σχήμα σφαίρας	23
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των	24
χυλομικρών	21

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των VLDL	25
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των HDL.	26
Εικόνα 5. Μοντέλο μετα- γευματικής ανακύκλωσης της αποΕ3 ισομορφής στο ήπαρ	32
Εικόνα 6. Διαγραμματική αναπαράσταση της συμμετοχής της αποΕ στο μονοπάτι χυλομικρών, στη βιογένεση HDL-Ε σωματιδίων και τη βιογένεση HDL-αποΑ-Ι σωματιδίων	34
Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των πολυμορφισμών της αποΕ	36
Εικόνα 8. Μοντέλο της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ	36
Εικόνα 9. Αναπαράσταση της δομής της μονομερούς μεταλλαγμένης ελεύθερης λιπιδίων αποΕ3 (pdb 2L7B)	38
Εικόνα 10. Μοντέλο φουρκέτας της απολιποπρωτεΐνης Ε προσδεδεμένης σε DPPC	39
Εικόνα 11. Μοντέλο αποΕ-DPPC σωματιδίων έπειτα από ανάλυση με ακτίνες Χ	4(
Εικόνα 12. Μοντέλο της διαδικασίας σχηματισμού φουρκέτας της αποΕ σε σωματίδια αποΕ-DPPC	41
Εικόνα 13. Πιθανές διαμορφώσεις από τις οποίες περιέρχονται οι ισομορφές της αποΕ κατά τη φυσιολογική λειτουργία τους	43
Εικόνα 14. Επίδραση του αμινοξέος στη θέση 158 στην ικανότητα πρόσδεσης της αποΕ στον LDL-υποδοχέα	44
Εικόνα 15. Κατανομή επισημασμένων με <sup>125</sup> Ι αποΕ2, Ε3 και Ε4 στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ανθρώπου	45
Εικόνα 16. Σύγκριση της δομής των θραυσμάτων 22-kDa της αποΕ3 και αποΕ4	46
Εικόνα 17. Μοντέλο της δομής της αποΕ3 και της αποΕ4	46
Εικόνα 18. Κατανομή της ανθρώπινης αποΕ3 και Ε4 σε διαφορετικής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικά σωματίδια σε πλάσμα ανθρώπου (Α) και κατανομή της αποΕ (Thr61) μυός και της μεταλλαγμένης αποΕ «Arg61» μυός σε πλάσμα ανθρώπου (Β)	47
Εικόνα 19. Διάγραμμα του πεπτιδικού δεσμού που δείχνει τον προσανατολισμό των διπόλων μετάπτωσης για τις μεταπτώσεις n→π* και π→π*	49
Εικόνα 20. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού πολυ-L-λυσίνης	50
Εικόνα 21. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αποΕ3 (από πλάσμα ανθρώπου) σε διαφορετικές θερμοκρασίες	52

Εικόνα 22. Θερμική αποδιάταξη της αποΕ2, αποΕ3, αποΕ4 (Α), των αμινο-τελικών περιοχών τους (Β) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ (Γ)	53
Εικόνα 23. Καταγραφή της πορείας αποδιάταξης από 15 μέχρι 80°C και επαναδιάταξης από τους 80 στους 15°C της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ	54
Εικόνα 24. Καμπύλες χημικής αποδιάταξης της αποΕ2 (Α), αποΕ3 (Β) και αποΕ4 (C) έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο τριών καταστάσεων	59
Εικόνα 25. Χημική αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής, της καρβοξυ-τελικής περιοχής, της συνολικής δομής της αποΕ4 και των θραυσμάτων της, που υπολείπονται της περιοχής 273-299 και 261-299	60
Εικόνα 26. Φάσματα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης και παρουσία: της αποE4 (a), της αποE4 Glu255Ala (b), της αποE3 (c και i), της αμινο-τελικής περιοχής της αποE4 (d), της αμινο-τελικής περιοχής της αποE3 (e), της αποE3 Pro267Ala (g) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποE (h)	63
Εικόνα 27. Φάσματα φθορισμού του ANS έπειτα από την πρόσδεσή του: στην αποΕ4 (a), στα θραύσματα της αποΕ4 όπου έχει απαλοιφθεί η περιοχή 273-299 (b) και 261-299 (c) και στην αμινο-τελική περιοχή της αποΕ4 (d)	65
Εικόνα 28. Φάσματα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης, καθώς και έπειτα από την πρόσδεσή του στην αποΕ4 και τα καρβοξυ-τελικά θραύσματά της, όπου υπολείπονται οι περιοχές: 260-299, 230-299, 203-299, 186-299, 166-299	66
Εικόνα 29. Η συσχέτιση των σημάτων που λαμβάνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μειώνεται με την πάροδο του χρόνου	67
Εικόνα 30. Οι καμπύλες συσχέτισης για τα μικρά σωματίδια προσεγγίζουν το μηδέν συντομότερα από τα μεγάλα σωματίδια	67
Εικόνα 31. Τυπικό γράφημα διασποράς μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται σε διάλυμα	68
Εικόνα 32. Σχηματική περιγραφή της διαλυτοποίησης αιωρήματος κυστιδίων DMPC από την αποΕ	69
Εικόνα 33. Μοριακό μοντέλο που εξηγεί τις δύο ταυτόχρονες κινητικές φάσεις (αργή και γρήγορη) της διαλυτοποίησης DMPC από τις απολιποπρωτεΐνες	70
Εικόνα 34. Κινητική διαύγασης DMPC από το θραύσμα της αμινο-τελικής περιοχής (22kDa) των ισομορφών της αποΕ (Α) και από τη συνολική δομή (34kDa) της αποΕ (Β)	72
Εικόνα 35. Κλινική εικόνα που παρουσιάζει πολυάριθμα ξανθώματα στις παλάμες ασθενούς που πάσχει από ΥΛΠ ΙΙΙ	76
Εικόνα 36. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Alzheimer	79
Εικόνα 37. Εικόνες από σπειράματα ασθενών με ΛΠΣ	81

Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση σταδίων της διαδικασίας μεταλλαξιγένεσης «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis»	91
Εικόνα 39. Αναπαράσταση της δομής της αμινο-τελικής περιοχής της ανθρώπινης αποΕ3 (PDB: 1LPE), όπου παρουσιάζεται η θέση των μεταλλάξεων Ε3 R145C, K146E και R136S	144
Εικόνα 40. Οι θέσεις που εντοπίζονται τα τρία μεταλλαγμένα κατάλοιπα αργινίνης στην έλικα 4 της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ, όπως χαρτογραφούνται στην κρυσταλλική δομή της αποΕ (με κωδικό pdb: 1LPE)	157
Εικόνα 41. Δομή NMR της αποΕ3 (PDB: 2L7B) που περιλαμβάνει τη διευθέτηση των αμινοξέων που εντοπίζονται στις θέσεις 261, 264 και 265 στο χώρο	179
Εικόνα 42. Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων R136, R145 και K146 με την αμινο- ή καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ3 σύμφωνα με τη δομή NMR (PDB: 2L7B)	189
Εικόνα 43. Αλλαγές στο χώρο και το ηλεκτροστατικό δυναμικό όπως παρουσιάζονται στο χωροπληρωτικό μοντέλο της δομής της αποΕ3, έπειτα από υποκατάσταση της R145 από κυστεΐνη	191
Εικόνα 44. Αλλαγές στο χώρο και το ηλεκτροστατικό δυναμικό όπως παρουσιάζονται στο χωροπληρωτικό μοντέλο της δομής της αποΕ3, έπειτα από υποκατάσταση της Κ146 από γλουταμινικό οξύ	191

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά και σύσταση των λιποπρωτεϊνών	24
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των κυριότερων απολιποπρωτεϊνών που κυκλοφορούν στο πλάσμα	28
Πίνακας 3. Σπάνιες μεταλλάξεις της αποΕ που σχετίζονται με επικρατή μορφή κληρονομικότητας της ΥΛΠ ΙΙΙ	77
Πίνακας 4. Μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΛΠΣ	83
Πίνακας 5. Παράμετροι που εισήχθηκαν στο πρόγραμμα του οργάνου PCR για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης	94
Πίνακας 6: Συντελεστές απορρόφησης (στα 280nm) των μορίων απολιποπρωτεΐνης που μελετήθηκαν	99
Πίνακας 7. Όγκοι (μL) του βαθμονομητή προτύπου ορού και του DPBS που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής χοληστερόλης	101

Πίνακας 8. Όγκοι (μL) του προτύπου διαλύματος και του DPBS που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης προς ποσοτικοποίηση των φωσφολιπιδίων	102
Πίνακας 9. Συστατικά και ποσότητες της πηκτής διαβαθμισμένης πυκνότητας	107
Πίνακας 10. Εκατοστιαία ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της αποΕ3 και των μεταλλάξεών της (Ε3 R145C, Ε3 K146E και E3R136S)	148
Πίνακας 11. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα τουλάχιστον τριών επαναλήψεων της θερμικής αποδιάταξης της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της	150
Πίνακας 12. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειράματα χημικής αποδιάταξης…	153
Πίνακας 13. Αύξηση σήματος φθορισμού του ANS παρουσία μεταλλαγμένης ή μη αποΕ3 ως προς το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης	154
Πίνακας 14. Κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν από το πείραμα διαύγασης αιωρήματος DMPC από την αποΕ3 αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένες μορφές της	155
Πίνακας 15. Παράμετροι υπολογισμένες από τα πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τις μεταλλάξεις αποΕ3 R145C, K146E, R136S και την αποΕε3 αγρίου τύπου	156
Πίνακας 16. Πειραματικά αποτελέσματα του εκατοστιαίου ποσοστού α-έλικας στα 222nm που παρουσιάζουν η αποΕ3 αγρίου τύπου και οι μεταλλάξεις της (E3R145P, E3R147P και E3R158P)	161
Πίνακας 17. Μοριακή αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποE3 που προσδιορίστηκε πειραματικά στις ανασυγκροτημένες λιποπρωτεΐνες με αποE3 αγρίου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της	171
Πίνακας 18. Εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας στα 208 και 222nm στο μόριο των αποΕ2 και αποΕ4, μεταλλαγμένων και μη	184
Πίνακας 19. Θερμοκρασίες αποδιάταξης και συντελεστές συνεργιστικότητας των αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών τους	185
Πίνακας 20. Αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού του ιχνηθέτη ANS έπειτα από την πρόσδεσή του σε μεταλλαγμένη ή αγρίου τύπου αποΕ συγκριτικά με τον φθορισμό του απουσία αποΕ	188
Πίνακας 21. Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	197
Πίνακας 22. Πίνακας με συντμήσεις, αρκτικόλεξα και ακρωνύμια στα ελληνικά και στα αγγλικά	198

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε την περίοδο 2009-2013 στο «Εργαστήριο Χημείας Πρωτεϊνών» του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Η διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Β' Δρ. Ευστράτιου Στρατίκου, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την καθοδήγηση και τη συστηματική υποστήριξη στον τομέα της έρευνας. Επίσης, τον ευχαριστώ γιατί ανέλαβε τη συγγραφή και τη δημοσίευση των πειραματικών μου αποτελεσμάτων σε αξιόλογα διεθνή επιστημονικά περιοδικά καθώς και για τη δυνατότητα που μου παρείχε να συμμετάσχω σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια και συναντήσεις.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Μαίρης Μαυρή– Βαβαγιάννη, την οποία και ευχαριστώ ιδιαιτέρως για τη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην Ερευνήτρια Β' Δρ. Αγγελική Χρόνη για την πολύτιμη συνεργασία, την καθοδήγηση και τις συμβουλές στον τομέα των απολιποπρωτεϊνών, καθώς και τη συμμετοχή της στη συγγραφή των επιστημονικών άρθρων που πραγματοποίησε το εργαστήριό μας σε συνεργασία με το δικό της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δρ. Βασίλη Ζαννή του Τομέα Ιατρικής και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου της Βοστώνης για την τρίμηνη φιλοξενία μου στο εργαστήριό του και την προσφορά υλικών για τη διεξαγωγή της έρευνάς μου στον τομέα των απολιποπρωτεϊνών. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την παροχή αδενοϊών που έφεραν το γονίδιο έκφρασης της αποΕ3 αγρίου τύπου και κάποιων μεταλλαγμένων μορφών της, τις οποίες καθάρισα και μελέτησα βιοφυσικά.

Ευχαριστώ τη Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για την πολύτιμη βοήθειά της στο χειρισμό του φασματοπολωσιμέτρου, τις συμβουλές και τη γενικότερη υποστήριξη που μου παρείχε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο Χημείας πρωτεϊνών, την Ειρήνη Ευνουχίδου, τη Θάλεια Ζερβούδη και τη Δέσποινα Κουμάντου για τη στήριξη και τη φιλία τους. Επίσης, ευχαριστώ τους συνεργάτες μου Γιάννη Δάφνη, το Γιώργο Δανιήλ, τη Λέττα Αργύρη και τη Χριστίνα Γκολφινοπούλου για τη συνεργασία και τη βοήθειά τους εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την κατανόηση, τη συμπαράσταση και την υποστήριξη που παρείχε στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή.

22

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Σύσταση, κατηγοριοποίηση και χαρακτηριστικά λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μακρομοριακά συμπλέγματα απολιποπρωτεϊνών με ποικίλους συνδυασμούς φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων [1, 2]. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιλαμβάνουν ένα υδρόφοβο πυρήνα που αποτελείται από τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης και καλύπτεται από ένα σχετικά πολικό περίβλημα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Το περίβλημα αυτό αποτελείται από μία στιβάδα φωσφολιπιδίων διατεταγμένων έτσι, ώστε οι υδρόφοβες ουρές τους να βρίσκονται σε επαφή με τον υδρόφοβο λιπιδικό πυρήνα και οι πολικές κεφαλές τους να βρίσκονται εκτεθημένες στο πολικό περιβάλλον του πλάσματος και να αλληλεπιδρούν με μόρια χοληστερόλης και πρωτεϊνικά μόρια που διαπερνούν τη φωσφολιπιδική στιβάδα, τις απολιποπρωτεΐνες.



# Εικόνα 1. Μοντέλο λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σε σχήμα σφαίρας (τροποποιημένη εικόνα από [3]).

Οι λιποπρωτεΐνες κατατάσσονται σε κατηγορίες με κριτήρια όπως η πυκνότητα, το μέγεθος και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα [3]. Η διαφορά στην πυκνότητά τους διαφαίνεται από την διαφορετική κλασμάτωσή τους κατά την υπερφυγοκέντρηση. Τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αυξανόμενης της πυκνότητάς τους κατήγοριοποιούνται σε χυλομικρά (chylomicrons), λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoproteins, VLDL), λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins, LDL), λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) και λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoproteins, HDL). Οι λιποπρωτεΐνες απολιποπρωτεΐνες [2]. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται κάποια βασικά χαρακτηριστικά και η σύσταση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.

Χαρακτηριστικά και σύσταση	Χυλομικρά	VLDL	LDL	HDL
Προέλευση	Έντερο	Ήπαρ	VLDL	Ήπαρ και έντερο
Μέγεθος (Å)	750-12000	300-800	180-300	50-120
Πυκνότητα (g/mL)	<0,94	0,94-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Μοριακή Μάζα (kDa)	~400000	10-80000	2300	175-360
Τριγλυκερίδια (%wt)	80-95	45-65	4-8	2-7
Φωσφολιπίδια (%wt)	3-6	15-20	18-24	26-32
Ελεύθερη χοληστερόλη (%wt)	1-3	4-8	6-8	3-5
Εστεροποιημένη χοληστερόλη (%wt)	2-4	16-22	45-50	15-20
Πρωτεΐνη (%wt)	1-2	6-10	18-22	45-55
Κύριες απολιποπρωτεΐνες	αποΑ-Ι, αποΑ-ΙV, αποΒ-48. αποC-Ι, αποC-ΙΙΙ, αποΕ	αποΒ-100, αποΕ, αποC-Ι, αποC-ΙΙ, αποC-ΙΙΙ	αποΒ-100	αποΑ-Ι, αποΑ-ΙΙ
Δευτερεύουσες απολιποπρωτεΐνες	αποΑ-ΙΙ, αποC-ΙΙ	αποΑ-Ι, αποΑ-ΙΙ, αποΑ-ΙV, αποC-IV, αποΑ-V	αποC-I, αποC-II, αποC-III, αποΕ	αποC-Ι, αποC-ΙΙ, αποC-ΙΙΙ, αποD, αποΕ, αποJ, αποΑ-V

#### Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά και σύσταση των λιποπρωτεϊνών (τροποποιημένος πίνακας από [2])

Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται από τρία διακριτά μεταβολικά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο: το μονοπάτι των χυλομικρών, το μονοπάτι των VLDL/ IDL/ LDL και το μονοπάτι των HDL [2]

#### 1.2 Το μονοπάτι των χυλομικρών



# Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των χυλομικρών (Τροποποιημένη εικόνα από [2]).

Η σύνθεση των χυλομικρών λαμβάνει χώρα στο έντερο. Τα λιπίδια που προσλαμβάνονται από την τροφή απορροφώνται από το έντερο (εικόνα 2). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, τα λιπίδια αλληλεπιδρούν με την απολιποπρωτεΐνη B-48 προς σχηματισμό των χυλομικρών. Απαραίτητη για τη συναρμολόγηση και την επακόλουθη εισαγωγή των χυλομικρών στο λεμφικό σύστημα είναι η παρουσία της μικροσωμικής πρωτεΐνης μεταφοράς τριγλυκεριδίων (Microsomal Triglyceride Protein, MTP) [2]. Τα χυλομικρά εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της αριστερής υποκλείδιας φλέβας. Εκτός από την κύρια απολιποπρωτεΐνη των χυλομικρών, την αποΒ-48, τα χυλομικρά περιλαμβάνουν αποΕ

και αποC-II. Η αποC-II ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση στα τριχοειδή αγγεία του λιπώδους, καρδιακού, μυοσκελετικού και γαλακτικού μαστικού ιστών, επιτρέποντας την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στους παραπάνω ιστούς [1].

Τα χυλομικρά είναι φορείς λιπαρών οξέων από τις τροφές προς τους ιστούς, όπου και καταναλώνονται ή αποθηκεύονται. Τα χυλομικρά που προκύπτουν έπειτα από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων καλούνται υπολείμματα χυλομικρών και χαρακτηρίζονται από μειωμένη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια και αυξημένη περιεκτικότητα σε εστέρες χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνες. Τα υπολείμματα χυλομικρών μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω της απολιποπρωτεΐνης Ε προσδένονται στους υποδοχείς LDL (καθώς και σε υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των LDL υποδοχέων) που βρίσκονται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και εισέρχονται στο ήπαρ μέσω ενδοκύτωσης. Στο ήπαρ τα υπολείμματα χυλομικρών αποικοδομούνται στα λυσοσώματα.



### 1.3 Το μονοπάτι VLDL/ IDL/ LDL

# Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των VLDL (Τροποποιημένη εικόνα από [2]), (ΕΧ: εστέρες χοληστερόλης, Χ: χοληστερόλη, ΧΟ: χολικά οξέα)

Όταν τα λιπαρά οξέα που παρέχονται από τη διατροφή είναι περισσότερα από τα απαιτούμενα για παραγωγή ενέργειας, μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια στο ήπαρ. Η περίσσεια υδατανθράκων μετατρέπεται επίσης σε τριγλυκερίδια στο ήπαρ. Τα τριγλυκερίδια, η αποΒ-100, χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης συγκροτούν τα σωματίδια VLDL. Επιπλέον στις VLDL περιέχονται αποC-I, αποC-II, αποC-III και αποΕ [1]. Απαραίτητη για τη συγκρότηση των VLDL είναι η πρωτεΐνη MTP, απουσία της οποίας, ή ελλείψει αφθονίας λιπιδίων, η απολιποπρωτεΐνη B-100 οδηγείται σε καταβολισμό και δεν λαμβάνει χώρα συγκρότηση των σωματιδίων (εικόνα 3) [2]. Οι λιποπρωτεΐνες μεταφέρονται από το ήπαρ στο μυικό και λιπώδη ιστό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η λιποπρωτεΐνική λιπάση στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων που αιματώνουν τους παραπάνω ιστούς, ενεργοποιούμενη από την αποC-II οδηγεί στην υδρόλυση

των τριγλυκεριδίων που περιέχονται στις VLDL και την απελευθέρωση λιπαρών οξέων [1]. Τα λιποκύτταρα προσλαμβάνουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα μετατρέπουν σε τριγλυκερίδια και τα αποθηκεύουν. Αντίθετα, τα μυικά κύτταρα πρωτίστως οξειδώνουν τα λιπαρά οξέα προς παραγωγή ενέργειας. Η απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων μετατρέπει τα σωματίδια VLDL σε υπολείμματα VLDL, ή IDL. Ένα μέρος των IDL απομακρύνεται από την κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρεται στα ηπατοκύτταρα μέσω υποδοχέων που προσδένουν την περιεχόμενη στα IDL απολιποπρωτεΐνη Ε [1]. Περαιτέρω απομάκρυνση τριγλυκεριδίων από τις λιποπρωτεΐνες IDL οδηγεί στην παραγωγή LDL που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης και η κύρια απολιποπρωτεΐνη που περιέχουν είναι η αποΒ-100. Τα λιποπρωτεΐνικά σωματίδια LDL είναι φορείς χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης σε εξωηπατικούς ιστούς που έχουν υποδοχείς LDL. Η πρόσδεση των LDL σωματιδίων στους υποδοχείς LDL γίνεται μέσω της αποΒ-100 [2].

### 1.4 Το μονοπάτι των HDL

Η βιογένεση των HDL λαμβάνει χώρα εξωκυτταρικά μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού, που παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.



# Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού των HDL (Τροποποιημένη εικόνα από [2]). (LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση, PL: φωσφολιπίδια, FC: ελεύθερη χοληστερόλη, HL: ηπατική λιπάση, CETP: πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης)

Στα πρώτα στάδια της βιογένεσης των HDL, η απολιποπρωτεΐνη A-I εκκρίνεται σε μη λιπιδιωμένη μορφή από το ήπαρ και προσδένει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη μέσω αλληλεπιδράσεων με το μεταφορέα λιπιδίων με κασέτα δέσμευσης ATP A1 (ABCA1) και σχηαμτίζει τα προ-β-HDL [2]. Κατόπιν περαιτέρω λιπιδίωσης σχηματίζονται δισκοειδή HDL σωματίδια τα οποία, μέσω της δράσης του ενζύμου εστεροποίησης χοληστερόλης LCAT, μετατρέπονται στα ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια. Οι HDL περιλαμβάνουν εκτός της αποA-I, αποA-II, ΑποC-I, αποC-II, αποΕ και άλλες απολιποπρωτεΐνες [1]. Επίσης, λαμβάνει χώρα μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τα VLDL/ LDL σωματίδια στα HDL μέσω της δράσης της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP) και μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις VLDL/LDL στις HDL μέσω της CETP με παράλληλη μεταφορά τριγλυκεριδίων από τις HDL στις VLDL/LDL [2]. Οι ώριμες, πλούσιες σε χοληστερόλη λιποπρωτεΐνες HDL επιστρέφουν στο ήπαρ προς μεταφορά και απόθεση της χοληστερόλης. Η πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης από το ήπαρ επιτυγχάνεται επιλεκτικά μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI [1].

### 1.4.1 Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης

Η περίσσεια χοληστερόλης μπορεί να μεταφερθεί από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ από την αποΑ-Ι και τις HDL μέσω του μονοπατιού αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης [1]. Οι HDL προσδένονται στους μεμβρανικούς υποδοχείς SR-BI στο ήπαρ και σε ιστούς που συνθέτουν στεροειδή, όπως στα επινεφρίδια (εικόνα 4). Μέσω των SR-BI υποδοχέων επιτυγχάνεται όχι ενδοκύτωση, αλλά μερική και εξειδικευμένη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης μέσα στα ηπατοκύτταρα για απομάκρυνση μέσω της χολής. Οι HDL που πλέον έχουν αποθέσει το φορτίο χοληστερόλης, αποσυνδέονται από τους SR-BI υποδοχείς και κυκλοφορούν στο αίμα για περαιτέρω αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Η απολιποπρωτεΐνη Ε

### 2.1 Απολιποπρωτεΐνες

Οι απολιποπρωτεΐνες, είναι τα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία αμφιπαθητικών περιοχών που προσδίδουν στις απολιποπρωτεΐνες την ικανότητα να προσδένουν λιπίδια. Οι απολιποπρωτεΐνες διακρίνονται σε απολιποπρωτεΐνη Α-Ι (αποΑ-Ι), αποΑ-ΙΙ, αποΑ-ΙV, αποΒ, αποC-Ι, αποC-ΙΙ, αποC-ΙΙΙ, αποC-ΙV, αποD, αποΕ και άλλες [2]. Είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση της δομής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και συντελούν στην λιπιδική ομοιόσταση και τη μεταφορά χοληστερόλης στον οργανισμό μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μεβρανικούς υποδοχείς και ένζυμα [2].

### 2.2 Κύριες λειτουργίες των απολιποπρωτεϊνών

Οι απολιποπρωτεΐνες επάγουν την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση ενζύμων καθοριστικών για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των λιπιδίων στον οργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι και σε μικρότερο βαθμό, η αποΑ-ΙV, η αποC-ΙΙ και η αποΕ, οι οποίες ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT [4, 5]. Επίσης, η αποC-ΙΙ ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση [6]. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι κυριότερες απολιποπρωτεΐνες, η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα, τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια στα οποία απαντώνται και οι λειτουργίες τους.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των κυριότερων απολιποπρωτεϊνών που κυκλοφορούν στο πλάσμα (τροποποιημένος πίνακας από [2, 3].

Απολιποπρωτέϊνη	Συγκέντρωση στο πλάσμα (mg/dL)	Λιποπρωτεΐνη	Λειτουργίες
ΑποΑ-Ι	130	HDL	Ενεργοποιεί την LCAT, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα SR-BI και προάγει την επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων και την εκροή χοληστερόλης. Αλληλεπιδρά με την ABCA1 και προάγει την εκροή χοληστερόλης και τη βιογένεση των HDL. Προσφέρει αθηρο-προστασία στα αρτηριακά τοιχώματα.
ΑποΑ-ΙΙ	40	HDL	Αναστέλλει τη δράση της ηπατικής λιπάσης.
ΑποΑ-ΙV	15	d<1.21g/ml	Ενεργοποιεί μερικώς το ένζυμο LCAT
ΑποΒ	80-250	LDL, VLDL	Προσδένεται στον LDL υποδοχέα και προάγει το σχηματισμό των νεοσυντιθέμενων VLDL
ΑποC-Ι	3-6	VLDL, LDL, HDL	Ενεργοποιεί μερικώς το ένζυμο LCAT
ΑποC-II	3-12	VLDL, LDL, HDL	Ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση
AπoC-III	12	VLDL, LDL, HDL	Αναστέλλει τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια
АпоЕ	5-7	VLDL, LDL, HDL	Προσδένεται στον υποδοχέα των LDL. Επιπρόσθετα, προσδένεται in vitro σε άλλους υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αποΕ. Ενεργοποιεί μερικώς την LCAT και αλληλεπιδρά λειτουργικά με τον υποδοχέα SR-BI. Είναι απαραίτητη στην εκκαθάριση των υπολειμμάτων των λιποπρωτεϊνών και παρέχει αθηροπροστασία.

### 2.3 Η απολιποπρωτεΐνη Ε (αποΕ)

### 2.3.1 Βιοσύνθεση της αποΕ

Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε του ανθρώπου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και συγκεκριμένα εντοπίζεται στο 5' άκρο μίας συστάδας γονιδίων, μαζί με τα γονίδια των αποC-I, αποC-II και των υποδοχέων της LDL [7]. Το γονίδιο της αποΕ απαντάται σε τρία αλληλόμορφα, καθένα από τα οποία είναι υπεύθυνο για την έκφραση μίας από τις τρεις ισομορφές της απολιποπρωτεΐνης Ε, τις E2, E3 και E4. Τα τρία αλληλόμορφα διαφέρουν σε συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό, από το αλληλόμορφο ε2 να εμφανίζεται με συχνότητα 5-10%, το αλληλόμορφο ε3 με συχνότητα 65-70% και το ε4 με συχνότητα 15-20%. Τα τρία αλληλόμορφα μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση τριών ομόζυγων (E2/E2, E3/E3, E4/E4) και τριών ετερόζυγων γονοτύπων (E2/E3, E2/E4, E3/E4) [8]. Ο συχνότερα απαντώμενος γονότυπος στο γενικό πληθυσμό είναι ο E3/E3, ενώ ο πιο σπάνια απαντώμενος είναι ο E2/E2 [9].

Το γονίδιο της αποΕ αποτελείται από τέσσερα εξώνια και τρία ιντρόνια και κωδικοποιεί μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 317 αμινοξέα. Τα 18 αμινο- τελικά αμινοξέα αντιστοιχούν στο σηματοδοτικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης. Μετά τη σύνθεση, η αποΕ μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi προς γλυκοζυλίωση στο άτομο του οξυγόνου της πλευρικής αλυσίδας της Thr 194, όπου γίνεται προσθήκη ομάδων σιαλικού οξέος [10]. Έχει δειχθεί ότι η σιαλοποίηση δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έκκριση της αποΕ, καθώς η αποΕ εκκρίνεται και από κύτταρα που έχουν καταστεί ανίκανα να γλυκοζυλιώσουν τις πρωτεΐνες που εκφράζουν [11].

Φυσιολογικά, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της αποΕ οδηγεί σε ποικίλο βαθμό σιαλοποίησης. Στα ηπατικά κύτταρα, το 92% της εκκρινόμενης αποΕ είναι γλυκοζυλιωμένη με υδατανθρακικές αλυσίδες που περιέχουν δύο (E<sub>s2</sub>), τέσσερα (E<sub>s4</sub>) ή έξι (E<sub>s6</sub>) μόρια σιαλικού οξέος [9]. Η νεο-εκκρινόμενη αποΕ είναι σαφώς πιο σιαλοποιημένη συγκριτικά με αυτή που κυκλοφορεί στο πλάσμα [11]. Το 80-85% της ανθρώπινης αποΕ του πλάσματος βρίσκεται στην ασιαλο- μορφή, ενώ οι μονοσίαλο (E<sub>s1</sub>) και δισίαλο (E<sub>s2</sub>) μορφές υπάρχουν σε μικρότερα ποσοστά.

Ένα σημαντικό μέρος της νεοσυντιθέμενης αποΕ αποικοδομείται πριν εκκριθεί [12]. Η εκκρινόμενη αποΕ μπορεί να μην απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο αλλά να παραμείνει στην κυτταρική επιφάνεια δεσμευμένη σε πρωτεογλυκάνες. Η δεσμευμένη σε πρωτεογλυκάνες αποΕ μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικές πορείες ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού σε αποΕ. Μπορεί να εκκριθεί, να ενδοκυτωθεί και κατόπιν να αποικοδομηθεί, ή να ανακυκλωθεί και να επιστρέψει στην επιφάνεια του κυττάρου προκειμένου να παραμείνει ή να εκκριθεί στον εξωκυττάριο χώρο [12].

Η αποΕ παράγεται από πολλούς ιστούς, όπως το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, οι ωοθήκες, τα επινεφρίδια, οι νεφροί και οι μύες [13]. Η αποΕ του πλάσματος προέρχεται κατά κύριο λόγο από το ήπαρ (>75%). Το αμέσως μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης

της αποΕ εντοπίζεται στον εγκέφαλο [13]. Τα αστροκύτταρα παράγουν ένα μεγάλο ποσοστό της απολιποπρωτεΐνης Ε στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (~3-5 μg/mL), ενώ οι νευρώνες συνθέτουν αποΕ σε κατάσταση στρες. Η απολιποπρωτεΐνη Ε παράγεται επίσης από μακροφάγα και άλλους τύπους κυττάρων [14]

### 2.3.2 Ρύθμιση των επιπέδων της αποΕ

Η έκφραση της αποΕ ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες. Η ρύθμιση της έκφρασής της είναι ιστο-ειδική και αποτελεί συνέπεια μεταβολών που λαμβάνουν χώρα τόσο σε ενδοκυτταρικό, όσο και εξωκυτταρικό επίπεδο.

Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση της αποΕ. Επίσης ο εμπλουτισμός των μακροφάγων σε χοληστερόλη οδηγεί σε σημαντική αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου της αποΕ. Επιπρόσθετα, η έκφραση της αποΕ επηρεάζεται από την παρουσία οξειδωμένων μορφών χοληστερόλης, όπως αυτών που βρίσκονται στα αφρώδη κύτταρα, καθώς και από φλεγμονώδη απόκριση. Η παραγωγή της απολιποπρωτεΐνης Ε από τα μακροφάγα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, κάποιοι από τους οποίους δρουν ανασταλτικά (π.χ. ιντερφερόνη γ, ιντερλευκίνη 1, παράγοντας πολλαπλασιασμού των κοκκιοκυττάρων) ή διεγερτικά (π.χ. ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α, ο αυξητικός παράγοντας β). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση της αποΕ είναι το cAMP, η θυροειδική ορμόνη και τα οιστρογόνα [12].

Προκειμένου να λάβει χώρα εκκαθάριση των λιποπρωτεϊνών, απαιτείται η αποΕ να βρίσκεται σε μία βέλτιστη συγκέντρωση (~5-7mg/dL) στο πλάσμα του αίματος. Σημαντική απόκλιση από τη συγκέντρωση αυτή οδηγεί στην εμφάνιση νοσηρών καταστάσεων. Ενδεικτικά, η υπερ-έκφραση της ανθρώπινης αποΕ3 σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 30mg/dL σε ποντίκια που δεν εκφράζουν αποΕ συνδέεται με υπερτριγλυκεριδαιμία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η αποΕ ελέγχει ένα σημαντικό στάδιο της διαδικασίας συγκρότησης λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων [15].

Ο οργανισμός περιλαμβάνει μηχανισμούς ρύθμισης και διατήρησης της αποΕ σε φυσιολογικά επίπεδα. Ένα σημαντικό ποσοστό των λιποπρωτεϊνών που συνδέονται με αποΕ και έχουν ενδοκυτωθεί, παραμένει μέσα στο κύτταρο και ακολούθως εκκρίνεται και επανεμφανίζεται στο μέσο. Η ανακύκλωση της αποΕ έχει παρατηρηθεί σε μακροφάγα, ηπατοκύτταρα και ινοβλάστες [16-19]. Η αποΕ που εσωτερικεύεται, αποφεύγει τον καταβολισμό μέσω λυσοσωμάτων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παρουσία ενός ενεργού κυτταρικού μηχανισμού που διατηρεί τα επίπεδα αποΕ, αποσυνδέοντας την αποΕ από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και μεταφέροντάς την στο εκκριτικό μονοπάτι [20]. Οι Farkas et al. παρατήρησαν ότι η ανακύκλωση της αποΕ λαμβάνει χώρα ακόμη και απουσία υποδοχέων LDL ή και όταν τα επίπεδα έκφρασης της παρατηρηθεί ότι η αποΕ ανακυκλώνεται ακόμη και απουσία της συσκευής Golgi, όπως επίσης απουσία της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ, περιοχής απαραίτητης για την πρόσδεση της

απολιποπρωτεΐνης στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Συμπερασματικά, η αποΕ ανακυκλώνεται μέσω πολλαπλών μονοπατιών [21].

### 2.4 Λειτουργίες της αποΕ

Η αποΕ επηρεάζει τη συγκέντρωση λιπιδίων στο πλάσμα καθώς επιδρά στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών διαφοροποιώντας την εκκαθάρισή τους μέσω υποδοχέων. Επιπρόσθετα, η αποΕ συμμετέχει στην παραγωγή ηπατικών VLDL και στη λιπολυτική επεξεργασία λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια. Είναι παρούσα σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, με εξαίρεση τις LDL και γι' αυτό αποτελεί μία από τις απολιποπρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία στο πλάσμα [22].

Η αποΕ είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και παίζει κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης στον εγκέφαλο. Η χοληστερόλη αποτελεί κύριο συστατικό της μυελίνης και των μεμβρανών των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων. Σχεδόν όλη η χοληστερόλη του εγκεφάλου συντίθεται *in situ* και μεταφέρεται εντός σωματιδίων τύπου HDL που περιέχουν αποΕ (HDL-E), τα οποία κυκλοφορούν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [23]. Οι μεταφορείς λιπιδίων με κασέτα δέσμευσης ATP, ABCA1 και ABCG1, εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών στον εγκέφαλο. Ο ABCA1 μεσολαβεί στην αρχική λιπιδίωση των νέων μορίων αποΕ, τα οποία εκκρίνονται από αστροκύτταρα και μικρογλοία [22, 24]. Τα δισκοειδή σωματίδια που σχηματίζονται στο πρώτο αυτό στάδιο, λιπιδιώνονται περαιτέρω είτε στους νευρώνες ή τα νευρογλοιακά κύτταρα, μέσω μίας διεργασίας ενεργής μεταφοράς που διαμεσολαβείται από τη δράση του ABCG1 [22, 25]. Το στάδιο αυτό, μαζί με την επακόλουθη ωρίμανση των ανακυκλούμενων λιποπρωτεϊνών, οδηγεί

Μία από τις κύριες λειτουργίες της αποΕ στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι να μεσολαβεί στην επιδιόρθωση, την αναμόρφωση και την προστασία των νευρώνων, με την αποΕ4 να είναι λιγότερο αποτελεσματική από τις ισομορφές αποΕ2 και αποΕ3 [26, 27]. Η αποΕ έχει συσχετιστεί με την παθογένεση της νόσου του Alzheimer, με τους πολυμορφισμούς της αποΕ να παίζουν σημαντικό ρόλο [22]. Η αποΕ4 είναι κύριος παράγοντας κινδύνου και εμπλέκεται στην εκκαθάριση και εναπόθεση του αμυλοειδούς πεπτιδίου β στον εγκέφαλο [28]. Ο τρόπος με τον οποίο η αποΕ εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

### 2.4.1 Λειτουργικός ρόλος της αποΕ κατά την ανακύκλωσή της στα ηπατοκύτταρα

Το μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης κατευθύνει την περίσσεια χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ για μεταβολισμό. Αν και η κύρια απολιποπρωτεΐνη στους πληθυσμούς HDL2 και HDL3 είναι η αποΑ-Ι, οι λιποπρωτεΐνες HDL2 περιέχουν αποΕ σε σημαντικό ποσοστό. Η αποΕ διευκολύνει την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης με μοναδικό τρόπο, καθώς επιτρέπει τη διεύρυνση του πλούσιου σε εστέρες χοληστερόλης πυρήνα των HDL, έπειτα από τη μετατροπή της ελεύθερης χοληστερόλης σε εστεροποιημένη από την LCAT [29]. Οι HDL που περιέχουν αποΑ-Ι μπορούν να φιλοξενήσουν μία περιορισμένη ποσότητα εστέρων χοληστερόλης στον πυρήνα τους, οδηγώντας σε μειωμένης έκτασης διεύρυνση του πυρήνα. Αντίθετα, το μέγεθος και το περιεχόμενο σε εστέρες χοληστερόλης στις HDL μπορεί να αυξηθεί σημαντικά παρουσία της αποΕ. Καθώς η αποΕ είναι προσδέτης του υποδοχέα LDL, οι εμπλουτισμένες σε αποΕ HDL μπορούν να διανείμουν την απαιτούμενη χοληστερόλη από την περιφέρεια στο ήπαρ μέσω ηπατικών LDL υποδοχέων [30]. Έπειτα από την έκκριση από το ήπαρ, η αποΕ, που αποτελεί συστατικό των VLDL, επαναδιανέμεται για να εμπλουτίσει τα χυλομικρά και τις HDL.

Η αποΕ που περιέχεται σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια υπηρετεί επιπλέον λειτουργίες, όπως η πρόσδεση σε πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (HSPG) για να διευκολύνει την εσωτερίκευση των λιποπρωτεϊνών στα κύτταρα [29]. Η ταχεία απομάκρυνση των υπολειμμάτων χυλομικρών προϋποθέτει την παρουσία κυτταρικής αποΕ. Η αποΕ που εσωτερικεύεται στα ηπατοκύτταρα είναι μερικώς προστατευμένη από λυσοσωμική αποικοδόμηση και ανακυκλώνεται μέσω της συσκευής Golgi [19, 22].

Έπειτα από ενδοκύτωση που μεσολαβείται από υποδοχείς, η ενδοκυτταρική πορεία των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια είναι ιδιαιτέρως πολύπλοκη και διαφοροποιείται από το μονοπάτι αποικοδόμησης των LDL [22, 31]. Η πλειοψηφία της αποΕ που προέρχεται από πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες παραμένει σε ενδοσώματα που ανακυκλώνονται περιφερικά. Στη συνέχεια η αποΕ κινητοποιείται από HDL ή αποΑ-Ι που προέρχεται από HDL, για να ανακυκλωθεί πίσω στην πλασματική μεμβράνη. Ακολούθως εκκρίνεται στο εξωκυττάριο μέσο, όπου μπορεί να συμμετάσχει στο σχηματισμό των HDL-αποΕ.





Στην εικόνα 5, παρουσιάζεται η ανακύκλωση της αποΕ3 στο ήπαρ, έπειτα από γεύμα. Στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων του μυικού και λιπώδους ιστού, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) μεσολαβεί στην υδρόλυση των χυλομικρών και οδηγεί στο σχηματισμό

υπολειμμάτων χυλομικρών. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση παραμένει συνδεδεμένη στα υπολείμματα χυλομικρών, που ταυτόχρονα εμπλουτίζονται με αποΕ προερχόμενη από HDL. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα ταχεία εσωτερίκευση των υπολειμμάτων χυλομικρών στο ήπαρ μέσω πρόσδεσης της αποΕ και της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στους υποδοχείς LRP1. Όταν πλέον υπολείμματα χυλομικρών αποσυγκροτούνται εσωτερικευθούν, тα εντός πρώιμων ενδοσωμάτων. Ο λιπιδικός πυρήνας που περιλαμβάνει αποΒ48 κατευθύνεται σε ώριμα ενδοσώματα/ προ-λυσοσωμικά διαμερίσματα [31]. Τα συστατικά των υπολειμμάτων χυλομικρών που απομένουν και περιέχουν αποΕ, λιποπρωτεϊνική λιπάση και κάποια λιπίδια, διατηρούνται σε πρώιμα ενδοσώματα και πρόκειται να κινητοποιήσουν την κυτταρική χοληστερόλη από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα. Τα ερωτηματικά που εμφανίζονται στην εικόνα 5, δηλώνουν πως δεν είναι γνωστό αν η κυτταρική χοληστερόλη κινητοποιείται από τα ώριμα ενδοσωμικά διαμερίσματα ή από κυστίδια που προέρχονται από τη συσκευή Golgi. Ωστόσο, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, σχηματίζονται σύμπλοκα αποΕ/ χοληστερόλης μέσα σε περιφερικά ανακυκλούμενα ενδοσώματα. Η φτωχή σε λιπίδια αποΑ-Ι που προέρχεται από HDL ή από το ήπαρ, μπορεί να εσωτερικευθεί και να κατευθυνθεί στα ενδοσώματα που περιέχουν αποΕ/ χοληστερόλη με στόχο τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό σωματιδίων HDL-Ε και τη διέγερση της ανακύκλωσης της αποΕ και της εκροής χοληστερόλης. Στη μεταγευματική κατάσταση, η επανέκκριση των HDL-E μπορεί να διευκολύνει τον εμπλουτισμό των υπολειμμάτων χυλομικρών σε αποΕ και έτσι να καταστήσει αποτελεσματική την ηπατική εκκαθάριση των υπολειμμάτων χυλομικρών [31].

### 2.4.2 Λειτουργικός ρόλος της αποΕ κατά την ανακύκλωσή της στα μακροφάγα

Η ανακύκλωση της αποΕ σε μακροφάγα ποντικών λαμβάνει χώρα μέσω του μεταφορέα ABCA1 και παρουσία της αποΑ-Ι. Η ανακυκλούμενη αποΕ απομακρύνεται από τα κύτταρα μέσα σε σωματίδια που προσομοιάζουν σε HDL [22, 32]. Σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μακροφάγων, η αποΑ-Ι έχει βρεθεί πως διεγείρει την έκκριση της αποΕ ανεξάρτητα από την εκροή χοληστερόλης. Αυτή η επίδραση αντικατοπτρίζει ένα νέο, ανεξάρτητο από τον ABCA1 μονοπάτι ανατροφοδότησης για τη διέγερση της έκκρισης της αποΕ [33]. Η ενδοκυτταρική μεταφορά της ανακυκλούμενης αποΕ σε ωοκύτταρα κινέζικου hamster φαίνεται να συνδέεται με απομάκρυνση της κυτταρικής χοληστερόλης μέσω του διαμερίσματος ενδοσωμικής ανακύκλωσης και τους υποδοχείς που περιέχουν φωσφολιπίδια σε ένα εναλλακτικό μονοπάτι σε σχέση με αυτό της πορείας ABCA1/ αποΑ-Ι [22, 34]. Η σχέση μεταξύ αποΕ και ABCA1 για τη ρύθμιση της εκροής των κυτταρικών στερολών έχει εξεταστεί σε μακροφάγα που εκφράζουν αποΕ και ABCA1. Η έκφραση του ΑΒCA1 απαιτείται για την εκροή χοληστερόλης που μεσολαβείται από αποΕ, όταν η αποΕ που συντίθεται ενδογενώς συσσωρεύεται εξωκυτταρικά. Ωστόσο, υπάρχει και ένα μονοπάτι εκροής λιπιδίων που είναι ανεξάρτητο του ABCA1 και απαιτεί την ενδοκυτταρική σύνθεση και/ ή τη μεταφορά της αποΕ [22, 35]. Συνολικά, είναι σαφές ότι η έκκριση της αποΕ από τα μακροφάγα είναι μία ρυθμιζόμενη διεργασία και ότι υπάρχει τόσο ABCA1- εξαρτώμενο, όσο και ABCA1- ανεξάρτητο μονοπάτι [22, 36].

### 2.4.3 Συμμετοχή της αποΕ στη συγκρότηση HDL σωματιδίων (HDL-E)

Γονιδιακή μεταφορά αποΕ4 μέσω αδενοϊών σε ποντίκια που δεν εκφράζουν αποΑ-Ι ή ABCA1 υπέδειξε πως η αποΕ συμμετέχει σε ένα νέο μονοπάτι βιογένεσης HDL-E και απαιτεί τη λειτουργία του μεταφορέα ABCA1 και της LCAT [37]. Μόλυνση αποΑ-Ι knock-out ποντικών με αδενοϊούς που εξέφραζαν αποΕ4 οδήγησε στο σχηματισμό δισκοειδών HDL σωματιδίων. Αντίθετα, μόλυνση ABCA1 knock-out ποντικών με αδενοϊούς που εξέφραζαν αποΕ4 δεν οδήγησε στο σχηματισμό HDL, υποδεικνύοντας πως ο μεταφορέας ABCA1 είναι απαραίτητος για το σχηματισμό HDL σωματιδίων [37, 38].

Η αποΕ βρέθηκε πως παρουσιάζει διπλή λειτουργικότητα. Εκτός από την ικανότητά της να επιτελεί εκκαθάριση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, συμμετέχει στη βιογένεση HDL-E, σε μία διαδικασία αντίστοιχη με την αποΑ-Ι. Οι βιοσυντιθέμενες HDL-E μπορεί να έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες κατ' αντιστοιχία με τις HDL που φέρουν αποΑ-Ι, συντελώντας περαιτέρω στην αθηροπροστατευτική δράση της αποΕ [38, 39]. Οι HDL-E μπορούν επίσης να έχουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες στον εγκέφαλο [40].

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6, στον κλάδο Ι, περιγράφεται η συμμετοχή της αποΕ στο μονοπάτι των χυλομικρών, των οποίων η εκκαθάριση λαμβάνει χώρα μέσω των υποδοχέων LDL [38]. Ακριβώς από κάτω, στον κλάδο ΙΙ, παρουσιάζεται η συμμετοχή της αποΕ στη βιογένεση HDL-E. Η φτωχή σε λιπίδια αποΕ αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική πρωτεΐνημετατροπέα ABCA1 προς επαγωγή εκροής χοληστερόλης και βιογένεση HDL-E σωματιδίων. Ακολούθως με τη δράση του ενζύμου LCAT, τα δισκοειδή σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά καθώς σχηματίζεται ένας σταδιακά αυξανόμενος πυρήνας από εστέρες χοληστερόλης. Τα σφαιρικά σωματίδια που φέρουν αποΕ αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα SR-BI και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης και στην εκροή χοληστερόλης. Αντίστοιχα με τον κλάδο ΙΙ, στον κλάδο ΙΙΙ παρουσιάζεται η βιογένεση HDL που φέρουν αποΑ-Ι.



Εικόνα 6. Διαγραμματική αναπαράσταση της συμμετοχής της αποΕ στο μονοπάτι χυλομικρών (κλάδος Ι), στη βιογένεση HDL-Ε σωματιδίων (κλάδος ΙΙ) και τη βιογένεση HDL-αποΑ-Ι σωματιδίων (κλάδος ΙΙΙ) (Τροποποιημένη εικόνα από [38]).

### 2.4.4 Αθηροπροστατευτικός ρόλος της αποΕ

Η αποΕ μπορεί να έχει αθηροπροστατευτικό ρόλο. Ποντίκια που υπερεκφράζουν την αποΕ παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης [41]. Αντίθετα, ποντίκια που έχουν υποστεί στοχευμένη γονιδιακή μεταλλαξιγένεση και δεν εκφράζουν αποΕ (αποΕ<sup>-/-</sup> ποντίκια) παρουσιάζουν ~7 φορές αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα συγκριτικά με ποντίκια αγρίου τύπου (500 έναντι 60-90mg/dL) [42-44]. Η παραπάνω αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης είναι αποτέλεσμα της ελλιπούς εκκαθάρισης των λιποπρωτεϊνικών υπολειμμάτων που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα εκκαθαρίζονταν από το ήπαρ μέσω της αποΕ. Όταν παρέχεται τροφή πλούσια σε λίπη και χοληστερόλη σε αποΕ<sup>-/-</sup> ποντίκια, η χοληστερόλη του ορού τους μπορεί να ξεπεράσει τα 2000mg/dL. Υπό τις συνθήκες η ανάπτυξη εκτεταμένης αθηροσκλήρωσης αποτελεί πλέον ζήτημα μηνών για τα αποΕ<sup>-/-</sup> ποντίκια [42-44]. Η μεταμόσχευση κυττάρων μυελού των οστών από ποντίκια που εκφράζουν αποΕ σε υπερχοληστερολαιμικά αποΕ knock-out ποντίκια οδηγεί σε μείωση της χοληστερόλης του ορού και υποχώρηση της σοβαρής αθηροσκλήρωσης, συνηγορώντας στο ότι η αποΕ δρα προστατευτικά έναντι της αθηροσκλήρωσης [44, 45].

Η έκκριση της αποΕ από τα μακροφάγα μπορεί επίσης να δρα προστατευτικά έναντι της αθηροσκλήρωσης [33]. Η ευεργετική επίδραση της εκκρινόμενης αποΕ μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη τοπική εκκαθάριση των κυτταρικών λιπιδίων και/ ή την αναστολή των τοπικών φλεγμονωδών αποκρίσεων, αθροιστικά με τη μείωση της συγκέντρωσης των αθηρογενετικών λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Μελέτες έχουν δείξει πως η αποΑ-Ι διεγείρει την έκκριση της αποΕ και την εκροή χοληστερόλης από αφρώδη μακροφάγα, τόσο ανθρώπου όσο και ποντικού. Η διέγερση της έκκρισης της αποΕ από την αποΑ-Ι και τις HDL πιθανά να ρυθμίζεται μεταμεταγραφικά και παρατηρείται τόσο για την ενδογενή αποΕ (από μακροφάγα) και την ανακυκλούμενη (από ηπατοκύτταρα) [33].

Επιπρόσθετα, η εκροή χοληστερόλης που επάγεται από την ελεύθερη λιπιδίων αποΕ μέσω της δράσης του μεταφορέα ABCA1 καθώς και η συμμετοχή της αποΕ στη βιογένεση σωματιδίων HDL-E, αποτελούν χαρακτηριστικά της αποΕ που την καθιστούν ικανή να συνεισφέρει στην κυτταρική και ιστική ομοιόσταση της χοληστερόλης και την προστασία από την αθηροσκλήρωση [46].

## 2.5 Δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε περιλαμβάνει 299 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 34KDa [8]. Οι τρεις ισομορφές της, οι αποΕ2, αποΕ3 και αποΕ4, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα αμινοξέα που φέρουν στις θέσεις 112 και 158. Η απολιποπρωτεΐνη Ε2 διαθέτει δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, η Ε3 διαθέτει μία κυστεΐνη και μία αργινίνη και η Ε4 δύο κατάλοιπα αργινίνης στις θέσεις 112 και 158 αντίστοιχα (εικόνα 7). Κάθε ισομορφή αποτελεί μία σημειακή μετάλλαξη των άλλων δύο ισομορφών. Παρότι η διαφορά της αποΕ2 από την αποΕ3 και της αποΕ3 από την αποΕ4, έγκεται στην αλλαγή μόνο ενός αμινοξέος, η δομή της κάθε ισομορφής παρουσιάζει διαφορές

από τις άλλες δύο. Οι διαφορές στη δομή επηρεάζουν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της κάθε ισομορφής τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο [14].



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των πολυμορφισμών της αποΕ (Τροποποιημένη εικόνα από [2]).

Η απολιποπρωτεΐνη Ε χαρακτηρίζεται από έντονη δομική πλαστικότητα. Κατά τη φυσιολογική της λειτουργία υφίσταται εκτεταμένες δομικές αλλαγές, καθώς περιέρχεται μεταξύ δύο καταστάσεων, μίας ελεύθερης λιπιδίων και μίας προσδεδεμένης σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια [47]. Το μοντέλο της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ περιλαμβάνει δύο ανεξάρτητες δομικές περιοχές, την αμινο- τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή, που συνδέονται μεταξύ τους με μία περιοχή άρθρωσης (εικόνα 8) [47]. Η αποΕ διαχωρίζεται στην αμινο- και καρβοξυ-τελική περιοχή έπειτα από πέψη με θρομβίνη [48, 49].




Όπως προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, η αμινο-τελική περιοχή εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 1-191 και έχει τη δομή ενός επιμήκους δεματιού τεσσάρων ελίκων [8, 50]. Η έλικα 1 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 24-42, η έλικα 2, τα αμινοξέα 54-81, η έλικα 3 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 87-122 και η έλικα 4 τα 130-164 [12]. Στην έλικα 4 της αμινο- τελικής περιοχής περιλαμβάνεται η περιοχή πρόσδεσης στον LDL- υποδοχέα και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των LDL-υποδοχέων. Η περιοχή αυτή εκτείνεται μεταξύ των καταλοίπων 136-150 και χαρακτηρίζεται από την παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέα των LDL υποδοχέων με την αποΕ περιλαμβάνουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα της περιοχής πρόσδεσης της αποΕ [51]. Απαραίτητη για την αποτελεσματική πρόσδεση της αποΕ στα μέλη της οικογένειας του LDL-υποδοχέα, είναι η αργινίνη στη θέση 172 που βρίσκεται στην περιοχή άρθρωσης της αποΕ [52].

Η καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 216-299 και περιλαμβάνει την περιοχή (244-272) που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση λιπιδίων [51]. Η καρβοξυ-τελική περιοχή χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό α-έλικας, όπως προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού.

Η αποΕ παρουσιάζει μεγάλη τάση ολιγομερισμού. Η ελεύθερη λιπιδίων αποΕ βρίσκεται κυρίως ως τετραμερές σε συγκεντρώσεις της τάξης των μΜ και διαχωρίζεται σε διμερή και μονομερή σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM. Η δυσκολία στην επίλυση της δομής της αποΕ με κρυσταλλογραφία ακτίνων X πιθανώς να σχετίζεται με τη μεγάλη τάση της να συσσωματώνεται στις υψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την κρυστάλλωσή της [53]. Η αποΕ3 μπορεί να σταθεροποιηθεί σε μονομερή μορφή σε συγκέντρωση 150μM, έπειτα από την εισαγωγή τεσσάρων ή πέντε σημειακών μεταλλάξεων στο μόριό της [53, 54].

To 2011, οι Chen et al. συνέλεξαν υψηλής ποιότητας δεδομένα φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού (NMR) έλυσαν μαγνητικού και тη δομή αποΕ3 της [F257A/W264R/V269A/L279Q/V287E] [55]. Η δομή της μονομερούς μεταλλαγμένης αποE3 παρουσιάζεται στην εικόνα 9 (σε αναπαράσταση τύπου cartoon, Α,Β και χωροπληρωτική, Γ). Περιλαμβάνει τρεις δομικές περιοχές: μία αμινο-τελική που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 1-167 (περιοχή μπλε χρώματος), μία περιοχή άρθρωσης που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 168-205 (με πράσινο χρώμα) και μία καρβοξυ-τελική περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 206-299 (που παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα). Στην εικόνα 9B, η περιοχή πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα (που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 136-150) έχει χρωματιστεί κίτρινη.



Εικόνα 9. Αναπαράσταση τύπου cartoon (Α, Β) και χωροπληρωτική (Γ) της δομής της μονομερούς μεταλλαγμένης ελεύθερης λιπιδίων αποΕ3 (pdb 2L7B) [55]. Στην εικόνα 9B η περιοχή πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα (136-150 αμινοξέα) παρουσιάζεται με κίτρινο χρώμα. Οι παραπάνω εικόνες προετοιμάστηκαν με τη χρήση του PyMol 1.3 (www.pymol.org).

Η αμινο-τελική περιοχή που παρατήρησαν οι Chen et al. περιλαμβάνει ένα δεμάτι τεσσάρων ελίκων, όπως και οι δομές της απομονωμένης αμινο-τελικής περιοχής που λήφθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και NMR [50, 56]. Η περιοχή άρθρωσης περιλαμβάνει δύο έλικες και η καρβοξυ-τελική περιοχή τρεις έλικες. Στην περιοχή πρόσδεσης στον LDL- υποδοχέα, κάθε λυσίνη και αργινίνη σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και γέφυρες άλατος με αμινοξέα της αποβοξυ-τελικής περιοχής. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των δομικών περιοχών της αποΕ σταθεροποιούν την καρβοξυ-τελική περιοχή πρόσδεσης στα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων LDL (κίτρινη περιοχή στην εικόνα 9B) καλύπτεται πλήρως από την καρβοξυ-τελική περιοχή και δεν είναι διαθέσιμη για πρόσδεση (εικόνα 9Γ), όταν η αποΕ είναι ελεύθερη λιπιδίων. Επιπρόσθετα, η καρβοξυ-τελική δομική περιοχή περιλαμβάνει μία μεγάλη εκτεθημένη υδρόφοβη επιφάνεια, μέσω της οποίας πιθανώς να ξεκινά η πρόσδεση της αποΕ με διαφορετικούς προτδέτες, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (HSPG) και τα αμυλοειδή β πεπτίδια [55].

## 2.5.1 Δομή της αποΕ κατά την αλληλεπίδρασή της με λιπίδια.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της αποΕ με τα λιπίδια έχουν παρασκευαστεί συνθετικά λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος και τη στοιχειομετρία ανάλογα με τα φωσφολιπίδια που τα αποτελούν. Χαρακτηριστικά, η πρόσδεση της αποΕ σε διμυριστόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DMPC) οδηγεί στο σχηματισμό σωματιδίων που περιλαμβάνουν 4 μόρια αποΕ, ενώ τα σωματίδια αποΕ προσδεδεμένης σε διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) περιλαμβάνουν 2 μόρια αποΕ [57, 58]. Έχουν προταθεί μηχανισμοί σχετικά με τις δομικές ανακατατάξεις που υφίσταται η αποΕ κατά τη μετατροπή της από την ελεύθερη λιπιδίων στη συνδεδεμένη με λιποπρωτεϊνικά σωματίδια δομή της. Οι Peters-Libeu et al. κρυστάλλωσαν την αποΕ4 προσδεδεμένη με διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), προκειμένου να καθορίσουν πώς τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια ενεργοποιούν την περιοχή πρόσδεσης της αποΕ. Το μοντέλο ακτίνων Χ της προσδεδεμένης σε λιπίδια αποΕ4 σε ανάλυση 10Å που πρότειναν παρουσιάζει τη λιπιδιωμένη αποΕ σε δομή φουρκέτας (πεταλοειδής μορφή) με την περιοχή πρόσδεσης στον LDL-υποδοχέα να βρίσκεται στην κορυφή της φουρκέτας (εικόνα 10) [59].



Εικόνα 10. Μοντέλο φουρκέτας της αποΕ προσδεδεμένης σε DPPC. (Τροποποιημένη εικόνα από [59]).

Οι Nguyen et al. πρότειναν επίσης ένα μοντέλο πρόσδεσης της αποΕ σε σφαιρικά VLDL και HDL σωματίδια βασισμένοι σε πειράματα αλληλεπιδράσεων παρακολουθούμενων με τεχνική συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR). Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει δύο στάδια, όπου το πρώτο είναι ταχύ και αντιστρεπτό και διεξάγεται μέσω των αμφιπαθητικών α-ελίκων της αμινο- ή της καρβοξυ-τελικής περιοχής που αλληλεπιδρούν με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Κατά το δεύτερο στάδιο που είναι σχετικά αργό, η προσδεδεμένη σε «κλειστή» δομή αποΕ περιέρχεται σε «ανοιχτή» δομή, καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων περιοχών των αμφιπαθητικών α-ελίκων δίνουν τη θέση τους σε αλληλεπιδράσεις των υδρόφοβων περιοχών των ελίκων με τα λιπίδια των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων [60].

Το μοντέλο πρόσδεσης της αποΕ σε αποΕ- DPPC σωματίδια που πρότειναν οι Mahley et al. περιλαμβάνει δύο μόρια αποΕ στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που αλληλεπιδρούν μέσω της έλικας 2 της αμινο-τελικής περιοχής με την πολική επιφάνεια των κεφαλών των φωσφολιπιδίων (εικόνα 11) [29].



Εικόνα 11. Μοντέλο αποΕ- DPPC σωματιδίων έπειτα από ανάλυση με ακτίνες Χ. (Τροποποιημένη εικόνα από [29]).

Συνολικά, μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, μεταφορά ενέργειας φθορισμού με συντονισμό (FRET) και διάθλαση ακτίνων X, συγκλίνουν πως η προσδεδεμένη σε λιπίδια αποΕ αναδιπλώνεται σε δομή φουρκέτας μέσω μιας σειράς μεταβολών στη δομή της αποΕ [59, 61-63]. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται ένα μοντέλο σχηματισμού διαμόρφωσης φουρκέτας της αποΕ σε σωματίδια αποΕ-DPPC που προσομοιάζουν σε σωματίδια HDL [47]. Οι εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης που υφίσταται η αποΕ φανερώνουν τη σημαντική δομική πλαστικότητα του μορίου.



## Εικόνα 12. Μοντέλο της διαδικασίας σχηματισμού φουρκέτας της αποΕ σε σωματίδια αποΕ-DPPC [47].

Τα δεδομένα NMR της μονομερούς αποΕ [F257A/W264R/V269A/L279Q/V287E] συμφωνούν με το μοντέλο πρόσδεσης της αποΕ στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια σε μία διαδικασία δύο σταδίων [55]. Στο πρώτο στάδιο, που είναι ταχύ και αντιστρεπτό, λαμβάνει χώρα σταδιακή αποσύνδεση της καρβοξυ-τελικής περιοχής και της περιοχής άρθρωσης από την αμινο-τελική περιοχή λόγω της πρόσδεσης της αποΕ με λιπίδια. Το δεύτερο στάδιο, που είναι αντιστρεπτό, περιλαμβάνει το άνοιγμα του αμινο-τελικού δεματιού τεσσάρων ελίκων, επιτρέποντας την έκθεση της περιοχής 136-150 της έλικας 4 για πρόσδεση στους υποδοχείς LDL.

## 2.5.2 Κατάσταση «molten globule» και αποΕ

Η κατάσταση «molten globule» είναι μία διακριτή φυσική κατάσταση πρωτεϊνικών μορίων με ένα ασυνήθιστο συνδυασμό ιδιοτήτων τόσο διατεταγμένων όσο και αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών [64]. Τα φάσματα στο άπω υπεριώδες πρωτεϊνών που βρίσκονται σε κατάσταση «molten globule» είναι παρόμοια με αυτά των πρωτεϊνών σε διατεταγμένη κατάσταση, γεγονός που υποδηλώνει πως διαθέτουν ένα σημαντικό ποσοστό δευτεροταγούς δομής [64]. Συνήθως οι

πρωτεΐνες με δομή «molten globule» συσσωματώνονται και το φαινόμενο μοριακό βάρος τους υπολογίζεται με τη χρήση τεχνικών ισορροπίας καταβύθισης ή σκέδασης φωτός [64].

Οι πρωτεΐνες σε κατάσταση «molten globule» διαθέτουν ένα χαλαρά πακεταρισμένο, μη πολικό πυρήνα και εύκαμπτη, αλλά συγκροτημένη τριτοταγή δομή. Η έλλειψη συμπαγούς «πακεταρίσματος» των πλευρικών αλυσίδων συντελεί στην εμφάνιση έντονων διακυμάνσεων της μοριακής δομής των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε κατάσταση «molten globule» συγκριτικά με αυτές που βρίσκονται σε διατεταγμένη κατάσταση [64]. Οι μεγάλης κλίμακας διακυμάνσεις της μοριακής δομής τους οδηγούν στην εξωτερίκευση εσωτερικών περιοχών τους, οι οποίες τελικά καθίστανται προσβάσιμες από μόρια του διαλύτη. Μερικές μη πολικές πλευρικές αλυσίδες από τις θηλειές και τα άκρα πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μερική αποδίπλωση των περιοχών, ακόμη και σε μείωση στο μήκος της δευτεροταγούς δομής τους [64].

Πολλές γνωστές πρωτεΐνες (κυτόχρωμα c, α- λακταλβουμίνη, απομυογλοβίνη, κ.ά.) βρίσκονται σε κατάσταση «molten globule» και παίζουν σημαντικό ρόλο σε μία ευρεία ποικιλία φυσιολογικών διαδικασιών, όπως μετατόπιση κατά μήκος μεβρανών, πρόσδεση σε λιποσώματα και φωσφολιπίδια, μεταφορά πρωτεΐνών, εξωκυτταρική έκκριση, έλεγχο και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [65]. Απολιποπρωτεΐνες που ανταλλάσονται μεταξύ λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (όπως οι αποΑ-Ι, Α-ΙΙ, C-ΙΙ, αποΕ και η απολιποπρωτεΐνη των εντόμων, απολιποφορίνη ΙΙΙ) - σε αντίθεση με τις αποΒ-100 και αποΒ-48 που παραμένουν στο ίδιο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο από τη βιοσύνθεση μέχρι τον καταβολισμό τους - έχουν χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που βρίσκονται σε κατάσταση «molten globule» [47, 66]. Η θερμοδυναμική αστάθεια των διαμορφώσεων που προσλαμβάνουν οι απολιποπρωτεΐνες ή η τάση τους να σχηματίζουν ενδιάμεσα αναδίπλωσης, ενδέχεται να είναι σημαντική στην πρόσδεση λιπιδίων [47]. Έχει προταθεί πως η εσωτερική κινητικότητα των μορίων παρέχει δομική πλαστικότητα για πρόσδεση σε λιπιδικές επιφάνειες [65].

Για παράδειγμα, η απολιποφορίνη ΙΙΙ, που μοιάζει δομικά με την αποΕ, περιλαμβάνει χαμηλή δομική σταθερότητα και ευέλικτες περιοχές άρθρωσης μεταξύ των πέντε ελίκων του δεματιού της, χαρακτηριστικά που διευκολύνουν την αλλαγή διαμόρφωσης κατά την πρόσδεση λιπιδίων [47, 67]. Μεταλλάξεις που αυξάνουν τη δομική σταθερότητα της απολιποφορίνης ΙΙΙ μειώνουν την ταχύτητα αναμόρφωσης φωσφολιπιδίων και αντίστροφα, οι μεταλλάξεις που αποσταθεροποιούν τη δομή της επιταχύνουν την αναμόρφωση φωσφολιπιδίων [47, 68].

Η αποΕ υφίσταται εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωσή της κατά την πρόσδεσή της σε λιπίδια (εικόνα 12) και η παρουσία μερικώς αποδιπλωμένων καταστάσεων θα διευκόλυνε την αλλαγή διαμορφώσεων κατά τη μετάπτωση από την ελεύθερη λιπιδίων στη λιπιδιωμένη μορφή και αντίστροφα [47]. Η θερμοδυναμική αστάθεια που χαρακτηρίζει τη δομή της αποΕ4 σε συνάρτηση με την αυξημένη τάση της για συσσωμάτωση και την αυξημένη έκθεση υδρόφοβων περιοχών συγκριτικά με τις άλλες δυο ισομορφές της αποΕ, είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά που έχουν συντελέσει στο να καταταγεί μεταξύ των πρωτεϊνών που περιέρχονται από

κατάσταση «molten globule» [47, 65]. Οι Morrow et al. πρότειναν ένα μοντέλο ενδιάμεσης κατάστασης «molten globule» για την αποΕ4, σύμφωνα με το οποίο το δεμάτι τεσσάρων ελίκων της είναι μερικώς αποδιπλωμένο, οδηγώντας στη συγκρότηση μίας ελαφρώς πιο επιμήκους δομής από τις άλλες δύο ισομορφές και σε μεγαλύτερη έκθεση του υδρόφοβου πυρήνα.

Η χαρακτηριστική δομή της αποΕ4 της επιτρέπει να περιέρχεται από μερικώς αποδιπλωμένες διαμορφώσεις πιο εύκολα απ' ότι οι αποΕ3 και αποΕ2, που διαθέτουν μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα (εικόνα 13). Συγκριτικά με την αναδιπλωμένη διαμόρφωση, οι μερικώς αποδιπλωμένες διαμορφώσεις της αποΕ μπορούν να προσδεθούν με μεγαλύτερη συγγένεια ή ταχύτητα με λιπιδικά σωματίδια, όπως οι λιποπρωτεΐνες ή οι μεμβράνες λυσοσωμάτων. Οι σχετικά ευέλικτες θηλειές και ο χαλαρά πακεταρισμένος πυρήνας επιτρέπουν στις πρωτεΐνες σε κατάσταση «molten globule» να προσαρμόζονται σε μία ευρεία κλίμακα εξωτερικών συνθηκών. Επιπρόσθετα, μερικώς ή και πλήρως αποδιπλωμένες διαμορφώσεις είναι περισσότερο επιρρεπείς σε μονοπάτια καταβολισμού.

Οι πρωτεΐνες σε κατάσταση «molten globule» εμπλέκονται τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες όσο και σε λειτουργίες που προκαλούν παθολογικές καταστάσεις. Η διαφορετική ικανότητα των ισομορφών της αποΕ να περιέρχονται από την κατάσταση «molten globule» μπορεί να συντελεί και στη συσχέτισή τους με διαφορετικές για κάθε ισομορφή ασθένειες [65].



Εικόνα 13. Πιθανές διαμορφώσεις από τις οποίες περιέρχονται οι ισομορφές της αποΕ κατά τη φυσιολογική λειτουργία τους (Τροποποιημένη εικόνα από [47]).

### 2.5.3 Διαφορές στη δομή των αποΕ2, Ε3 και Ε4.

Οι τρεις ισομορφές της αποΕ, αν και διαφέρουν μόνο σε ένα ή δύο αμινοξέα μεταξύ τους, παρουσιάζουν διαφορές στη δομή τους, γεγονός που συνεπάγεται διαφοροποίηση στη λειτουργία τους και κατά συνέπεια στη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις [47].

#### 2.5.3.1 Διαφοροποίηση της δομής της αποΕ2 σε σχέση με την αποΕ3 και Ε4.

Η αποΕ3 και αποΕ4 προσδένονται σε LDL- υποδοχείς με αντίστοιχη υψηλή συγγένεια. Η αποΕ2 προσδένεται 50-100 φορές πιο ασθενώς στον LDL-υποδοχέα. Η αποΕ2 σχετίζεται με την υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ, μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, καθώς και με πρόωρη καρδιαγγειακή νόσο. Η υποκατάσταση της κυστεΐνης με αργινίνη στην αποΕ2 στην θέση 158, η οποία και διαφοροποιεί την αποΕ2 από τις άλλες δύο ισομορφές, επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσής της στον LDL-υποδοχέα, καθώς εξαλείφει τη γέφυρα άλατος μεταξύ της αργινίνης 158 και της αργινίνης 154 που εμφανίζουν τόσο η αποΕ3 όσο και η Ε4 (εικόνα 14).

Οι Dong et al. πρότειναν ένα μηχανισμό που εξηγεί τη διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης της αποΕ2 στον LDL-υποδοχέα συγκριτικά με την αποΕ3, βασισμένοι σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συνέλεξαν [69]. Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, απουσία της γέφυρας Arg158- Asp154 στην αποΕ2, σχηματίζεται μία νέα γέφυρα άλατος μεταξύ της αργινίνης 150 και του ασπαρτικού οξέος 154. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 14, η γέφυρα Arg150-Asp154 αλλάζει τη διαμόρφωση της αργινίνης 150 σε σχέση με τα άλλα βασικά αμινοξέα στην περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (κατάλοιπα 136-150), μειώνοντας την ικανότητα της αποΕ2 να αλληλεπιδρά με τον LDL- υποδοχέα [69].

Μεταλλάσοντας το ασπαρτικό οξύ 154 σε αλανίνη, εξαλείφεται η γέφυρα άλατος μεταξύ Arg150 και Asp154 και η Arg150 επανέρχεται στην κανονική της θέση, οδηγώντας σε αύξηση της δραστικότητας πρόσδεσης της μεταλλαγμένης αποΕ2 (D154A) στον LDL- υποδοχέα στα φυσιολογικά επίπεδα [69].



Εικόνα 14. Επίδραση του αμινοξέος στη θέση 158 στην ικανότητα πρόσδεσης της αποΕ στον LDL-υποδοχέα [47].

### 2.5.3.2 Διαφοροποίηση της δομής της αποΕ4 σε σχέση με την αποΕ2 και Ε3.

Ο Karl H. Weisgraber επεσήμανε με <sup>125</sup>l τις αποE2, αποE3 και αποE4, τις επώασε με πλάσμα ανθρώπου και ακολούθως ανέλυσε τα δείγματα με χρωματογραφία αγαρόζης, προκειμένου να καταγράψει τη κατανομή της κάθε ισομορφής στις διαφορετικής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες του πλάσματος [70]. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 15, η αποE4 αποτελεί συστατικό μεγάλων, πλούσιων σε τριγλυκερίδια VLDL (300-800 Å) και LDL, σε αντίθεση με τις αποE2 και αποE3 που προσδένονται σε μικρά, πλούσια σε φωσφολιπίδια HDL σωματίδια (90-100 Å) [71].



Αριθμός κλάσματος

Εικόνα 15. Κατανομή επισημασμένων με <sup>125</sup>Ι αποΕ2, αποΕ3 και αποΕ4 στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ανθρώπου. Τα σημεία που αντιστοιχούν στην ΑποΕ4 παρουσιάζονται με λευκά τετράγωνα. Τα σημεία που αντιστοιχούν στις αποΕ2 και αποΕ3 παρουσιάζονται με άσπρους και μαύρους κύκλους αντίστοιχα [70].

Οι αποΕ2 και αποΕ3, που παρουσιάζουν την ίδια προτίμηση πρόσδεσης σε HDL, διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση 158. Η ύπαρξη διαφορετικού αμινοξέος στην θέση 158 φαίνεται πως δεν είναι καθοριστική για την προτίμηση πρόσδεσης των αποΕ2 και αποΕ3 σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Ωστόσο, η αποΕ4, που διαφέρει από τις άλλες δύο ισομορφές στην θέση 112, είναι εκείνη που διαφοροποιείται στην προτίμηση πρόσδεσης σε λιποπρωτεϊνες [70].

To 1994, oi Dong et al. επιχείρησαν να εξηγήσουν αν η διαφορετική προτίμηση πρόσδεσης της αποΕ4 σε λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας σε σχέση με την αποΕ3, οφείλεται σε κάποια διαφορά στη δομή μεταξύ των δύο ισομορφών [71]. Σύγκριση των κρυσταλλικών δομών της αμινο-τελικής περιοχής των αποΕ3 και αποΕ4 υποδεικνύει ότι το αμινοξύ στην θέση 112 επηρεάζει τη διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας της αργινίνης 61. Στην εικόνα 16, παρουσιάζονται οι δομές του δεματιού τεσσάρων ελίκων των αποΕ3 και αποΕ4 με διαγράμματα κορδέλας (ribbon diagrams) [71].



Εικόνα 16. Σύγκριση της δομής των θραυσμάτων 22-kDa της αποΕ3 και αποΕ4 [71].

Στην αποΕ4, η παρουσία αργινίνης στη θέση 112 συντελεί στον προσανατολισμό της πλευρικής αλυσίδας της αργινίνης 61 μακριά από το δεμάτι τεσσάρων ελίκων, ενώ αντίθετα στην αποΕ3, που περιλαμβάνει κυστεΐνη στην θέση 112, η πλευρική αλυσίδα της αργινίνης 61 βρίσκεται θαμμένη μεταξύ των ελίκων 2 και 3 [71, 72]. Η αλλαγή αυτή στον προσανατολισμό της πλευρικής αλυσίδας φαίνεται να επιτρέπει στην αργινίνη 61 να αλληλεπιδρά με το γειτονικό γλουταμινικό οξύ 109 καθώς και με ένα όξινο αμινοξύ της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4.

Συστηματική υποκατάσταση με αλανίνη για καθένα από τα έξι όξινα αμινοξέα που περιέχονται στην καρβοξυ-τελική περιοχή, υπέδειξαν ότι το γλουταμινικό οξύ 255 είναι το αμινοξύ-κλειδί που αλληλεπιδρά με την αργινίνη 61. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, το μοντέλο που παρουσιάζει τις αλληλεπιδράσεις των περιοχών της αποΕ4 περιλαμβάνει το σχηματισμό μίας γέφυρας άλατος μεταξύ της αργινίνης 61 και του γλουταμινικού 255 (εικόνα 17) [73]. Η αλληλεπίδραση της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή στην αποΕ4 που αποδίδεται στη γέφυρα Arg61-Glu255, προτάθηκε πως συντελεί στη διαφορετική προτίμηση που εμφανίζει η αποΕ4 ως προς την προσδεσή της σε σωματίδια VLDL και LDL σε σχέση με τις αποΕ2 και αποΕ3 που αποτελούν κατά κύριο λόγο συστατικά των HDL [8].



Εικόνα 17. Μοντέλο της δομής της αποΕ3 (Α) και της αποΕ4 (Β). Η δομή της αποΕ4 είναι πιο συμπαγής λόγω της αλληλεπίδρασης της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή [8].

## 2.6 Διαφοροποίηση της ανθρώπινης αποΕ συγκριτικά με την αποΕ του ποντικού και άλλων ειδών.

Σε όλα τα είδη, εκτός από τον άνθρωπο, η αποΕ περιλαμβάνει θρεονίνη στην θέση που είναι ισοδύναμη της αργινίνης 61 [47]. Όπως προκύπτει, η ανθρώπινη αποΕ4 είναι μοναδική. Παρόλο που κάποια από τα είδη θηλαστικών περιέχουν μία ισοδύναμη αργινίνη 112, πρέπει να συγκαταλεχθούν ως προσομοιάζουσες σε αποΕ3 επειδή δεν έχουν αργινίνη στην θέση 61. Για παράδειγμα, η αποΕ μυός, που περιλαμβάνει ισοδύναμα αμινοξέα Arg112 και Glu255, δεν εμφανίζει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο περιοχών της [47].

Η αντικατάσταση μέσω γονιδιακής στόχευσης του κωδικονίου της θρεονίνης με το κωδικόνιο της αργινίνης στην αποΕ του ποντικιού εισάγει τη στενότερη αλληλεπίδραση της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή σε μοντέλο ποντικού, που καλείται «Arg61 μοντέλο ποντικού» [74]. Στο πλάσμα, η Arg61 αποΕ μυός αναπαράγει τα γνωστά μεταβολικά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης αποΕ4, όπως την προτίμηση πρόσδεσης σε VLDL και LDL (εικόνα 18), καθώς και ένα χαμηλότερο επίπεδο σταθερότητας συγκριτικά με το μοντέλο αποΕ αγρίου τύπου στα ποντίκια [47, 74].



Εικόνα 18. Α. Κατανομή της ανθρώπινης αποΕ3 και αποΕ4 σε διαφορετικής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικά σωματίδια σε πλάσμα ανθρώπου. Β. Κατανομή της αποΕ (Thr61) μυός και της μεταλλαγμένης αποΕ «Arg61» μυός (που προσομοιάζει στη δομή με την ανθρώπινη αποΕ4) σε πλάσμα ανθρώπου [74].

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## Βιοφυσικές τεχνικές για τη μελέτη δυναμικών μακρομορίων

# 3.1 Τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας των απολιποπρωτεϊνών.

Οι απολιποπρωτεΐνες είναι δυναμικά μόρια που χαρακτηρίζονται από έντονη δομική πλαστικότητα. Οι πολύπλοκες δομικές αλλαγές που υφίστανται καθώς αναδιαμορφώνονται μεταξύ «ελεύθερης λιπιδίων» και «εντός λιποπρωτεϊνών» κατάστασης είναι αλληλένδετες με τη φυσιολογική λειτουργία τους. Αλλαγή σε κάποια από τις δομικές διαμορφώσεις των απολιποπρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε «κλείδωμα» της δομής σε μία διαμόρφωση μη λειτουργική, συντελώντας στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Η μελέτη των βιοφυσικών χαρακτηριστικών των απολιποπρωτεϊνών (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων) έχει αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στη διερεύνηση της σχέσης δομής- λειτουργίας και τη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις. Η απολιποπρωτεϊνή που έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα ως προς τη δομή και τη λειτουργία της είναι η αποΑ-Ι, που αποτελεί το κύριο συστατικό των λιποπρωτεϊνών HDL (και των χυλομικρών). Έχουν διερευνηθεί οι θερμοδυναμικές και βιοφυσικές ιδιότητές της και έχει επιτευχθεί η επίλυση της δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [75-77].

Η αποΕ, κατ' αντιστοιχία προς τις υπόλοιπες απολιποπρωτεΐνες, παρουσιάζει μεγάλη δομική πλαστικότητα και περιέρχεται από πληθώρα διαφορετικών διαμορφώσεων (όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.5 και 2.5.1). Η καταγραφή «στιγμιότυπων» της δομής της με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ή κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αντικατοπτρίζει μόλις κάποιες από τις πολλές διαμορφώσεις από τις οποίες περιέρχεται το μακρομόριο κατά τη φυσιολογική του λειτουργία. Αν και τα στιγμιότυπα αυτά δεν παύουν να αποτελούν αξιόλογη συνεισφορά στην ολοκλήρωση του παζλ της δομής της αποΕ, η τάση της να ολιγομερίζεται σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM και μM, σε αντίθεση με την αποΑ-Ι, δυσχεραίνει τη λύση της συνολικής δομής της.

Η αποΕ έχει μελετηθεί δομικά με τη χρήση πολλών τεχνικών. Η δομή της αποΕ, κυρίως όταν αυτή είναι προδεδεμένη σε φωσφολιπίδια, έχει διερευνηθεί με παραμαγνητικό συντονισμό ηλεκτρονίων (EPR), ενεργειακή μεταφορά φθορισμού (FRET) και διάθλαση ακτίνων Χ [47]. Επίσης, με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, έχει λυθεί η δομή της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ [50], ενώ με φασματοσκοπία NMR έχει λυθεί η δομή μίας μεταλλαγμένης μορφής της [55] (βλ. παράγραφο 2.5).

Η μελέτη των θερμοδυναμικών και δομικών χαρακτηριστικών των τριών ισομορφών της αποΕ έχει διεξαχθεί με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού, φθορισμομετρίας, δυναμικής σκέδασης φωτός και πρόσδεσης ιχνηθετών προς μελέτη των εκτεθημένων στο διαλύτη υδρόφοβων περιοχών της αποΕ, τεχνικών που θα αναπτυχθούν στη συνέχεια. Επίσης, λιγότερο συχνά στη μελέτη της δομής της αποΕ έχει χρησιμοποιηθεί η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) [78], <sup>19</sup>F NMR [79] και πειράματα ταχύτητας καταβύθισης [80]. Κατά τη διερεύνηση της σχέσης δομής- λειτουργίας των απολιποπρωτεϊνών, μία ευρέως χρησιμοποιούμενη λειτουργική δοκιμασία είναι αυτή της αναμόρφωσης φωσφολιπιδίων [40, 80-83].

#### 3.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Ο κυκλικός διχρωισμός (CD) είναι μία φασματοσκοπική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού μίας πρωτεΐνης στο άπω υπεριώδες αντανακλά το περιεχόμενο της δευτεροταγούς δομής της. Μία από τις πιο επιτυχημένες εφαρμογές του κυκλικού διχρωισμού, ο δομικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών, εξαρτάται από την αξιοσημείωτη ευαισθησία του κυκλικού διχρωισμού στη διαμόρφωση του σκελετού των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, επειδή τα φάσματα των πρωτεϊνών στις περιοχές του άπω υπεριώδους κυριαρχούνται από  $n \rightarrow π^*$  και  $π \rightarrow π^*$  ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις των αμιδικών ομάδων και επηρεάζονται από τη γεωμετρία του πολυπεπτιδικού σκελετού, αντικατοπτρίζουν τους διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής των μορίων (εικόνα 19) [84]. Οι Holzwarth et al. απέδωσαν την αρνητική ζώνη που παρουσιάζεται στα 222nm στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού πολυμερών με δομή α-έλικας στην αμιδική μετάπτωση  $n \rightarrow π^*$  [85]. Την αρνητική ζώνη στα 208nm και τη θετική στα 190nm, τις απέδωσαν στις παράλληλα και κάθετα πολωμένες αμιδικές μεταπτώσεις πολωμένες αυταγοισμού σια 208nm και τη θετική στα 190nm, τις απέδωσαν στις παράλληλα και κάθετα πολωμένες αμιδικές μεταπτώσεις πον πολυμερών με δομή α-έλικας



## Εικόνα 19. Διάγραμμα του πεπτιδικού δεσμού που δείχνει τον προσανατολισμό των διπόλων μετάπτωσης (ως βέλη) για τις μεταπτώσεις n→π\* και π→π\* [84].

Το σήμα κυκλικού διχρωισμού που καταγράφεται πειραματικά (σε μονάδες deg) μετατρέπεται σε μοριακή ελλειπτικότητα ανά κατάλοιπο, σύμφωνα με τον τύπο:

[θ]<sub>λ</sub> = Σήμα<sub>CD</sub>·MB/ 10·d·c·(αριθμός αμινοξέων πρωτεΐνης)(1),

όπου λ, το μήκος κύματος (σε nm), d, η οπτική διαδρομή (σε cm) και c, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα (σε mg/mL).

Ποικίλες εμπειρικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί προς ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού πρωτεϊνών για ποσοτικό υπολογισμό του περιεχομένου της δευτεροταγούς δομής τους [87]. Η βασική αρχή στην ανάλυση των πρωτεϊνικών φασμάτων CD που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό των κλασμάτων δευτεροταγούς δομής είναι πως το φάσμα CD (C<sub>λ</sub>) μπορεί να εκφραστεί ως γραμμικός συνδυασμός των συστατικών φασμάτων διαφορετικής δευτεροταγούς δομής (k), B<sub>kλ</sub>, όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση:

 $C_{\lambda}=\Sigma f_k B_{k\lambda}$  ,

όπου f<sub>k</sub> είναι το κλάσμα της δευτεροταγούς δομής k [87]. Στην εικόνα 20 παρουσίαζονται φάσματα κυκλικού διχρωισμού πολυ-L-λυσίνης σε διαμορφώσεις 100% α-έλικας (καμπύλη 1), β-φύλλου (καμπύλη 2) και τυχαίου σπειράματος (καμπύλη 3) [86].



Εικόνα 20. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού πολυ-L-λυσίνης. Καμπύλες: 1, α-έλικα, 2, β-φύλλο, 3, τυχαίο σπείραμα.

Τυπικά, το συμβατικό εύρος μήκους κύματος όπου καταγράφεται το σήμα κυκλικού διχρωισμού βρίσκεται μεταξύ 190 και 300nm. Πρόσφατα, η χρήση της ακτινοβολίας του synchrontron ως πηγής έντονης ακτινοβολίας οδήγησε στην ανάπτυξη της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού ακτινοβολίας του synchrontron (SRCD), που μπορεί να λάβει φάσματα σε εύρος ακόμη μικρότερων μηκών κύματος, μεταξύ 160 και 190nm [88].

Οι μέθοδοι εμπειρικής ανάλυσης φασμάτων κυκλικού διχρωισμού χρησιμοποιούν μία βάση αναφορών που αποτελείται από φάσματα πρωτεϊνών των οποίων οι κρυσταλλικές δομές (και συνεπώς οι δευτεροταγείς δομές) είναι γνωστές. Υπολογίζεται το ποσοστό συνεισφοράς κάθε μορφής δευτεροταγούς δομής στο συνολικό φάσμα που λαμβάνεται πειραματικά. Το αποτέλεσμα περιλαμβάνει μία λίστα ποσοστών δευτεροταγών δομών και ενός φάσματος που έχει υπολογιστεί και μπορεί να συγκριθεί με το πειραματικό φάσμα προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα της ανάλυσης των δεδομένων [88]. Ο αριθμός των διαφορετικών τύπων δευτεροταγούς δομής που μπορούν να αναλυθούν εξαρτάται τόσο από το διαθέσιμο εύρος μηκών κύματος των φασμάτων (φάσματα που έχουν ληφθεί σε χαμηλότερα μήκη κύματος περιλαμβάνουν μεγαλύτερο ποσοστό πληροφοριών και συνεπώς μπορούν να αποσυνελιχθούν πιο αξιόπιστα) και από το εύρος των τύπων δευτεροταγούς δομής που περιλαμβάνονται στις πρωτεΐνες που αποτελούν τη βάση αναφοράς [88].

Η αποσυνέλιξη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού μπορεί να διεξαχθεί μέσω του διακομιστή «DICROWEB». Ο διακομιστής αυτός παρέχει μία φιλική προς το χρήστη πλατφόρμα που επιτρέπει τη χρήση μίας ποικιλίας γνωστών αλγορίθμων και βάσεων αναφοράς προς διευκόλυνση της ανάλυσης των φασματοσκοπικών δεδομένων κυκλικού διχρωισμού. Το «DICROWEB» υποστηρίζει πέντε διαθέσιμους για ανάλυση αλγορίθμους: τον SELCON3, CONTILL, CDSSTR, NARSLC και τον K2d [88]. Μετά την αποσυνέλιξη των φασμάτων προσδιορίζεται η παράμετρος NRMSD (Normalized Root-Mean-Square Deviation) που παρέχει πληροφορίες για την ανταπόκριση των υπολογισθέντων φασμάτων σε αυτά που λήφθηκαν πειραματικά, προκειμένου να κριθεί η ποιότητα του αποτελέσματος της αποσυνέλιξης. Μία χαμηλή τιμή NRMSD είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής συνθήκη για να καταλήξουμε πως μία ανάλυση παρήγαγε καλό αποτέλεσμα. Ωστόσο, αν η τιμή NRMSD είναι υψηλή, (μεγαλύτερη από 0,1) η υπολογισθείσα δευτεροταγής δομή δεν ανταποκρίνεται στην πραγματική [88].

Στο πεδίο των απολιποπρωτεϊνών είναι ευρέως διαδεδομένη η χρήση των ακόλουθων εξισώσεων:

%α-helix<sub>208nm</sub>=([Θ]<sub>208</sub>-4000)/(33000-4000) × 100 (3) (4)

 $\alpha$ -helix<sub>222nm</sub>=([ $\Theta$ ]<sub>222</sub>+3000)/(36000+3000) × 100

για τον υπολογισμό του ποσοστού ελικότητας στα 208 και 222nm αντίστοιχα [89-92]. Οι παραπάνω εξισώσεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ελικότητας πρωτεϊνών που στη δευτεροταγή δομή τους περιλαμβάνουν κυρίως α- έλικα και δεν περιλαμβάνουν β-φύλλο.

## 3.2.1 Στοιχεία δευτεροταγούς δομής της αποΕ

Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της αποΕ3 στο άπω υπεριώδες παρουσιάζεται στην εικόνα 21 σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Το φάσμα της αποΕ3 (όταν είναι πλήρως διατεταγμένη, 15°C, συνεχής γραμμή) είναι χαρακτηριστικό της δομής α-έλικας και περιλαμβάνει δύο αρνητικές κορυφές στα 208 και 222nm, καθώς και μία θετική κορυφή περίπου στα 190nm (κατ' αντιστοιχία με το φάσμα Ι της πολυ-L-λυσίνης στην εικόνα 20). Καθώς η πρωτεΐνη θερμαίνεται, η δομή της αποδιατάσσεται και παρατηρείται μείωση της περιεχόμενης ελικότητας (φάσματα σε θερμοκρασία 35, 55 και 80°C, εικόνα 21).



Εικόνα 21. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αποΕ3 (από πλάσμα ανθρώπου) σε διαφορετικές θερμοκρασίες [93].

## 3.2.2 Θερμική αποδιάταξη της αποΕ με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού

Η θερμοδυναμική σταθερότητα μίας πρωτεΐνης, καθώς και η επίδραση της αντικατάστασης ενός αμινοξέος σε αυτή, μπορούν να μελετηθούν με την καταγραφή του σήματος κυκλικού διχρωισμού ως συνάρτησης της θερμοκρασίας [94]. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, η ελλειπτικότητα των απολιποπρωτεϊνών στα 222nm ελαττώνεται, υποδεικνύοντας μείωση της περιεχόμενης ελικότητας [93].

Οι Morrow et al., επιβεβαίωσαν πως η αποΕ2 είναι η πιο σταθερή ως προς θερμική αποδιάταξη μεταξύ των τριών ισομορφών της αποΕ, ενώ η αποΕ4 η πιο ασταθής, υπολογίζοντας πως οι θερμοκρασίες μετάπτωσης για τις αποΕ2, αποΕ3 και αποΕ4 είναι 52, 46 και 45°C αντίστοιχα (εικόνα 22A) [92]. Οι Morrow et al., υπολόγισαν τις θερμοκρασίες μετάπτωσης της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ2 (63°C), της αποΕ3 (57°C) και της αποΕ4 (50°C) καθώς και της καρβοξυτελικής περιοχής της αποΕ (56°C) [92]. Όπως, προκύπτει η αμινο-τελική περιοχή κάθε ισομορφής είναι σταθερότερη από τη συνολική δομή της αντίστοιχης αποΕ. Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των τριών ισομορφών της αποΕ, των αμινο-τελικών περιοχών τους και της καρβοξυ-τελικής περιοχής [92].



Εικόνα 22. Θερμική αποδιάταξη της αποΕ2, αποΕ3, αποΕ4 (Α), των αμινο-τελικών περιοχών τους (Β) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ [92].

Οι Tanaka et al., επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις των Morrow et al., καταγράφοντας ακριβώς την ίδια θερμοκρασία μετάπτωσης για την αποΕ4 και την αμινο-τελική περιοχής της [95]. Η αυξημένη σταθερότητα της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4, έναντι της συνολικής δομής της επιβεβαιώνεται από την αυξημένη τιμή της μεταβολής ενθαλπίας που υπολόγισαν για την αμινο-τελική περιοχή, 25kcal/moL, έναντι της τιμής των 20kcal/moL που υπολόγισαν για την αποΕ4 [95]. Παρατήρησαν επίσης, πως η αμινο-τελική περιοχή της αποΕ4 υφίσταται περισσότερο συνεργιστική θερμική αποδιάταξη σε σχέση με την αποΕ4, όπως φανερώνει ο αυξημένος συντελεστής συνεργιστικότητας της πρώτης (4,9) έναντι της δεύτερης (3,7) [95]. Η σταδιακή αποκοπή τμημάτων της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4 (των περιοχών 273-299 και 261-299) οδήγησε σε αύξηση της θερμοκρασίας μετάπτωσης, του συντελεστή συνεργιστικότητας και της μεταβολής στην ενθαλπία των καρβοξυ-τελικών θραυσμάτων σε σχέση με τη συνολική δομή της αποΕ4. Η παραπάνω παρατήρηση φανερώνει πως η αποκοπή της πρατηρήσεις τως παρείος το αυξηρογιστικός της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4.

Οι Chroni et al. μελέτησαν επίσης την επίδραση της αποκοπής σταδιακά αυξανόμενων περιοχών της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4 στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου, αποκόπτοντας ακόμη μεγαλύτερα τμήματα της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4 σε σχέση με τους Tanaka et al. [96]. Απαλοιφή των περιοχών 260-299, 230-299, 203-299 και 186-299 οδήγησαν σε αύξηση της θερμοκρασίας μετάπτωσης των θραυσμάτων, υποδεικνύοντας πως η καβοξυ-τελική περιοχή παίζει καίριο ρόλο στη δομική ακεραιότητα της αποΕ4 κατά τη θερμική αποδιάταξη. Ωστόσο η απαλοιφή της περιοχής 166-299 οδήγησε σε μείωση της θερμοκρασίας μεταπτωσης των θραυσμάτων, υποδεικνύοντας πως η καβοξυ-τελική περιοχή παίζει καίριο ρόλο στη δομική ακεραιότητα της αποΕ4 κατά τη θερμική αποδιάταξη. Ωστόσο η απαλοιφή της περιοχής 166-299 οδήγησε σε μείωση της θερμοκρασίας μετάπτωσης σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά της Tm της συνολικής δομής της αποΕ4, πιθανά λόγω αποσταθεροποίησης της αμινο-τελικής περιοχής [96]. Όλα τα θραύσματα που μελετήθηκαν, ακόμη και εκείνο στο οποίο υπολειπόταν η περιοχή 166-299, υπέστηκαν πιο συνεργιστική θερμική αποδιάταξη, όπως φανερώνει ο συντελεστής συνεργιστικότητας που βρέθηκε να αυξάνεται σχεδόν γραμμικά όσο μεγαλύτερο μέρος της καρβοξυ-τελικής περιοχής υπολειπόταν [96]. Τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν πως η συνολική δομή της καρβοξυ-τελικής περιοχής της

Οι Clement-Collin et al. μελέτησαν την αντιστρεπτότητα της θερμικής αποδιάταξης στη δευτεροταγή δομή της αποΕ, δηλαδή την ικανότητα της αποΕ να ανακτά τη δευτεροταγή της δομή έπειτα από την απομάκρυνση του αιτίου που προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή της (εδώ, την αύξηση της θερμοκρασίας). Οι Clement-Collin et al. μελέτησαν την αποδιάταξη της αποΕ αυξάνοντας την θερμοκρασία από τους 15 μέχρι τους 80°C, την επαναδιάταξη του ίδιου δείγματος από 80 μέχρι 15°C και τέλος, την επαν- αποδιάταξή του από τους 15 στους 80°C. Η αμινο- και καρβοξυ-τελική περιοχή αφού αποδιαταχθούν και επαναδιαταχθούν από τους 80 στους 15°C (με ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας 1°C/min) επανέρχονται στην αρχική ελλειπτικότητα στα 222nm κατά ένα ποσοστό 80-85% (εικόνα 23).



Εικόνα 23. Καταγραφή της πορείας αποδιάταξης από 15 μέχρι 80°C (συνεχής γραμμή) και επαναδιάταξης από τους 80 στους 15°C (διακεκομμένη γραμμή) της αμινο-τελικής περιοχής ανασυνδυασμένης αποΕ3 (Α) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής αποΕ3 του πλάσματος (Β) [93].

Κατά τη μείωση της θερμοκρασίας από τους 80 στους 15°C, οι καμπύλες αποδιάταξης των αμινο- και καρβοξυ-τελικών περιοχών παρουσιάζουν μία υστέρηση, υποδεικνύοντας μειωμένη ταχύτητα διάταξης και/ ή κάποια μη αντιστρεπτή μεταβολή στο δομή της απολιποπρωτεΐνης σε αυξημένες θερμοκρασίες, που έχει επίσης παρατηρηθεί στις αποΑ-Ι και αποC-Ι [92]. Αν και η

θερμική μετάπτωση των αμινο- και καρβοξυ-τελικών περιοχών της αποΕ3 είναι αντιστρεπτή, η θερμική αποδιάταξη της συνολικής δομής των τριών ισομορφών της αποΕ, ανασυνδυασμένης και μη, δεν είναι. Ωστόσο η θερμική αποδιάταξη της αποΕ μπορεί να αναλυθεί θερμοδυναμικά, καθώς οι παρατηρούμενες μη αντιστρεπτές μεταβολές είναι σχετικά αργές σε σχέση με την θερμικά επαγόμενη αποδιάταξη. Μετά την επαναδιάταξη, τα φάσματα των αμινο- και καρβοξυτελικών περιοχών της αποΕ3 στο άπω υπεριώδες είναι χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που έχουν δομή α-έλικας και μοιάζουν με τα αρχικά φάσματα που λήφθηκαν στους 15°C.

### 3.3 Φασματοσκοπία φθορισμού

Προκειμένου να καταγραφούν οι δομικές μεταπτώσεις ενός μακρομορίου απαιτείται το σήμα της χρησιμοποιούμενης φασματοσκοπικής μεθόδου να μεταβάλλεται διακριτά μεταξύ δύο ή περισσότερων μακροσκοπικών καταστάσεων. Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι πολύ χρήσιμη για τέτοιες μελέτες επειδή το σήμα φθορισμού είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο μικροπεριβάλλον του φθοροφόρου. Ο φθορισμός είναι μία πολυ-διάστατη μέθοδος που επιτρέπει να λαμβάνουν χώρα μετρήσεις συναρτήσει του μήκους κύματος, του χρόνου, των συνθηκών του διαλύτη ή της γωνίας πόλωσης. Ο πολυ-διάστατος χαρακτήρας του φθορισμού καθιστά πιθανό κάποιο από τα παραπάνω σήματα να είναι ευαίσθητο στη διαμόρφωση του μακρομορίου.

Μεταξύ των μεταβολών στο σήμα φθορισμού που μπορούν να καταγραφούν είναι οι ακόλουθες: η ένταση φθορισμού (σε καθορισμένα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής), κβαντική απόδοση, μέγιστο εκπομπής, ανισοτροπία φθορισμού, ημιζωή φθορισμού και άλλα. Καθένα από αυτά τα σήματα έχει χρησιμοποιηθεί από ερευνητές προς καταγραφή των μεταπτώσεων αποδιάταξης πρωτεϊνών. Κρίσιμο στη χρήση καθενός από τα παραπάνω σήματα είναι το κατά πόσο το σήμα είναι αναλογικό των μικροκαταστάσεων του πληθυσμού. Θα πρέπει το σήμα, S, να σχετίζεται με το γραμμομοριακό κλάσμα των μορίων που βρίσκονται στην μικροκατάσταση i, όπως δείχνει η εξίσωση:

### $S=\Sigma(x_i \cdot s_i)$

(5)

και να μπορεί να συσχετιστεί με τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά των μεταπτώσεων μοντέλων και εξισώσεων. Άλλα σήματα φθορισμού- μεταξύ των οποίων η ανισοτροπία εκπομπής και ο μέσος όρος ημιζωής φθορισμού- δεν ακολουθούν γραμμικά το γραμμομοριακό κλάσμα των μακροκαταστάσεων, αν και πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει αυτά τα σήματα για να καταγράψουν την αποδιάταξη πρωτεϊνών.

Μεταπτώσεις απορρόφησης και φθορισμού λαμβάνουν χώρα σε κλίμακα φεμτοδευτερολέπτων (10<sup>-15</sup>s) και νανο-δευτερολέπτων (10<sup>-9</sup>s) αντίστοιχα. Καθώς οι μακροσκοπικές αλλαγές διαμορφώσεων των πρωτεϊνών απαιτούν σαφώς περισσότερο χρόνο για να διεξαχθούν, δεν καταγράφεται ο δυναμικός μέσος όρος των σημάτων από τις διάφορες μακροκαταστάσεις. Επίσης, η φθορισμομετρία είναι μία πολύ βολική και προσαρμόσιμη μέθοδος (είσοδος- έξοδος δέσμης φωτός) για πολλούς θαλάμους δειγμάτων, τύπους ή σχεδιασμούς πειραμάτων. Μία από τις πρακτικές χρήσεις των φθορισμομετρικών τεχνικών είναι η απόκτηση θερμοδυναμικών και κινητικών πληροφοριών σχετικών με τις μεταπτώσεις των μακρομορίων [97]. Η ευαισθησία του φθορισμού επιτρέπει οι μελέτες να εφαρμόζονται σε συγκεντρώσεις μΜ (ή και χαμηλότερες), γεγονός που μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα βιομακρομορίου καθώς και τα προβλήματα που σχετίζονται με συσσωμάτωση και δυσδιαλυτότητα [97].

Ένας περιορισμός στη φθορισμομετρία είναι πως αρκετές αλλαγές στο σήμα φθορισμού δεν μπορούν πάντα να συσχετιστούν με μοριακές λεπτομέρειες. Ωστόσο, από φθορισμομετρικές μελέτες μπορούν να ληφθούν θερμοδυναμικές (δεδομένου πως μία μετάπτωση είναι αντιστρεπτή) και κινητικές πληροφορίες. Σε μελέτες πρωτεϊνών, οι φθοροφόρες ομάδες μπορεί να είναι ενδογενείς (θρυπτοφάνη, τυροσίνη, συνένζυμα) ή εξωγενείς (προσδεδεμένη dansyl ομάδα, φλουορεσκεΐνη, πυρένιο). Τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης είναι πολύ αξιόλογοι ιχνηθέτες, καθώς ο ινδολικός δακτύλιος είναι πολύ ευαίσθητος σε μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον του [97]. Επίσης, το γεγονός της παρουσίας λίγων καταλοίπων θρυπτοφάνης σε μία πρωτεΐνη, καθιστά ευκολότερη την ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων.

#### 3.3.1 Χημική αποδιάταξη της αποΕ

Κατά τη χημική αποδιάταξη, η πρωτεΐνη χάνει τα στοιχεία της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αποδιατάκτη, μιας ουσίας που δρα αποσταθεροποιητικά για τη λειτουργική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Οι χημικοί αποδιατάκτες συμμετέχουν στη στιβάδα διαλύτωσης όλων των πρωτεϊνικών δομικών στοιχείων που είναι εκτεθημένα στο διαλύτη. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι αποδιατάκτες είναι η υδροχλωρική γουανιδίνη και η ουρία.

Η χημική αποδιάταξη της αποΕ μπορεί να διεξαχθεί φθορισμομετρικά με διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις προκειμένου να ληφθεί ένα χαρακτηριστικό γράφημα που να περιλαμβάνει στον άξονα των y, το κλάσμα της αποΕ (σε εκατοστιαίο ποσοστό ή δεκαδικό κλάσμα) που βρίσκεται σε πλήρως διατεταγμένη ή αποδιατεταγμένη κατάσταση και στον άξονα των x, τη συγκέντρωση του αποδιατάκτη (σε μονάδες Μ). Η χημική μετουσίωση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με επώαση ισομοριακών διαλυμάτων αποΕ με αποδιατάκτη, σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα διαλύματα αφήνονται παρουσία ουρίας ή υδροχλωρικής γουανιδίνης όλη τη νύχτα υπό ψύξη (4°C) προς αποδιάταξη και αποκατάσταση της ισορροπίας των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης. Την επόμενη μέρα, τα πρωτεϊνικά δείγματα εισάγονται σε κυψελίδα εντός του φθορισμομέτρου και καταγράφεται κάποιο από τα παρακάτω σήματα: η ένταση φθορισμού του κάθε δείγματος σε ορισμένο μήκος κύματος (335nm [95] ή 340nm [96]), το μήκος κύματος στο οποίο αντιστοιχεί η μέγιστη ένταση φθορισμού σε φάσμα που λαμβάνεται μεταξύ 300-400nm, έπειτα από διέγερση στα 295nm [93, 98] ή το μέσο μήκος κύματος εκπομπής [92]. Εναλλακτικά, το πείραμα χημικής αποδιάταξης μπορεί να διεξαχθεί με καταγραφή του σήματος φθορισμού κατά την τιτλοδότηση διαλύματος αποΕ με πυκνό διάλυμα αποδιατάκτη, έπειτα από ανάδευση και επώαση του δείγματος στο σκοτάδι για 2min [96]. Τα

2min αποτελούν επαρκές χρονικό διάστημα για την αποκατάσταση της ισορροπίας στο διάλυμα της αποδιατασσόμενης αποΕ, όπως υποδεικνύεται από το γεγονός πως η διεξαγωγή του πειράματος με ή χωρίς πολύωρη επώαση παρουσία του αποδιατάκτη, οδηγεί σε αντίστοιχα αποτελέσματα.

Η χημική αποδιάταξη της αποΕ έχει μελετηθεί όχι μόνο φθορισμομετρικά, αλλά και με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού, όπου καταγράφεται το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 222nm για σειρά διαλυμάτων αποΕ απουσία ή παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης αποδιατάκτη. Η χρήση φθορισμομετρίας κατά τη χημική αποδιάταξη της αποΕ επιτρέπει τη μελέτη των αλλαγών που υφίσταται η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης [92]. Κατά την αποδιάταξη καταγράφεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός από τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης, τα οποία αλλάζουν περιβάλλον, καθώς η πρωτεΐνη υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωσή της λόγω της επίδρασης του αποδιατάκτη στη σφαίρα διαλύτωσης της αποΕ. Η μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού (ή η αύξηση του μήκους κύματος, «red shift») κατά την αποδιάταξη της αποΕ αντιστοιχεί στην απόσβεση του φθορισμού που εκπέμπουν τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης καθώς περιέρχονται από το υδρόφοβο εσωτερικό της πρωτεΐνης στο υδρόφιλο περιβάλλον του διαλύτη. Η χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού κατά τη χημική αποδιάταξη της αποΕ επιτρέπει τη μελέτη αλλαγών στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης [92]. Η μείωση της ελλειπτικότητας της αποΕ στα 222nm καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του αποδιατάκτη αντιστοιχεί στην απώλεια του περιεχόμενου ποσοστού α- έλικας της δομής της αποΕ λόγω της επίδρασης του αποδιατάκτη. Συνεπώς, όταν η καταγραφή του μεταβαλλόμενου σήματος κατά χημική αποδιάταξη της αποΕ διεξάγεται με κυκλικό διχρωισμό ή φθορισμομετρία, μελετώνται οι επαγόμενες αλλαγές στη δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή αντίστοιχα [92]. Όταν μία πρωτεΐνη αποδιατάσσεται συνεργιστικά, οι καμπύλες αποδιάταξης που λαμβάνονται από τη χρήση των δύο παραπάνω τεχνικών αναμένεται να συμπίπτουν [92, 99].

Οι Morrow et al. μελέτησαν τη χημική αποδιάταξη των τριών ισομορφών της αποΕ χρησιμοποιώντας τόσο φθορισμομετρία όσο και φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού [92]. Παρατήρησαν σχετικά μικρή αύξηση στο μέσο μήκος κύματος εκπομπής κατά την αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ από 0 μέχρι 5Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης. Η μικρή αυτή αλλαγή στο μέσο μήκος κύματος εκπομπής υποδεικνύει πως τουλάχιστον κάποια κατάλοιπα θρυπτοφάνης πρέπει να βρίσκονταν ήδη σε πολικό περιβάλλον ενώ η πρωτεΐνη ήταν διατεταγμένη [92]. Οι καμπύλες αποδιάταξης των αμινο-τελικών περιοχών των τριών ισομορφών της αποΕ που καταγράφηκαν με φθορισμομετρία δεν διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις αντίστοιχες που καταγράφηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, υποδηλώνοντας την παρουσία ενδιάμεσης ή ενδιαμέσων καταστάσεων στην αποΕ [92]. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί στην παραπάνω παρατήρηση σχετίζεται με τη θέση των καταλοίπων θρυπτοφάνης στην αμινο-τελική περιοχή της αποΕ (αμινοξέα 20, 26, 34 και 39). Τα αμινοξέα θρυπτοφάνης που βρίσκονται στις θέσεις 26, 34 και 39, περιλαμβάνονται στην έλικα 1. Η θρυπτοφάνη στη θέση 20 εντοπίζεται κοντά στην έλικα 1, σε μία ευέλικτη περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο, που η δομή της δεν έχει λυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Συνεπώς, με τη χρήση φθορισμομετρίας, η χημική αποδιάταξη δίνει πληροφορίες για τις αλλαγές διαμόρφωσης που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της έλικας 1, γεγονός που εξηγεί την απουσία διαφοροποίησης στις καμπύλες αποδιάταξης μεταξύ των τριών ισομορφών, των οποίων η διαφοροποίηση εντοπίζεται στις έλικες 3 και 4 [92].

Τα μέλη της ίδιας ερευνητικής ομάδας παρατήρησαν πως η συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης στην οποία έλαβε χώρα η μετάπτωση των αμινο-τελικών περιοχών της αποΕ ήταν μεγαλύτερη κατά τη χημική αποδιάταξη που μελετήθηκε φθορισμομετρικά έναντι αυτής που μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού [92]. Στην προσπάθεια να εξηγηθεί η παραπάνω διαφορά, οι Morrow et al. εστίασαν το ενδιαφέρον τους στον προτεινόμενο μηχανισμό αλλαγής της δομής της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ κατά τη λιπιδίωσή της. Μελέτες σχετικές με το άνοιγμα του δεματιού τεσσάρων ελίκων της αποΕ κατά την πρόσδεσή της σε λιπίδια υποδεικνύουν πως η στενότερη αλληλεπίδραση της έλικας 3 με την έλικα 4 προηγείται του «ζευγαρώματος» της έλικας 1 με την έλικα 2 κατά το σχηματισμό δομής φουρκέτας (εικόνες 11 και 12, παράγραφος 2.4.1) [92, 100, 101]. Το γεγονός πως το «ζευγάρωμα» των ελίκων 1 και 2- και συνεπώς οι αλλαγές διαμορφώσεων στο περιβάλλον της έλικας 1 που καταγράφονται φθορισμομετρικά, λαμβάνουν χώρα μετά το «ζευγάρωμα» των ελίκων 3 και 4, μπορεί να σχετίζεται με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης που απαιτείται για την αποδιάταξη της αποΕ, όταν αυτή μελετάται φθορισμομετρικά σε σχέση με τη μελέτη της με φασματισκοπία κυκλικού διχρωισμού [92]. Οι Morrow et al. υπολόγισαν το % ποσοστό α-έλικας που περιλαμβάνουν οι αμινο-τελικές περιοχές της αποΕ σε συγκέντρωση 3Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, που αντιστοιχεί στο 50% της μετάπτωσης όπως καταγράφηκε φθορισμομετρικά. Πράγματι σε συγκέντρωση 3Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, η αμινο-τελική περιοχή περιελάμβανε ελικότητα (~40%), δηλαδή μικρότερη από το 50% της ελικότητας που είχε στη διατεταγμένη κατάσταση [92].

Οι Clement-Collin et al. μελέτησαν φθορισμομετρικά τη χημική αποδιάταξη των ισομορφών της αποΕ καταγράφοντας το μήκος κύματος στο οποίο αντιστοιχεί η μέγιστη ένταση εκπεμπόμενου φθορισμού (λ<sub>max</sub>) έπειτα από διέγερση του δείγματος στα 295nm. Παρατήρησαν δύο διακριτές μεταπτώσεις για καθεμία από τις ανασυνδυασμένες ισομορφές της αποΕ, αντίστοιχες με αυτές της αποΕ3 του πλάσματος [93, 102]. Τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης για την αποΕ μπορούν να προσομοιωθούν ικανοποιητικά σε σύστημα τριών καταστάσεων:

### N⇔I↔U

(όπου Ν, η διατεταγμένη, Ι, η ενδιάμεση και U, η αποδιατεταγμένη κατάσταση πρωτεΐνης).

Από την προσαρμογή σε μοντέλο τριών καταστάσεων υπολογίστηκε η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs μεταξύ διατεταγμένης και ενδιάμεσης κατάστασης, ΔG<sub>N,I</sub>, μεταξύ διατεταγμένης και αποδιατεταγμένης, ΔG<sub>N,U</sub> και μεταξύ ενδιάμεσης και αποδιατεταγμένης, ΔG<sub>I,U</sub> [93]. Η πρώτη μετάπτωση, μεταξύ 0 και 1,5 M υδροχλωρικής γουανιδίνης, αντιστοιχεί στην

αποδιάταξη της καρβοξυ-τελικής περιοχής και η δεύτερη μετάπτωση, μεταξύ 1 και 5 Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, αντιστοιχεί στην αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ [93]. Συνεπώς η ΔG<sub>N,I</sub> εκφράζει τη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs κατά την αποδιάταξη της καρβοξυ-τελικής περιοχής και η ΔG<sub>I,U</sub> εκφράζει το ενεργειακό κόστος κατά την αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής.

Στην εικόνα 24, παρουσιάζονται οι καμπύλες αποδιάταξης που προέκυψαν από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο τριών καταστάσεων. Ο άξονας των y περιλαμβάνει το δεκαδικό κλάσμα της αποδιατεταγμένης κατάστασης της αποΕ και ο άξονας των x, το γινόμενο της σταθεράς k (που ισούται με 0,8 όταν η συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης εκφράζεται σε M) επί τη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης σε M.



Εικόνα 24. Καμπύλες χημικής αποδιάταξης (συνεχείς γραμμές) της αποΕ2 (Α), αποΕ3 (Β) και αποΕ4 (C) έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων (μαύρα κυκλικά σημεία) σε μοντέλο τριών καταστάσεων (Τροποποιημένη εικόνα από [93]).

Η σταθερότητα της αποΕ2 ισομορφής ( $\Delta G_{N,U}$ =15,4 kcal/mol), καθώς και της αμινο-τελικής περιοχής της ( $\Delta G_{I,U}$ =13,6 kcal/mol), βρέθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες σε σχέση με τη σταθερότητα των άλλων δύο ισομορφών ( $\Delta G_{N,U}$  =3=10,8 kcal/mol και  $\Delta G_{N,U}$  =4=8,9 kcal/mol) και

των αμινο-τελικών περιοχών τους αντίστοιχα (ΔG<sub>I,U E3</sub>=8.9 kcal/mol και ΔG<sub>I,U E4</sub>=7,4 kcal/mol) [93]. Η μεγάλη σταθερότητα της αποΕ2 δεν οφείλεται στη σταθερότητα της καρβοξυ-τελικής, αλλά στην αυξημένη σταθερότητα της αμινο-τελικής περιοχής της. Οι καρβοξυ-τελικές περιοχές καθεμιάς ισομορφής είναι πολύ ασταθέστερες ως προς χημική αποδιάταξη σε σχέση με τις αμινο-τελικές. Η συνολική δομή της αποΕ4, καθώς και η αμινο- και η καρβοξυ-τελική περιοχή της, είναι πιο ασταθείς από τις άλλες δύο ισομορφές, τόσο όσον αφορά τη συνολική δομή, αλλά και τις επιμέρους περιοχές [93].

Οι Tanaka et al. μελέτησαν φθορισμομετρικά τη χημική αποδιάταξη της αποΕ4, καταγράφοντας την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού στα 335nm συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης υδροχλωρικής γουανιδίνης [95]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, οι καμπύλες αποδιάταξης των θραυσμάτων της αποΕ4 στα οποία υπολείπονται οι περιοχές 273-299 και 261-299 δεν βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορά σε σχέση με τις καμπύλες αποδιάταξης της αμινο-τελικής περιοχής (1-191), υποδεικνύοντας πως η επίδραση των καταλοίπων της περιοχής 192-272 στη δομική σταθερότητα θραυσμάτων της αποΕ4 που δεν περιλαμβάνουν καρβοξυτελικές περιοχές είναι αμελητέα [95]. Το γεγονός πως τα αμινοξέα 192-272 δεν συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα των καρβοξυτελικών θραυσμάτων υποδηλώνει πως η παραπάνω περιοχή έχει κυρίως δομή τυχαίου σπειράματος [95].



Εικόνα 25. Χημική αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής (λευκά τρίγωνα, Δ), της καρβοξυτελικής περιοχής (λευκοί κύκλοι), της συνολικής δομής της αποΕ4 (μαύρα τρίγωνα) και των θραυσμάτων της αποΕ4 που υπολείπονται της περιοχής 273-299 (μαύροι κύκλοι) και 261-299 (λευκά τρίγωνα,∇) [95].

Προκειμένου να μελετηθεί η δομική οργάνωση της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4, έλαβε χώρα χημική αποδιάταξη μεταλλάξεων της αποΕ4 που περιελάμβαναν μόνο ένα κατάλοιπο θρυπτοφάνης στη θέση 264 [95]. Από τα 7 κατάλοιπα θρυπτοφάνης που περιλαμβάνονται στη δομή της αποΕ4 (στις θέσεις 20, 26, 34 και 39 στην αμινο-τελική περιοχή, στη θέση 210 στην περιοχή άρθρωσης, και στις θέσεις 264 και 276 στην καρβοξυ-τελική περιοχή), τα 6 κατάλοιπα θρυπτοφάνης μεταλλάχθηκαν σε φαινυλαλανίνη και η θρυπτοφάνη 264 («αποΕ4Trp@264») παρέμεινε για να χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης για την καρβοξυ-τελική περιοχή κατά τη χημική αποδιάταξη της πρωτεΐνης [95]. Η μετάλλαξη αυτή δεν επέφερε κάποια αλλαγή στη δομή και τη σταθερότητα της αποΕ4. Ωστόσο, η «αποΕ4Trp@264» αποδείχθηκε πολύ πιο ασταθής και εμφάνισε λιγότερο συνεργιστική μετάπτωση κατά τη χημική της αποδιάταξη συγκριτικά με το θραύσμα της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η αστάθεια των διαμορφώσεων της καρβοξυ-τελικής περιοχής στην αποΕ4 είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίζεται για το απομονωμένο καρβοξυ-τελικό θραύσμα της αποΕ4 [95]. Η παραπάνω διαφορά δεν μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της περιοχής άρθρωσης (192-215), καθώς το θραύσμα που περιλαμβάνει την περιοχή άρθρωσης και την καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ παρουσιάζει αντίστοιχη σταθερότητα και συνεργιστικότητα με αυτή του καρβοξυ-τελικού θραύσματος. Η σύγκριση της «αποΕ4Trp@264» με τη «αποΕ4Δ(273-299)@264», στην οποία υπολείπεται η περιοχή 273-299 και υπάρχει μία μοναδική θρυπτοφάνη στη θέση 264, υποδεικνύει πως η απαλοιφή των αμινοξέων 273-299 μειώνει σημαντικά τη σταθερότητα και τη συνεργιστικότητα της καρβοξυ-τελικής περιοχής στην αποΕ4 [95].

Οι Chroni et al. μελέτησαν τη χημική αποδιάταξη της αποΕ4 και καρβοξυ-τελικών θραυσμάτων της καταγράφοντας την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού στα 340nm κατά την τιτλοδότηση με διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8M, έπειτα από διέγερση των δειγμάτων στα 295nm [96]. Οι Chroni et al. επιβεβαίωσαν πως η καμπύλη αποδιάταξης της αποΕ4 περιλαμβάνει δύο μεταπτώσεις με ένα διακριτό ενδιάμεσο μεταξύ 1 και 1,5 Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, όπως και οι Clement-Collin et al. και Tanaka et al. Το γεγονός πως η αποδιάταξη της αποΕ4 διεξάγεται σε δύο βήματα δηλώνει την παρουσία ενός σχετικά ασταθούς δομικού στοιχείου στο μόριο της αποΕ4 που είναι πιο ευαίσθητο στη χημική αποδιάταξη σε σχέση με την υπόλοιπη δομή της αποΕ4 [96]. Η σχετικά μικρή συνεργιστικότητα κατά τη θερμική αποδιάταξη συμφωνεί με την παρουσία ενδιαμέσου κατά τη χημική αποδιάταξη συνηγορώντας πως κάποια περιοχή της χαρακτηρίζεται από δομική αστάθεια. Σε καθένα από τα καρβοξυ-τελικά θραύσματα της αποΕ4 (με τις περιοχές 260-299, 230-299, 203-299, 186-299 και 166-299 να έχουν απαλοιφθεί), παρατηρήθηκε μείωση ή και πλήρης κατάργηση της ενδιάμεσης κατάστασης, που φυσιολογικά περιλαμβάνει η καμπύλη αποδιάταξης της αποΕ4 αγρίου τύπου, και διεξαγωγή της αποδιάταξης. σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υδροχλωρικής γουανιδίνης [96]. Στην περίπτωση απαλοιφής της περιοχής 260-299, η ενδιάμεση κατάσταση είχε σημαντικά μειωθεί σε σχέση με την αποΕ4 αγρίου τύπου και στην περίπτωση της απαλοιφής των μεγαλύτερων τμημάτων (230-299, 203-299, 286-299 και 166-299) δεν παρατηρήθηκε ενδιάμεσο. Η κατάργηση του ενδιάμεσης κατάστασης κατά τη χημική αποδιάταξη αντιστοιχεί στην αυξημένη συνεργιστικότητα κατά τη θερμική αποδιάταξη που παρατηρείται όσο αποκόπτονται μεγαλύτερες περιοχές από το καρβοξυ-τελικό άκρο της αποΕ4 [96]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η καρβοξυτελική περιοχή της αποΕ4 είναι καίριας σημασίας για την αποσταθεροποίησή της σε μία ενδιάμεση μερικώς αποδιπλωμένη κατάσταση.

## 3.3.2 Ιχνηθέτηση των υδρόφοβων περιοχών πρωτεΐνης με εξωγενή φθορίζοντα μόρια

Υπάρχουν χρωστικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες για τη μελέτη των χαρακτηριστικών της δομής των πρωτεϊνών χωρίς να προσδένονται ομοιοπολικά σε αυτές. Τυπικές χρωστικές αυτής της κατηγορίας είναι τα σουλφονικά οξέα ναφθυλαμίνης και πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι το 1-ανιλινο-ναφθαλενο-6-σουλφονικό οξύ (ANS) και το 2-(pτολουιδινιλο)-ναφθαλενο-6-σουλφονικό οξύ (TNS) [103]. Οι παραπάνω χρωστικές φθορίζουν ασθενώς ή καθόλου στο νερό, αλλά φθορίζουν ισχυρά όταν προσδεθούν σε πρωτεΐνες ή μεμβράνες. Οι χρωστικές τύπου ANS είναι αμφιπαθητικές και συνεπώς η μη πολική περιοχή τους προσροφάται σε μη πολικές περιοχές του μακρομορίου. Καθώς η πολική περιοχή της χρωστικής δεν συνεισφέρει στην εκπομπή, το παρατηρούμενο σήμα οφείλεται αποκλειστικά στην περιοχή του ιχνηθέτη που έχει προσδεθεί σε υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης [103].

## 3.3.3 Πρόσδεση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS στην αποΕ

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πρόσδεσης του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS στην αποΕ λαμβάνει χώρα διέγερση του δείγματος στα 395nm και λήψη του φάσματος φθορισμού στην περιοχή 400-600nm. Το φάσμα φθορισμού του ANS λαμβάνεται τόσο απουσία (control), όσο και παρουσία αποΕ. Η αποΕ βρίσκεται σε συγκέντρωση 40-50μg/mL και η τελική συγκέντρωση του ANS είναι 250μM [95, 96, 104].

Οι Saito et al., το 2003, μελέτησαν την πρόσδεση του ANS στην αμινο-τελική περιοχή της αποΕ3 και αποΕ4, στην καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ, στις μεταλλάξεις αποΕ4 Glu255Ala και αποΕ3 Pro267Ala και στη συνολική δομή των αποΕ3 και αποΕ4 αγρίου τύπου. Στην εικόνα 26 και το ένθετό της παρουσιάζονται τα φάσματα που μελετήθηκαν [104]. Στον άξονα γ περιλαμβάνεται η ένταση του σήματος φθορισμού (σε αυθαίρετες μονάδες) και στον άξονα x, το μήκος κύματος (σε nm).



Εικόνα 26. Φάσματα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης (f και j) και παρουσία: της αποΕ4 (a), της αποΕ4 Glu255Ala (b), της αποΕ3 (c και i), της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4 (d), της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ3 (e), της αποΕ3 Pro267Ala (g) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ3 (e), της αποΕ3 Pro267Ala (g) και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 26, η πρόσδεση του ANS στην αμινο-τελική περιοχή της αποΕ4 (φάσμα d) και αποΕ3 (φάσμα e) δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε σχέση με το φθορισμό που λαμβάνεται απουσία αποΕ (φάσμα f), υποδηλώνοντας την απουσία εκτεθημένων υδρόφοβων περιοχών στην επιφάνεια του δεματιού τεσσάρων ελίκων των αποΕ4 και αποΕ3 αντίστοιχα [104]. Αντίθετα, η σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στο φθορισμό του ANS όταν αυτό ήταν προσδεδεμένο με τις αποΕ4 και αποΕ3, δηλώνει την παρουσία εκτεταμένης επιφάνειας υδρόφοβων περιοχών (εκτεθημένων στο διαλύτη) στην υπόλοιπη δομή των αποΕ4 και αποΕ3 (που δεν περιλαμβάνει τις αμινο-τελικές περιοχές τους). Η αποΕ4 (φάσμα a) παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό εκτεθημένων υδρόφοβων περιοχών σε σχέση με την αποΕ3 (φάσμα c) [104]. Η εισαγωγή της μετάλλαξης Glu255Ala στο μόριο της αποΕ4 οδήγησε σε μείωση της επιφάνειας των υδρόφοβων περιοχών (φάσμα b έναντι a), όχι όμως σε τέτοιο βαθμό ώστε η μεταλλαγμένη αποΕ4 Glu255Ala να περιλαμβάνει αντίστοιχο ποσοστό υδρόφοβων περιοχών με την αποΕ3 (φάσμα c) [104]. Η μείωση των εκτεθημένων υδρόφοβων περιοχών στην αποΕ4 λόγω της μετάλλαξης του (κομβικού για τη στενή αλληλεπίδραση της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ4) γλουταμινικού οξέος 255, υποδηλώνει πως η διαφορά στο ποσοστό των υδρόφοβων περιοχών που είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη μεταξύ της αποΕ4 και της αποΕ3, μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της θέσης της καρβοξυ-τελικής περιοχής λόγω της παρατηρούμενης «αλληλεπίδρασης των περιοχών» στην αποΕ4 (βλ. παράγραφο 2.4.3.2, εικόνα 17) [104]. Όπως γίνεται φανερό από τα φάσματα της εικόνας 26, η καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ (φάσμα h) συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση του φθορισμού του ANS και περιλαμβάνει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό

υδρόφοβων περιοχών σε σχέση με αυτό των αμινο-τελικών περιοχών της αποΕ (φάσματα d και e). Η παρουσία σημαντικού ποσοστού υδρόφοβων περιοχών στην καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ υποδεικνύει πως η εν λόγω περιοχή σχηματίζει μία λιγότερο οργανωμένη δομή σε σχέση με την αμινο-τελική και προσομοιάζει σε «molten globule» [104]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως η θρυπτοφάνη 264, που βρίσκεται στην καρβοξυ-τελική περιοχή, είναι αρκετά εκτεθειμένη στο διαλύτη και συντελεί στη μεγάλη αύξηση του φθορισμού του ANS, σε αντίθεση με τη θρυπτοφάνη 118 της αμινο-τελικής περιοχής που βρίσκεται θαμμένη στο εσωτερικό της δομής [104, 105]. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή της μετάλλαξης Pro267Ala στην αποΕ3 συντελεί στην αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού από το ANS σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου [104]. Η αυξημένη έκθεση υδρόφοβων περιοχών στην αποΕ3 Pro267Ala είναι πιθανά συνέπεια της πιο χαλαρής αλληλεπίδρασης της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή που μπορεί με τη σειρά της να αποδοθεί στην αυξημένη ευελιξία της καρβοξυ-τελικής περιοχής, όταν η προλίνη που βρίσκεται φυσιολογικά στη θέση 267 αντικαθίσταται από αλανίνη [104].

Οι Saito et al. κατέληξαν πως η αποΕ4 περιλαμβάνει μεγαλύτερη έκταση υδρόφοβων περιοχών εκτεθειμένων στο διαλύτη σε σχέση με την αποΕ3, κυρίως λόγω της διαφορετικής οργάνωσης της τριτοταγούς δομής της καρβοξυ-τελικής περιοχής της [104]. Παράλληλα με τις πληροφορίες που συνέλεξαν από τα πειράματα πρόσδεσης του ANS στην αποΕ, συνέλεξαν επίσης πειραματικά δεδομένα από τη μελέτη της πρόσδεσης των ισομορφών της αποΕ σε λιπίδια και οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως η λιγότερο οργανωμένη δομή της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ4 οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια για την πρόσδεση σε λιπίδια, συντελώντας στην προτίμηση της αποΕ4 να αποτελεί συστατικό των VLDL σωματιδίων, σε σχέση με την αποΕ3.

Το 2005, οι Chou et al. μελέτησαν τα φάσματα φθορισμού ANS απουσία και παρουσία των αποΕ3 και αποΕ4 και- σε αντίθεση με τους Saito et al.- παρατήρησαν πως η αποΕ3 περιλαμβάνει αντίστοιχη (και λίγο μεγαλύτερη) έκταση υδρόφοβων περιοχών εκτεθημένη στο διαλύτη σε σχέση με την αποΕ4 [106]. Επίσης, μελέτησαν το ποσοστό των υδρόφοβων περιοχών σε αμινο- και καρβοξυ-τελικά θραύσματα της αποΕ3 και αποΕ4. Η απαλοιφή της αμινο-τελικής περιοχής 1-40 οδήγησε στην έκθεση μεγαλύτερου ποσοστού υδρόφοβων περιοχών σε σχέση με την αποΕ αγρίου τύπου, τόσο για την αποΕ3 όσο και την αποΕ4 ισομορφή [106]. Η απαλοιφή μεγαλύτερου μέρους της αμινο-τελικής περιοχής (αμινοξέα 1-71) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών σε σχέση με την αποΕ αγρίου τύπου αποΕ3 ισομορφή απ' ό,τι για την αποΕ4. Η απαλοιφή σταδιακά μεγαλύτερων τμημάτων από την καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ (272-299, 232-299, 192-299) οδήγησε σε σταδιακά ελαττούμενο ποσοστό υδρόφοβων περιοχών συγκριτικά με την αποΕ αγρίου τύπου, ανεξαρτήτως ισομορφής [106].

Το 2006, οι Tanaka et al. μελέτησαν την πρόσδεση του ANS στην αποE4, την αμινο-τελική περιοχή της και σε θραύσματά της όπου είχε γίνει απαλοιφή των καρβοξυ-τελικών περιοχών 261-299 και 273-299 [95]. Στην εικόνα 27 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του ANS έπειτα από την πρόσδεσή του στις παραπάνω πρωτεΐνες [95].



Εικόνα 27. Φάσματα φθορισμού του ANS έπειτα από την πρόσδεσή του: στην αποΕ4 (a), στα θραύσματα της αποΕ4 όπου έχει απαλοιφθεί η περιοχή 273-299 (b) και 261-299 (c) και στην αμινοτελική περιοχή της αποΕ4 (d). Το φάσμα εκπομπής φθορισμού (e) αντιστοιχεί στο ANS απουσία πρωτεΐνης [95].

Οι Tanaka et al. επιβεβαίωσαν την παρατήρηση των Saito et al., πως η αύξηση στο φθορισμό του προσδεδεμένου στην αποΕ4 ANS (φάσμα a) προέρχεται κυρίως από τις υδρόφοβες περιοχές της καρβοξυ-τελικής περιοχής, καθώς η δομή του δεματιού τεσσάρων ελίκων δεν περιλαμβάνει υδρόφοβες περιοχές (φάσμα d) [95, 104] Η απαλοιφή της περιοχής 273-299 οδήγησε σε μικρή μείωση στον εκπεμπόμενο φθορισμό από το ANS, ενώ η απαλοιφή της περιοχής περιοχής μείωση του φθορισμό του φθορισμού, υποδηλώνοντας πως η περιοχή 261-272 περιλαμβάνει εκτεταμένες υδρόφοβες περιοχές [95].

To 2008, οι Sakamoto et al. ασχολήθηκαν με τη μελέτη των ίδιων ακριβώς μεταλλάξεων που μελέτησαν οι Tanaka et al. σε υπόβαθρο αποΕ4, αλλά στην ισομορφή αποΕ3 [107]. Παρατήρησαν αντίστοιχη επίδραση της απαλοιφής των περιοχών 261-299 και 273-299 στην αποΕ3 ως προς την έκθεση υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη σε σχέση με την αποΕ4. Κατέληξαν πως η περιοχή 261-272 στην αποΕ3 διαθέτει επίσης υδρόφοβες περιοχές εκτεθημένες στο διαλύτη, όπως και στην αποΕ4 [107].

Οι Chroni et al., το 2008, μελέτησαν την πρόσδεση του ANS σε θραύσματα της αποE4 όπου υπολείπονταν πέντε διαφορετικού μήκους περιοχές από το καρβοξυ-τελικό άκρο (εικόνα 28) [96]. Παρατήρησαν όπως και οι Tanaka et al., πως η απαλοιφή του τμήματος 260-299 οδήγησε σε μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού από το ANS, υποδεικνύοντας πως το τμήμα 260-299 της αποE4 περιλαμβάνει εκτεθημένες υδρόφοβες περιοχές στο διαλύτη, μία περιοχή που ενδέχεται να είναι σημαντική κατά τη διεξαγωγή των αρχικών αλληλεπιδράσεων της αποE4 με τα λιπίδια [96, 107]. Η απαλοιφή της καρβοξυ-τελικής περιοχής (230-259) αύξησε την πρόσδεση του ANS, υποδεικνύοντας πως στην περιοχή αυτή περικλείονται υδρόφοβες περιοχές που είναι θαμμένες στο εσωτερικό της συνολικής δομής της αποE4. Δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω έκθεση υδρόφοβων περιοχών έπειτα από την αποκοπή της περιοχής 203-229 [96]. Η απαλοιφή της περιοχής των υδρόφοβων περιοχών που είχαν

εκτεθεί στην επιφάνεια από την αποκοπή της περιοχής 230-259. Τέλος, η απαλοιφή της περιοχής 166-185 αύξησε την έκθεση υδρόφοβων περιοχών που φυσιολογικά είναι θαμμένες στη συνολική δομή της αποΕ4.



Εικόνα 28. Φάσματα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης (free ANS), καθώς και έπειτα από την πρόσδεσή του στην αποΕ4 και τα καρβοξυ-τελικά θραύσματά της, όπου υπολείπονται οι περιοχές: 260-299, 230-299, 203-299, 186-299, 166-299 [96].

### 3.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός, ή φασματοσκοπία σκέδασης φωτονίων, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ιδιοτήτων αιωρημάτων και κολλοειδών διαλυμάτων, βιολογικών διαλυμάτων, μακρομορίων και πολυμερών και δεν καταστρέφει το δείγμα [108].

Τα σωματίδια που βρίσκονται μέσα σε υγρό ακολουθούν μία τυχαία κίνηση (Brownian) λόγω του βομβαρδισμού τους από τα μόρια του διαλύτη που τα περιστοιχίζουν. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα προς μελέτη σωματίδια ή μόρια μέσα στο υγρό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους [109].

Όταν προσπίπτει ακτινοβολία φωτός, όπως λέιζερ, σε ένα μικρό ακίνητο σωματίδιο, το σωματίδιο σκεδάζει ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία αναμένεται να φωτίσει την επιφάνεια ενός πετάσματος, τοποθετημένου δίπλα στο σωματίδιο. Αν βρεθούν πολλά ακίνητα σωματίδια, στην θέση που πριν βρισκόταν το ένα, θα εμφανιστεί στο πέτασμα ένα μωσαϊκό από σημεία που θα περιλαμβάνει φωτεινές και σκοτεινές περιοχές (περιοχές που σκεδάζεται ή όχι το φως, αντίστοιχα). Στην περίπτωση που τα σωματίδια δεν παραμένουν ακίνητα, όπως συμβαίνει με τα σωματίδια που ακολουθούν Brownian κίνηση εντός διαλύματος, το μωσαϊκό των ασπρόμαυρων σημείων δεν θα παραμένει σταθερό, αλλά καθώς τα λευκά σημεία θα κινούνται, θα παρουσιάζεται να αναβοσβήνει. [108].

Το όργανο μέτρησης δυναμικής σκέδασης φωτός περιλαμβάνει μεταξύ άλλων ένα συστατικό που καλείται «ψηφιακός συσχετιστής» και μετράει το ποσοστό ομοιότητας που παρουσιάζουν δύο σήματα που απέχουν χρονικά μεταξύ τους. Η σύγκριση της έντασης του σήματος που αντικατοπτρίζεται σε μία ορισμένη περιοχή του πετάσματος τη χρονική στιγμή t με την ένταση του σήματος έπειτα από μικρό χρονικό διάστημα, τη χρονική στιγμή t+Δt, θα δείξει πως τα σήματα είναι πολύ παρόμοια μεταξύ τους, ή αλλιώς «ισχυρά συσχετιζόμενα». Με την πάροδο επιπλέον χρόνου, όταν έρθει η χρονική στιγμή t+2Δt, θα συνεχίσει να υπάρχει μία σχετική ομοιότητα μεταξύ των δύο σημάτων, αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο την προηγούμενη χρονική στιγμή, t+Δt. Συνεπώς, η ομοιότητα μεταξύ δύο σημάτων που απέχουν χρονικά μεταξύ τους, δηλαδή η «συσχέτιση» των σημάτων φθίνει με την πάροδο του χρόνου, όπως περιγράφεται από την καμπύλη στην εικόνα 29 [108].



Εικόνα 29. Η συσχέτιση των σημάτων που λαμβάνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μειώνεται με την πάροδο του χρόνου [108].

Αν τα σωματίδια στο δείγμα είναι μεγάλα, η κίνησή τους στο διάλυμα είναι αργή και οι θέσεις τους δεν απέχουν σχεδόν καθόλου μεταξύ τους, οπότε τα σημεία φαίνεται να αναβοσβήνουν αργά στο πέτασμα. Αντίστοιχα, όταν τα σωματίδια είναι μικρά, κινούνται ταχύτερα στο διάλυμα και το σύνολο των σημείων τους στο πέτασμα αναβοσβήνει γρήγορα [108]. Στις διαφορετικές αυτές περιπτώσεις οι καμπύλες συσχέτισης για τα μικρά και μεγάλα σωματίδια σε συνάρτηση με το χρόνο αντιστοιχούν σε αυτές της εικόνας 30.



Εικόνα 30. Οι καμπύλες συσχέτισης για τα μικρά σωματίδια προσεγγίζουν το μηδέν συντομότερα από τα μεγάλα σωματίδια [108].

Έπειτα από τη μέτρηση της συσχέτισης με την πάροδο του χρόνου, οι ληφθείσες πληροφορίες χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της διασποράς του μεγέθους των σωματιδίων που

υπάρχουν στο δείγμα. Το λογισμικό του οργάνου χρησιμοποιεί αλγορίθμους προς υπολογισμό της φθίνουσας ταχύτητας για μια σειρά μεγεθών σωματιδίων ώστε να παράγει ένα γράφημα διασπορά μεγέθους (εικόνα 31) [108].



Εικόνα 31. Τυπικό γράφημα διασποράς μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται σε διάλυμα [108].

### 3.4.1 Μελέτη της υδροδυναμικής ακτίνας της αποΕ με δυναμική σκέδαση φωτός

Η υδροδυναμική ακτίνα ενός βιομορίου είναι η φαινόμενη ακτίνα του κατά τη διάχυση στο διαλύτη, ενώ η υδροδυναμική διάμετρος του βιομορίου αντιστοιχεί στο διπλάσιο της ακτίνας του. Το 2002, οι Morrow et al. μελέτησαν το μέγεθος της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4 υπολογίζοντας την υδροδυναμική ακτίνα της με δυναμική σκέδαση φωτός [65]. Παρατήρησαν πως σε όξινο pH (4,0), η διασπορά μεγέθους των συστατικών του δείγματος που περιλαμβάνει την αμινο-τελική περιοχή της αποΕ4 διευρύνεται και η υδροδυναμική της ακτίνα αυξάνεται λίγο σε σχέση με την αντίστοιχη διασπορά και την υδροδυναμική ακτίνα σε pH ουδέτερο (7,4) [65]. Η παρατήρηση αυτή, που προκύπτει από τα πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός, καθώς και η απουσία μεταβολής της ελικότητας προτάθηκε πως αντιστοιχεί στην ενδιάμεση δομή της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4 διευρύνεται και συγαμικής σκέδασης φωτός, καθώς και η απουσία μεταβολής της ελικότητας προτάθηκε πως αντιστοιχεί στην ενδιάμεση δομή της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4 και συγκεκριμένα, οφείλεται στη διάσταση (τέντωμα) του δεματιού τεσάρων ελίκων σε pH 4,0 [65]. Μεγαλύτερη αύξηση στην υδροδυναμική ακτίνα αλλά στενότερη διασπορά πληθυσμών παρατηρήθηκε σε pH 4,0 παρουσία 3,75M ουρίας, υποδεικνύοντας μία καλά καθορισμένη ενδιάμεση διαμόρφωση του θραύσματος της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ4 [65].

Το 2005, οι Chou et al. πραγματοποίησαν μέτρηση της διασποράς του μεγέθους των θραυσμάτων των αποΕ3 και αποΕ4 που υπολείπονταν της περιοχής 1-71, καθώς και των αντίστοιχων πρωτεϊνών αγρίου τύπου με δυναμική σκέδαση φωτός [106]. Τόσο οι αποΕ3 και αποΕ4 παρουσίασαν διασπορά πληθυσμών που περιελάμβανε δύο κύριες κορυφές, μία που αντιστοιχούσε σε μέση διάμετρο σωματιδίων 3,9nm και μία στην περιοχή 5,0-15,0nm. Ωστόσο μικρότερο ποσοστό του συνολικού πληθυσμού των μορίων της αποΕ3 (35%) αντιστοιχούσε σε μόρια με διάμετρο 5,0-15,0nm σε σχέση με την αποΕ4 (46%) [106]. Το θραύσμα της αποΕ3 72-299 περιελάμβανε μία κύρια κορυφή στην περιοχή 4-10nm, ενώ το αντίστοιχο θραύσμα της αποΕ4 περιελάμβανε δύο κύριες κορυφές, μία με μέγεθος σωματιδίων 5,1nm (62%) και άλλη μία, στην περιοχή 10,0-25,0nm (36%) [106].

#### 3.5 Διαλυτοποίηση DMPC κυστιδίων από απολιποπρωτεΐνες

Όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 2.4.1, μία από τις καίριες ιδιότητες για τη λειτουργία των απολιποπρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να προσδένουν λιπίδια και να αποτελούν συστατικό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Η αναμόρφωση αιωρήματος DMPC από μόρια απολιποπρωτεϊνών είναι μία δοκιμασία που χρησιμοποιείται κατεξοχήν για τη μελέτη της ικανότητας των απολιποπρωτεϊνών να προσδένουν λιπίδια. Η ανθρώπινη αποΕ διαλυτοποιεί σωματίδια DMPC προς σχηματισμό δισκοειδών λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων [110]. Στην εικόνα 32 περιγράφεται σχηματικά η αυθόρμητη διαλυτοποίηση αιωρήματος DMPC κυστιδίων από την αποΕ. Όταν η αποΕ επωάζεται με το θολό αιώρημα λιπιδίων στους 24°C (που είναι η θερμοκρασία μετάπτωσης της κρυσταλλικής φάσης του DMPC από γέλη σε υγρή), το διάλυμα γίνεται οπτικά διαυγές καθώς οι διπλοστιβάδες DMPC διαλυτοποιούνται και σχηματίζονται δισκοειδή λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που είναι αρκετά μικρότερα για να σκεδάζουν ορατό φως.



Εικόνα 32. Σχηματική περιγραφή της διαλυτοποίησης αιωρήματος κυστιδίων DMPC από την αποΕ. Τροποποιημένη εικόνα από [22]

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την προσέγγιση του μηχανισμού αναμόρφωσης και διαλυτοποίησης αιωρήματος φωσφολιπιδίων. Οι Segall et al. έχουν προτείνει τον ακόλουθο μηχανισμό διαύγασης αιωρήματος DMPC από τα μόρια των απολιποπρωτεϊνών, που παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 33 [81].

Η αναμόρφωση των DMPC κυστιδίων από τα μόρια των απολιποπρωτεϊνών περιλαμβάνει γρήγορη και αργή κινητική φάση [81]. Οι Segall et al. πρότειναν πως η περιοχή της αρχικής επαφής της απολιποπρωτεΐνης με την φωσφολιπιδική επιφάνεια (στάδιο I) μπορεί να είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό της επακόλουθης ταχύτητας της αντίδρασης αναμόρφωσης [81]. Αν αυτή η επαφή λάβει χώρα μεταξύ πρωτεΐνης που έχει εκτεθειμένη την υδρόφοβη επιφάνειά της και ασυνέχειας στη λιπιδική στιβάδα, τέτοιας που να αφήνει εκτεθειμένες στο διαλύτη τις υδρόφοβες ουρές των φωσφολιπιδίων, η αντίδραση προχωράει αμέσως στο στάδιο II (εικόνα 33). Αν η απολιποπρωτεΐνη αρχικά έρθει σε επαφή με περιοχή της στιβάδας λιπιδίων, όπου δεν υπάρχει ασυνέχεια, η πρωτεΐνη παραμένει προσροφημένη επιφανειακά στη λιπιδική στιβάδα,

αλλά δεν συνεισφέρει στην αποσταθεροποίηση των λιπιδικών σωματιδίων μέχρι η υδρόφοβη επιφάνεια της απολιποπρωτεΐνης να έρθει σε επαφή με λιπιδική ασυνέχεια.



## Εικόνα 33. Μοριακό μοντέλο που εξηγεί τις δύο ταυτόχρονες κινητικές φάσεις (αργή και γρήγορη) της διαλυτοποίησης DMPC από τις απολιποπρωτέϊνες [81].

Η επιφανειακή αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και της λιπιδικής επιφάνειας επιτρέπει στην απολιποπρωτεΐνη να διαχέεται στην επιφάνεια και τελικά να φτάνει σε μία ασυνέχεια της λιπιδικής στιβάδας, όπου μπορεί να εισέλθει και να αλληλεπιδράσει πιο ισχυρά με τα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης. Η ύπαρξη έμμεσων αλληλεπιδράσεων των απολιποπρωτεϊνών με το δίκτυο των λιπιδικών ασυνεχειών μπορεί να συντελεί στην παρουσία της αργής κινητικής φάσης [81].

Μετά την προσρόφηση των απολιποπρωτεϊνών στις ασυνέχειες της στιβάδας DMPC, η ταχύτητα με την οποία η αντίδραση προχωράει στο στάδιο III εξαρτάται από την ταχύτητα αναδιάταξης και εισόδου των ελίκων των απολιποπρωτεϊνών στις ασυνέχειες. Παράγοντες που μειώνουν την ταχύτητα πρόσβασης στο στάδιο III περιλαμβάνουν την υψηλή συγκέντρωση απολιποπρωτεϊνών στη λιπιδική επιφάνεια (ώστε να προκαλείται συσσώρευση), την έλλειψη ευελιξίας μεταξύ των ελίκων της απολιποπρωτεΐνης, τον ολιγομερισμό και τη γλυκοζυλίωση της απολιποπρωτεΐνης [81]. Στις παραπάνω περιπτώσεις οι απολιποπρωτεΐνες μπορούν αρχικά να εισάγουν μόνο ένα μέρος των ελίκων τους στις λιπιδικές ασυνέχειες και θα πρέπει να λάβουν χώρα ανακατατάξεις πριν να προχωρήσουν στο στάδιο III. Οι ανακατατάξεις αυτές μπορούν να

περιλαμβάνουν εκρόφηση των πιο χαλαρά προσδεδεμένων μορίων από τη λιπιδική στιβάδα, διάσταση των πρωτεϊνικών ολιγομερών, καθώς και αλλαγές στη διαμόρφωση των απολιποπρωτεϊνών. Επομένως, οι εγγενείς καθυστερήσεις που επιφέρουν οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν ένα μέρος των απολιποπρωτεϊνών να οδηγεί στην αργή κινητική της αντίδρασης. Όταν πλέον η αντίδραση φτάσει στο στάδιο ΙΙΙ, η σημαντική πλέον συγκέντρωση ελίκων που βρίσκονται μέσα στις ασυνέχειες της λιπιδικής διπλοστιβάδας τροποποιούν το πακετάρισμα της φωσφατιδυλοχολίνης και προκαλούν αποσταθεροποίηση. Καθώς σχηματίζονται σταθεροί δίσκοι διπλοστιβάδας με την επανάληψη της πορείας από το στάδιο Ι μέχρι και το ΙΙΙ, οι διπλοστιβάδες DMPC απομακρύνονται σταδιακά από το αιώρημα των λιποπρωτεϊνικών κυστιδίων DMPC (στάδιο ΙV), οδηγώντας σε μείωση της θολερότητας του αρχικού λιπιδικού αιωρήματος.

Συμπερασματικά, τα στάδια Ι και ΙΙ είναι εκείνα που μπορεί περιορίζουν τη συνολική κινητική της αντίδρασης αναμόρφωσης λιπιδίων από τις απολιποπρωτεΐνες, καθώς από το στάδιο ΙΙΙ κι έπειτα, όλα τα μόρια αντιδρούν με αντίστοιχη κινητική [81].

## 3.5.1 Μελέτη της αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από την αποΕ

Οι Segall et al., το 2002, μελέτησαν τη διαύγαση αιωρήματος κυστιδίων DMPC από τις τρεις ισομορφές της αποΕ [81]. Καθώς το δεμάτι τεσσάρων ελίκων της αποΕ ανοίγει κατά την αλληλεπίδρασή του με τα λιπίδια, οι διαφορές στη σταθερότητα των τριών ισομορφών της αποΕ επηρεάζουν την κινητική διαύγασης των λιπιδίων [81]. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερότητα της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ τόσο βραδύτερα διεξάγεται η αντίδραση διαύγασης των κυστιδίων DMPC. Η παραπάνω παρατήρηση ερμηνεύεται από το γεγονός πως όσο πιο ασταθές είναι το δεμάτι τεσσάρων ελίκων τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να βρίσκεται σε ανοιχτή διαμόρφωση και να έχει τις μη πολικές επιφάνειες των ελίκων του διαθέσιμες προς αλληλεπίδραση με τα λιπίδια [81]. Οι τρεις ισομορφές της αποΕ παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην κινητική διαύγασης κυστιδίων DMPC, ενώ αντίθετα τα θραύσματα των αμινο-τελικών περιοχών τους διαφέρουν σημαντικά ως προς την ταχύτητα διαύγασης, όπως φαίνεται στην εικόνα 34 [81].



Εικόνα 34. Κινητική διαύγασης DMPC από το θραύσμα της αμινο-τελικής περιοχής (22kDa) των ισομορφών της αποΕ (A) και από τη συνολική δομή (34kDa) της αποΕ (B). ΑποΕ2: διακεκομμένη γραμμή με παύλες, αποΕ3: συνεχής γραμμή, αποΕ4: διακεκομμένη γραμμή με σημεία. Στο τρίτο γράφημα (C) παρουσιάζεται η κινητική διαύγασης από τη συνολική δομή (34kDa) της αποΕ4, στην οποία οι έλικες της αμινο-τελικής περιοχής συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Στο ένθετο του γραφήματος C, παρουσιάζεται η αδυναμία της αμινο-τελικής περιοχής της μεταλλαγμένης αποΕ4 να διαυγάσει το αιώρημα DMPC [81].

Παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ της συγγένειας που παρουσιάζει καθεμία από τις τρεις ισομορφές της αποΕ με την επιφάνεια των κυστιδίων DMPC. Η κινητική ανάλυση αντιδράσεων διαύγασης DMPC από τις αποΕ2, αποΕ3 και αποΕ4 (που διήρκησαν 4h) έδειξε πως οι παραπάνω αντιδράσεις περιελάμβαναν ταχεία και αργή φάση [81]. Ωστόσο, το ποσοστό συμμετοχής κάθε φάσης στην αντίδραση και οι σταθερές ταχύτητας κάθε φάσης βρέθηκαν να ποικίλλουν μεταξύ των ισομορφών, όπως είναι αναμενόμενο από τις δομικές διαφορές που παρουσιάζουν οι αποΕ2, 3 και 4 μεταξύ τους. Κατά τη μελέτη διαύγασης DMPC από την αποΕ σε χρονικό διάστημα μόλις 10min, παρατηρήθηκε πως η αντίδραση περιελάμβανε σχεδόν εξ
ολοκλήρου ταχεία φάση. Αντίθετα, σε μία αντίδραση διαύγασης στην οποία συμμετέχουν μόρια απολιποπρωτεϊνών με άκαμπτες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των α-ελίκων τους κυριαρχεί η βραδεία φάση. Η παρατήρηση αυτή αιτιολογείται από το γεγονός ότι τα μόρια με την άκαμπτη δομή υπόκεινται σε εκτεταμένη αλλαγή διαμορφώσεων (σε σχέση με μόρια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη δομική πλαστικότητα) προκειμένου να εισάγουν όσο το δυνατόν περισσότερες από τις έλικες τους στις ασυνέχειες των λιπιδικών διπλοστιβάδων για να τις αποσταθεροποιήσουν και να προκαλέσουν διαύγαση [81]. Η σημασία της δομικής αναδιοργάνωσης του δεματιού τεσσάρων ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ στη διαλυτοποίηση αιωρήματος λιπιδίων παρουσιάζεται ξεκάθαρα από την αδυναμία διαύγασης DMPC από θραύσμα της αμινοτελικής περιοχής της αποΕ4 στο οποίο οι έλικες συνδέονταν μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς [81, 111].

Οι Pownall et al. παρατήρησαν πως μία αντίστροφη εκθετική σχέση συνδέει τη μοριακή μάζα και τη σταθερά ταχύτητας διαύγασης DMPC, όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη ευέλικτων δομικά απολιποπρωτεϊνών και πεπτιδίων που περιλαμβάνουν αμφιπαθητικές α-έλικες [112]. Ωστόσο, η μελέτη των Segall et al. υπέδειξε πως η μείωση της ευελιξίας της αποΕ, λόγω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των ελίκων της, μπορεί να αποτελέσει έναν περιοριστικό παράγοντα για την ταχύτητα της αντίδρασης διαύγασης λιπιδίων και μπορεί μάλιστα να υπερισχύσει της θετικής επίδρασης που προκαλεί η μικρότερη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης στην ταχύτητα της αντίδρασης [81]. Κάτι τέτοιο διαφαίνεται από το γεγονός πως η αμινο-τελική περιοχή της αποΕ διαυγάζει αιώρημα κυστιδίων DMPC πιο αργά από την αποΑ-Ι στην ίδια συγκέντρωση, αν και η αμινο-τελική περιοχή της αποΕ περιλαμβάνει μικρότερη μοριακή μάζα (22kDa) από την αποΑ-Ι (28kDa).

Σύγκριση της ταχύτητας διαύγασης της συνολικής δομής της αποΕ3 (34kDa) με την ταχύτητα διαύγασης ισομοριακού μίγματος της αμινο-τελικής αποΕ3 (22kDa) και της περιοχής (12kDa) που περιλαμβάνει την περιοχή άρθρωσης και την καρβοξυ-τελική περιοχή, υπέδειξε πως η συνεισφορά κάθε ξεχωριστής περιοχής της αποΕ3 στη διαύγαση των λιπιδίων δεν είναι αθροιστική [81]. Παρατηρήθηκε μάλιστα πως η ταχύτητα διαύγασης αιωρήματος DMPC από την αποΕ3 είναι μικρότερη από την ταχύτητα της αντίδρασης όταν χρησιμοποιείται ισομοριακό μίγματος της αυνολική δομή της αποΕ3 είναι μικρότερη από την ταχύτητα της αντίδρασης όταν χρησιμοποιείται ισομοριακό μίγμα των περιοχών 22 και 12kDa. Προκειμένου να αιτιολογηθεί η παραπάνω παρατήρηση έγινε η υπόθεση πως η συνολική δομή της αποΕ είναι δομικά περιορισμένη σε σχέση με τις επιμέρους περιοχές της, καθώς στη συνολική αποΕ, οι δύο περιοχές είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες η μία με την άλλη [81]. Η κινητική μελέτη της διαύγασης αιωρήματος DMPC από τη συνολική δομή της αποΕ3), ενώ στην περίοχοσε η βραδεία φάση (υποδηλώνοντας πιο άκαμπτη δομή της αποΕ3), ενώ στην περίπτωση του μίγματος των θραυσμάτων της αποΕ, η συνεισφορά της ταχείας και της βραδείας φάσης στην κινητική της αντίδρασης ήταν μεταξύ τους ίσες (λιγότερο άκαμπτη δομή), ενισχύοντας την ισχύ της παραπάνω υπόθεσης [81].

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

#### Συσχέτιση της αποΕ με παθολογικές καταστάσεις

#### 4.1 Ασθένειες που σχετίζονται με την αποΕ

Η αποΕ παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και συνεπώς στη ρύθμιση της ομοιόστασης των λιπιδίων και της χοληστερόλης στον οργανισμό. Ανωμαλίες στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης οδηγούν στην εμφάνιση παθοφυσιολογικών καταστάσεων καρδιαγγειακών, νευρολογικών, νεφρικών και άλλων. Οι πολυμορφισμοί της αποΕ έχουν διερευνηθεί ως παράγοντες κινδύνου κυρίως για καρδιαγγειακές νόσους, καθώς και για τη νόσο του Alzheimer, τη νόσος του Parkinson, το διαβήτη, τη νεφρική νόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο, τη σχιζοφρένεια και τον καρκίνο [12, 14, 113-117].

#### 4.1.1 Συσχέτιση της αποΕ με καρδιαγγειακά νοσήματα

Η κυριότερη παθολογική εκδήλωση στην καρδιαγγειακή νόσο είναι η αθηροσκλήρωση σε συνδυασμό με την αρτηριακή υπέρταση [118]. Η αθηροσκλήρωση είναι μία εστιακή νόσος που χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων στο εσωτερικό του αρτηριακού τοιχώματος, στις μεγάλες και μεσαίου μεγέθους αρτηρίες. Εμφανίζεται συνήθως σε περιοχές διαταραγμένης ροής αίματος, σαν συνέπεια αλλαγής στη γονιδιακή έκφραση [2]. Η αθηροσκλήρωση αρχίζει από την εφηβική ηλικία και εξελίσσεται στις επόμενες δεκαετίες, μειώνοντας προοδευτικά τον αυλό των αγγείων μέχρι αποφράξεως, προκαλώντας στα στεφανιαία αγγεία ισχαιμία (στεφανιαία νόσο) με αποτέλεσμα έμφραγμα του μυοκαρδίου, ακόμη και αιφνίδιο θάνατο [118].

Μία σειρά μελετών διερεύνησαν την επίδραση των πολυμορφισμών της αποΕ στην καρδιαγγειακή νόσο [12, 113, 114, 117]. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν το αλληλόμορφο ε4 με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε σχέση με το αλληλόμορφο ε2 που δεν σχετίζεται με αντίστοιχο κίνδυνο [12, 14, 113, 114, 117]. Για παράδειγμα, από μελέτη σε μεσήλικες άνδρες από 9 πληθυσμούς υπολογίστηκε αυξημένος κατά 40% κίνδυνος θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο για φορείς του αλληλόμορφου ε4, συγκριτικά με φορείς του αλληλόμορφου ε2, ή άτομα με γονότυπο ε3/ε3 [12, 119]. Μία μετα- ανάλυση 48 δημοσιευμένων μελετών που περιελάμβαναν 15.492 περιπτώσεις ασθενών και 32.965 περιπτώσεις υγιών ανθρώπων (control), οδήγησε επίσης στο συμπέρασμα πως οι φορείς του αλληλόμορφου ε4 παρουσιάζουν 42% μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [12, 117]. Πολλές άλλες μελέτες έχουν καταλήξει πως η συσχέτιση του αλληλόμορφου ε4 με τον κίνδυνος αυγκριτικά με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου [12, 117]. Πολλές άλλες μελέτες έχουν καταλήξει πως η συσχέτιση του αλληλόμορφου ε4 με τον κίνδυνος αυγκριτικά με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου [12, 117].

Το αλληλόμορφο ε2 έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ, μίας νόσου που χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στη ρύθμιση των επιπέδων των λιπιδίων και της χοληστερόλης και οδηγεί στην εμφάνιση πρώιμης αθηροσκλήρωσης. Η συσχέτιση της αποΕ με την υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ θα αναπτυχθεί στην παράγραφο 4.1.3.

#### 4.1.2 Συσχέτιση της αποΕ με την υπερτριγλυκεριδαιμία

Μελέτες έχουν δείξει πως η υπερέκφραση της αποΕ σε ποντίκια που δεν εκφράζουν ενδογενώς αποΕ, αυξάνει την έκκριση των τριγλυκεριδίων των VLDL και σχετίζεται με υπερτριγλυκεριδαιμία [123, 124]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα αποΕ του πλάσματος στους ανθρώπους και τα ποντίκια έχουν συσχετιστεί θετικά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα [125, 126]. Η επαγωγή υπερτριγλυκεριδαιμίας σε ποντίκια που υπερεκφράζουν την αποΕ μπορεί να αποφευχθεί με την έκφραση αποΕ στην οποία υπολείπεται η καρβοξυ-τελική περιοχή (που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 260-299) [127].

Με τη χρήση στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και γονιδιακής μεταφοράς σε ποντίκια, τα αμινοξέα που ενοχοποιούνται για συσχέτιση με υπερτριγλυκεριδαιμία εντοπίστηκαν στην περιοχή 261-269 της αποΕ [126, 127]. Δύο μεταλλάξεις της αποΕ, οι αποΕ4 [Leu261Ala/ Trp264Ala/ Phe265Ala] (αποΕ4mutC) και αποΕ2 [Leu261Ala/ Trp264Ala/ Phe265Ala] (αποΕ4mutC) και αποΕ2 [Leu261Ala/ Trp264Ala/ Phe265Ala] (αροΕ2mutC), βρέθηκε πως αποτρέπουν την εμφάνιση υπερτριγλυκεριδαιμίας που επάγεται από την αποΕ. Οι τριπλές αυτές μεταλλάξεις παρουσιάζουν τις βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες που διαθέτει μία πρόσφατα χαρακτηρισμένη πενταπλή μετάλλαξη της αποΕ- η [Leu261Ala, Trp264Ala, Phe265Ala, Leu268Ala, Val269Ala]- υποδηλώνοντας πως η υποκατάσταση αμινοξέων στις θέσεις 268 και 269 δεν είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί ο επιθυμητός φαινότυπος στα ποντίκια [124, 128].

Πιο συγκεκριμένα, όταν αποΕ<sup>-/-</sup> ή αποΑ-Ι<sup>-/-</sup> ποντίκια μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εξέφραζαν αποΕ2 ή αποΕ4 στις οποίες είχε εισαχθεί η τριπλή μετάλλαξη [Leu261Ala/ Trp264Ala/ Phe265Ala], δεν παρατηρήθηκε επαγωγή υπερτριγλυκεριδαιμίας [129]. Επίσης, παρατηρήθηκε πως τόσο η αποΕ4mutC και η αποΕ2mutC επάγουν το σχηματισμό σφαιρικών HDL σε αποΑ-Ι knock-out ποντίκια [129]. Ωστόσο, μικρές διαφορές στη διανομή χοληστερόλης στα κλάσματα IDL/ LDL, HDL2 και HDL3 και στη διανομή της αποΕ στα κλάσματα HDL2 και HDL3 παρατηρήθηκαν μεταξύ της αποΕ4mutC και της αποΕ2mutC. Οι παραπάνω διαφορές υποδεικνύουν πως το υπόβαθρο της ισομορφής της αποΕ μπορεί να επηρεάζει τις ιδιότητες που η τριπλή μετάλλαξη προσδίδει στην αποΕ.

Μεταλλάξεις της αποΕ που είναι αποτέλεσμα της βιοτεχνολογίας και έχουν βελτιωμένες βιολογικές λειτουργίες, έχει προταθεί πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για τη χρήση τους σε θεραπευτικές εφαρμογές σχετικά με τη διόρθωση ανωμαλιών στην εκκαθάριση χυλομικρών, καθώς και για χρήση λιποπρωτεϊνών HDL που περιέχουν αποΕ για σταθεροποίηση ασταθών πλακών και αθηροπροστασία [124, 129]. Προς βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων των δύο νέων τριπλών μεταλλάξεων της αποΕ (αποΕ2mutC και αποΕ4mutC), είναι σημαντικός ο χαρακτηρισμός τυχών δομικών και λειτουργικών αποκλίσεων από την αντίστοιχη αποΕ αγρίου τύπου και η προσπάθεια περιορισμού των αποκλίσεων παράλληλα με τη διατήρηση των επιθυμητών λειτουργιών[118].

#### 4.1.3 Συσχέτιση της αποΕ με την υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ (ΥΛΠ ΙΙΙ)

Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ (ΥΛΠ ΙΙΙ) χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στο πλάσμα, καθώς και από την παρουσία β-VLDL σωματιδίων, δηλαδή υπολειμμάτων χυλομικρών και ηπατικών VLDL που είναι πλούσια σε χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Τα β-VLDL σωματίδια είναι επίσης πλούσια σε αποΕ2 ή μεταλλάξεις της αποΕ, που χαρακτηρίζονται από μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης στα μέλη της οικογένειας των LDL υποδοχέων [130]. Ασθενείς που πάσχουν από την ΥΛΠ ΙΙΙ μπορεί να αναπτύξουν ξανθώματα [131]. Τα ξανθώματα αποτελούν κακώσεις που χαρακτηρίζονται από συσσώρευση μακροφάγων φορτωμένων με λιπίδια [132]. Τα ξανθώματα αναπτύσσονται κυρίως λόγω διαρροής λιπιδίων από τα αγγεία σε παρακείμενους ιστούς, όπου τα μακροφάγα φαγοκυτώνουν τα λιπίδια. Η συσσώρευση λιπιδίων από τα μακροφάγα οδηγεί στο σχηματισμό «αφρωδών μακροφάγων» [132, 133]. Γενικευμένα επίπεδα ξανθώματα μπορούν να καλύψουν μεγάλες περιοχές του προσώπου, του λαιμού και του θώρακα. Τα επίπεδα ξανθώματα στην παλάμη συνήθως καλούνται «ραβδωτά ξανθώματα παλάμης» και αν και είναι σπάνια, αποτελούν χαρακτηριστική κλινική εικόνα ασθενών που πάσχουν από ΥΛΠ ΙΙΙ (εικόνα 35) [132]. Η ΥΛΠ ΙΙΙ οδηγεί σε πρώιμη εμφάνιση αθηροσκλήρωσης. Η συχνότητα εμφάνισής της υπολογίζεται σε 0.01-0.1% του πληθυσμού [2].



## Εικόνα 35. Κλινική εικόνα που παρουσιάζει πολυάριθμα ξανθώματα στις παλάμες ασθενούς που πάσχει από ΥΛΠ ΙΙΙ [132].

Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενών που εμφανίζουν ΥΛΠ ΙΙΙ έχουν φαινότυπο E2/E2. Ωστόσο, η ομοζυγωτία στο αλληλόμορφο ε2 δεν συνεπάγεται απαραιτήτως την εμφάνιση της νόσου. Λιγότεροι από το 10% των αποE2 ομοζυγωτών είναι υπερλιπιδαιμικοί, ενώ τα λιπίδα της πλειοψηφία των αποE2 ομοζυγωτών βρίσκονται είτε σε φυσιολογικά όρια ή κάτω από αυτά [91, 130, 131, 134]. Συνεπώς, η ανάπτυξη της ΥΛΠ ΙΙΙ απαιτεί μεν το γονότυπο ε2/ε2, αλλά και δευτερεύοντες γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες για να εμφανιστεί η νόσος.

Η ισομορφή E2 εμφανίζει μικρότερη από 2% συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα. Η συσσώρευση β-VLDL σωματιδίων, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα των ασθενών με ΥΛΠ ΙΙΙ αποδίδεται στην ανεπαρκή εκκαθάριση των β-VLDL από το αίμα, λόγω της χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης των σωματιδίων στους LDL υποδοχείς που πραγματοποιείται μέσω της αποΕ [130, 132, 134].

Εκτός από την αποΕ2, που συνδέεται με υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας της ΥΛΠ ΙΙΙ, μία ποικιλία σπάνιων φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων της αποΕ- που παρουσιάζονται στον πίνακα 3- σχετίζονται με επικρατή μορφή κληρονομικότητας της νόσου, η οποία εκφράζεται σε νεαρή ηλικία [91, 130, 134]. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 136 και 150, δηλαδή εντός της περιοχής πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα [9, 91, 134]. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 136 και 150, δηλαδή εντός της περιοχής πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα [9, 91, 134]. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 136 και 150, δηλαδή εντός τον LDL υποδοχέα [9, 91, 134].

Υπεύθυνη μετάλλαξη	Συγγένεια πρόσδεσης στους υποδοχείς		
	LDL υποδοχέα	HSPG/ LRP	Αλλά χαρακτηριστικά
Arg136→Ser	Μέτρια	Δεν έχει προσδιοριστεί	Η αναλογία μεταλλαγμένης αποΕ: φυσιολογική αντιστοιχεί σε 4:1 στο πλάσμα των ετερόζυγων ατόμων. Έχει προσδιοριστεί ένα ομόζυγο άτομο. Εκτεταμένες γενεαλογικές αναλύσεις. Επιρροή ηλικίας, μάζας σώματος, φύλου, αλλά όχι του δεύτερου αλληλόμορφου της αποΕ. Αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στον ισπανικό πληθυσμό.
Arg136→Cys	-	-	Ποικίλη έκφραση υπερλιπιδαιμίας
Arg142→Leu		-	Μόνο δύο περιπτώσεις έχουν προσδιοριστεί
Arg142→Cys	Χαμηλή	Πολύ χαμηλή	Σοβαρή υπερλιπιδαιμία, 100% διεισδυτικότητα, πολύ πρώιμη και σοβαρή έκφραση υπερλιπιδαιμίας (πιθανά κατά τη γέννηση). Προτίμηση πρόσδεσης σε VLDL για την ισομορφήτης αποΕ καθώς συνυπάρχει η δεύτερη μετάλλαξη Cys112→Arg. Η αναλογία μεταλλαγμένης αποΕ:φυσιολογική αποΕ στα β-VLDL είναι 3:1.
Arg145→Cys	Μέτρια	Χαμηλή	Πολλές ομοιότητες με την ομοζυγωτία σε αποΕ2, συμπεριλαμβανομένης και της επίδρασης δευτερογενών παραγόντων. Έχουν προσδιοριστεί ομόζυγα άτομα. Η ομοζυγωτία σε συνδυασμό με μία δεύτερη μετάλλαξη (Glu13→Lys) έχει συσχετιστεί με σοβαρή υπερλιπιδαιμία. Αυξημένη συχνότητα σε έγχρωμους.
Lys146→GIn	Μέτρια	-	Εκτεταμένες γενεαλογικές αναλύσεις. Ποικίλη έκφραση υπερλιπιδαιμίας. Επίδραση δευτερογενών παραγόντων. Πολύ αναποτελεσματική λιπόλυση των β-VLDL από την LPL.
Lys146→Glu	Χαμηλή	Πολύ χαμηλή	Υψηλός βαθμός διεισδυτικότητας
Lys146→Asn, Arg147→Trp	-	-	Πολύ πρώιμη έκφραση υπερλιπιδαιμίας
Διπλασιασμός 7 αμινοξέων (των 121-127)	Χαμηλή	Πολύ χαμηλή	Εκτεταμένες γενεαλογικές αναλύσεις. 100% διεισδυτικότητα. Επίδραση από το δεύτερο αλληλόμορφο της αποΕ, τη μάζα σώματος, την ηλικία, αλλά όχι από το φύλο. Προτίμηση VLDL από την ισομορφή της αποΕ λόγω της δεύτερης μετάλλαξης Cys112→Arg. Η αναλογία μεταλλαγμένης: φυσιολογική αποΕ στο πλάσμα είναι μεγαλύτερη από 4:1. Της έχει αποδοθεί η ονομασία «αποΕ Leiden».

Πίνακας 3. Σπάνιες μεταλλάξεις της αποΕ που σχετίζονται με επικρατή μορφή κληρονομικότητας της ΥΛΠ ΙΙΙ. (Τροποιημένος πίνακας από [130]).

Η ετεροζυγωτία για την αποΕ3[R136S] με το αποΕ2 αλληλόμορφο οδηγεί σε ΥΛΠ ΙΙΙ [91, 135]. Μελέτες *in vitro* έδειξαν πως η προσδεδεμένη σε λιπίδια αποΕ3[R136S] παρουσιάζει 60% μείωση στη συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου [91, 136]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ομοζυγωτία για την αποΕ3[R136S] και η ετεροζυγωτία για την αποΕ3[R136S] με καθένα από τα τρία αλληλόμορφα οδηγεί επίσης σε ΥΛΠ ΙΙΙ, αλλά με ανεπαρκή διεισδυτικότητα [91, 137].

Η ομοζυγωτία και ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη αποΕ3[R145C] έχουν συσχετιστεί με σοβαρή ΥΛΠ ΙΙΙ [91, 138, 139]. Μελέτες έδειξαν ότι η λιπιδιωμένη αποΕ3[R145C] παρουσιάζει 55% μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου και η λιπιδιωμένη 22-kDa περιοχή της αποΕ3[R145C] παρουσιάζει 48% μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης στις HSPG πρωτεογλυκάνες συγκριτικά με την αντίστοιχη περιοχή της αποΕ3 αγρίου τύπου [91, 138, 140].

Η ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη αποΕ3[Κ146Ε] με το αποΕ3 αλληλόμορφο οδήγησε σε επικρατή έκφραση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ. Η προσδεδεμένη σε λιπίδια αποΕ3[Κ146Ε] παρουσιάζει λιγότερη από 10% συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα και τις HSPG πρωτεογλυκάνες συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου [91, 141-143].

Η ελλιπής πρόσδεση στους υποδοχείς, που παρουσιάζουν οι μεταλλάξεις της αποΕ3, δεν έχει αναλογική συσχέτιση με τη σοβαρότητα της δυσλιπιδαιμίας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως υπάρχουν δευτερογενείς παράγοντες που επίσης επηρεάζουν την έκφραση της νόσου [91, 136, 144, 145]. Επιπρόσθετα, ο βαθμός διεισδυτικότητας ποικίλει ανάλογα με τη μετάλλαξη [134]. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σοβαρότητα της δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς που φέρουν τις παραπάνω μεταλλάξεις περιλαμβάνουν: τους φυσικούς πολυμορφισμούς της αποΕ (Ε2, Ε3, ή Ε4) που διαφοροποιύνται ως προς την προτίμηση πρόσδεσης στις τάξεις (κατηγορίες) λιποπρωτεϊνών [70], την αλληλεπίδραση της αποΕ με HSPG πρωτεογλυκάνες [146] ή επιπρόσθετους γενετικούς, ορμονικούς, ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η παχυσαρκία, ο υποθυροειδισμός, τα επίπεδα οιστρογόνων ή ο διαβήτης [130].

#### 4.2 Συσχέτιση της αποΕ με νευροπαθολογικές καταστάσεις.

Η δράση της αποΕ και των πολυμορφισμών της στη νευρολογική λειτουργία και τη νόσο του Alzheimer έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας σε πληθώρα εργαστηρίων [12]. Συνοπτικά, η αποΕ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, όπου λειτουργεί ως η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [12, 14, 115, 116]. Η έκφρασή της επάγεται κατά τη βλάβη του περιφερικού νεύρου και η αποΕ εμπλέκεται στη διαδικασία επιδιόρθωσης και ανακατασκευής των νευρώνων, συντελώντας έτσι στη διατήρηση της πλαστικότητας των συνάψεων κατά τη γήρανση, καθώς και σε καταστάσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε εκφυλισμό των νεύρων, όπως το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η αυξημένη παραγωγή του αμυλοειδούς πεπτιδίου β (Aβ) [27]. Επίσης, η αποΕ διαμορφώνει τη νευρική επέκταση και την κυτοσκελετική λειτουργία [12]. Τα σωματίδια HDL-E ενεργοποιούν την ανάπτυξη των νευραξόνων με τη μεσολάβηση των LDL υποδοχέων. Η αποΕ3 διεγείρει την επέκταση των νευραξόνων, ενώ η αποΕ4 την καθυστερεί ή την αναστέλλει [147]. Επίσης, η ισομορφή Ε4 είναι λιγότερο αποτελεσματική στην επιδιόρθωση και διατήρηση των νευρώνων συγκριτικά με τις αποΕ2 και αποΕ3 [27].

Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αποΕ και της ανάπτυξης της νόσου του Alzheimer. Το αλληλόμορφο ε4 συναντάται σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις της νόσου στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ το αλληλόμορφο ε2 είναι σπάνια συναντώμενο σε ασθενείς με νόσο του Alzheimer [12, 14, 115, 116]. Το 40-80% των ασθενών φέρουν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο ε4. Η Ε4 ισομορφή της αποΕ έχει συσχετιστεί με την

πρόωρη εμφάνιση, πρόοδο και σοβαρότητα του εγκεφαλικού τραύματος και του εγκεφαλικού επεισοδίου. Επίσης, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση επιπλοκών έπειτα από εγχείρηση by-pass της στεφανιαίας αρτηρίας, με τη νόσο του Parkinson, τη σκλήρυνση κατά πλάκας, την πολλαπλή σκλήρυνση, τη σχετιζόμενη με σακχαρώδη διαβήτη νευροπάθεια, την υπνική άπνοια, τη νόσο του Lewy και την ισχαιμία του κεντρικού νευρικού συστήματος [148].

#### 4.2.1 Συσχέτιση της αποΕ με τη νόσο του Alzheimer

Καθώς η αποΕ4 είναι ο σημαντικότερος γενετικός παράγοντας κινδύνου της νόσου του Alzheimer, έχει προταθεί μία σειρά πιθανών μηχανισμών σχετικά με τη συνεισφορά της στην παθογένεσης της νόσου.

Έχει βρεθεί πως η αποΕ4 αλληλεπιδρά με το αμυλοειδές πεπτίδιο β (Αβ) και οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευσή του σε αμυλοειδείς πλάκες σε σχέση με την παρατηρούμενη συσσώρευση έπειτα από την αλληλεπίδραση του Αβ με τις ισομορφές αποΕ2 και αποΕ3 [149]. Τα Αβ αποτελούν πεπτίδια, που διαφέρουν σε μήκος και έχουν προκύψει από την πρωτεόλυση του πρόδρομου πεπτιδίου APP. Το πεπτίδιο Αβ40 αποτελεί το 90% του Αβ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το Αβ42, που είναι τοξικό, αποτελεί το 10% του συνολικού Αβ, ενώ υπάρχουν και άλλα αμυλοειδή θραύσματα σε μικρότερα ποσοστά. Τα Αβ ανιχνεύονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα όχι μόνο ασθενών αλλά και υγιών ανθρώπων, γεγονός που υποδεικνύει πως συμμετέχουν σε λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και στη ρύθμιση της διεγερτικής συναπτικής διαβίβασης των νευρώνων του ιππόκαμπου [150]. Η αυξημένη συσσώρευση του Αβ σε αμυλοειδείς πλάκες έπειτα από την αλληλεπίδρασή του με την αποΕ4 αποτελεί μία από τις αιτίες της παθογένεσης της νόσου του Alzheimer, καθώς οι αμυλοειδείς πλάκες αποτελοίν που πάσχουν από τη νόσο (εικόνα 36).



Εικόνα 36. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Alzheimer. Ένα νευροϊνιδιακό δεμάτιο (που παρουσιάζεται με το βέλος) και μία αμυλοειδής πλάκα (δομή σχήματος οβάλ στο δεξί μέρος της εικόνας) από τμήμα ανθρώπινου εγκεφάλου, έπειτα από χρώση με την τεχνική Bielschowsky [151].

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως η αποΕ διευκολύνει την απομάκρυνση του Αβ από τον εγκέφαλο επάγοντας την πρωτεόλυσή του από τουλάχιστον δύο τάξεις πρωτεασών [28]. Η παθογένεση

της νόσου του Alzheimer έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη ικανότητα της αποΕ4 να επάγει την πρωτεόλυση του Αβ συγκριτικά με τις αποΕ2 και αποΕ3 [28].

Τα επίπεδα της αποΕ-Arg61 σε πειραματικά μοντέλα μυός για τη νόσο Alzheimer (βλ. παράγραφο 2.6) είναι κατά 40% χαμηλότερα από τα επίπεδα της αποΕ σε φυσιολογικά ποντίκια [152]. Παράλληλα, τα επίπεδα mRNA που κωδικεύουν την αποΕ τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα ποντίκια «μοντέλα του Alzheimer» είναι πανομοιότυπα [152]. Η έκκριση χαμηλότερων επιπέδων αποΕ-Arg61 (σε σχέση πάντα με την αποΕ σε φυσιολογικά ποντίκια) και η μη συσσώρευσή της στα αστροκύτταρα υποδεικνύουν πως μέρος αυτής, αφού εκφραστεί, οδηγείται σε καταβολισμό. Η στενότερη αλληλεπίδραση της αμινο- με την καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ4 συγκριτικά με τις άλλες δύο ισομορφές, συντελεί στη μεγαλύτερη αστάθεια της δομής της, τη συσσώρευσή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την αναγνώρισή της ως «ελλιπώς αναδιπλωμένης». Με τον τρόπο αυτό προκαλείται στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιούνται μονοπάτια σηματοδότησης, όπως η απόκριση αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης (UPR, Unfolding Protein Response). Η απόκριση αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης μεταξύ άλλων ενισχύει τον καταβολισμό πρωτεϊνών που έχουν αναδιπλωθεί ελλιπώς [152, 153]. Στην προκειμένη περίπτωση, τα μειωμένα επίπεδα αποΕ4 μπορούν να συσχετιστούν με την ελλιπή απομάκρυνση του Αβ μέσω επαγωγής της πρωτεόλυσής του, που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, και συνεπώς να συντελέσουν στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer.

Σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση, τη σταθεροποίηση και τη λειτουργικότητα του συστήματος μικροσωληνίσκων των νευραξόνων παίζει μεταξύ άλλων και η πρωτεΐνη Tau, που εκφράζεται σε αφθονία στο κεντρικό νευρικό σύστημα [154]. Η υπερφωσφορυλιωμένη και συσσωρευμένη Tau πρωτεΐνη αποτελεί το κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων, που αποτελούν μικροσκοπικά νευροπαθολογικά ευρήματα στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer (εικόνα 36). Η αποΕ3 αλληλεπιδρά ισχυρά με την Tau πρωτεΐνη και ενδέχεται να προάγει τη φωσφορυλίωσή της, συντελώντας στην αποφυγή της αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων [154, 155]. Η αποΕ4 δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με την Tau πρωτεΐνη και ενδέχεται να προάγει τη φωσφορυλίωσή της, συντελώντας έτσι στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer [155, 156].

Τέλος, η αλληλεπίδραση των περιοχών που παρουσιάζει η αποΕ4 την καθιστά περισσότερο επιρρεπή σε πρωτεόλυση συγκριτικά με τις αποΕ2 και αποΕ3. Η πρωτεόλυση της αποΕ4 οδηγεί σε ελλειμματικές μορφές της στο καρβοξυ-τελικό άκρο, οι οποίες εκδηλώνουν νευροτοξική δράση και έχουν βρεθεί σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο του Alzheimer [148, 157].

#### 4.3 Συσχέτιση της αποΕ με τη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (ΛΠΣ)

Η λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (ΛΠΣ) είναι μία ασθένεια που συνδέεται με λιποπρωτεϊνικά χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν στην υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ και χαρακτηρίζεται από ιδιόμορφη ιστολογία του σπειράματος των νεφρών, όπου εντοπίζονται εναποθέσεις λιποπρωτεϊνών σε μορφή θρόμβων [158-161]. Όλοι οι ασθενείς με ΛΠΣ φέρουν σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε. Κληρονομείται με επικρατή υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από ατελή διεισδυτικότητα [162].

Η νόσος χαρακτηρίζεται κλινικά από εμφάνιση νεφρικού συνδρόμου, συνήθως στην εφηβεία, με σχετικά ραγδαία εξέλιξη σε νεφρική δυσλειτουργία και ανάπτυξη νεφροσκλήρυνσης. Η εξέλιξη της νεφρικής νόσου στην ΛΠΣ χαρακτηρίζεται από διόγκωση του μεσάγγειου χώρου, διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τμηματική σκλήρυνση [163].

Η διάγνωση της ΛΠΣ επιβεβαιώνεται ιστολογικά και με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η οπτική μικροσκοπία δείχνει ότι ο αυλός των τριχοειδών στο προσβεβλημένο από τη νόσο σπείραμα έχει διασταλεί έντονα από ωχρή ύλη που προσομοιάζει με πλέγμα (εικόνα 37Α). Με ηλεκτρονική μικροσκοπία, είναι ευδιάκριτοι οι λιποπρωτεϊνικοί θρόμβοι που εντοπίζονται στον αυλό των τριχοειδών του σπειράματος, καθώς και τα λιπιδικά κοκκία ποικίλων μεγεθών που τους αποτελούν (εικόνα 37B,Γ) [158, 164, 165]. Έπειτα από χρώση με χρωστικές Oil red-O ή Sudan παρατηρείται πως οι λιποπρωτεϊνικοί θρόμβοι έχουν την εμφάνιση «υπερδομής» αποτελούμενης από στρώσεις, γεγονός που υποδεικνύει πως οι λιποπρωτεϊνες έχουν εναποτεθεί σειριακά στο σπείραμα (εικόνα 37Δ). Οι παραπάνω δομές καθώς εναποτίθενται και σχηματίζουν στρώματα, συμπιέζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων των τριχοειδών (εικόνα 37B,Γ) [163]. Ειδικές χρώσεις ανοσοϊστοχημείας δείχνουν πως οι λιποπρωτεϊνικές εναποθέσεις περιλαμβάνουν απόΕ και αποΒ, που αποτελούν φυσιολογικά συστατικά των VLDL σωματιδίων και των υπολειμμάτων τους, των IDL [163].



Εικόνα 37. Εικόνες από σπειράματα ασθενών με ΛΠΣ. Α. Ο αυλός των τριχοειδών έχει διογκωθεί από ωχρές δομές που προσομοιάζουν με θρόμβους. (Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο. Χρώση PAS). Β και Γ. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι λιποπρωτεϊνικοί θρόμβοι αποτελούνται από διαφόρων μεγεθών κοκκία. Οι θρόμβοι στον αυλό των τριχοειδών συμπιέζουν τα

ενδοθηλιακά κύτταρα. («Cap», ο αυλός τριχοειδούς, «En», τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα βέλη δείχνουν τη σπειραματική μεμβράνη βάσης). Μήκος γραμμών: 50, 5 και 1mm στις εικόνες Α, Β και Γ αντίστοιχα. Δ. Εικόνα λιποπρωτεϊνικού θρόμβου με εμφανή την επιστρωμάτωση των κοκκίων, που έχει τη μορφή «δακτυλικού αποτυπώματος». (Εικόνες 37 Α, Β, Γ από [158] και εικόνα 37 Δ από [165]

Στους χώρους κάτω από το ενδοθήλιο και γύρω από τα μεσαγγειακά κύτταρα παρατηρείται συχνά «οσμιοφιλική» ύλη που προσομοιάζει στους λιποπρωτεϊνικούς θρόμβους, ακόμη κι όταν δεν παρατηρούνται θρόμβοι στον αυλό των τριχοειδών [165]. Θεωρείται πως αυτή η ύλη, που έχει ακανόνιστο σχήμα και διαφοροποιείται από την εμφάνιση «δακτυλικών αποτυπωμάτων» των λιποπρωτεϊνικών θρόμβων, εναποτίθεται αρχικά ως πρόδρομη των θρόμβων στο χώρο κάτω από το ενδοθήλιο και τους χώρους του μεσαγγείου και πως θραύσματά της εισρέουν στον αυλό των τριχοειδών των τριχοειδών [165].

Οι ασθενείς που πάσχουν από ΛΠΣ παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο ένα λιποπρωτεϊνικό προφίλ χαρακτηριστικό της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ [158, 159]. Το πλάσμα τους περιλαμβάνει αυξημένα επίπεδα IDL σωματιδίων και περίπου δύο φορές υψηλότερα επίπεδα αποΕ από τα φυσιολογικά. Επίσης, οι ασθενείς εμφανίζουν πρωτεϊνουρία [159].

Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ασθενών που ήταν φορείς μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη ΛΠΣ, παρουσίαζαν τους χαρακτηριστικούς λιποπρωτεϊνικούς θρόμβους στο σπείραμα των νεφρών τους, αλλά δεν εμφάνιζαν ανωμαλία στα επίπεδα τριγλυκεριδίων και συνολικής χοληστερόλης στο αίμα τους (νορμολιπιδαιμικοί) [166]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως οι λιποπρωτεϊνικοί θρόμβοι δεν επάγονται από συστηματική υπερλιπιδαιμία, αλλά μπορεί να σχηματιστούν από συσσωμάτωση στο σπείραμα λιποπρωτεϊνών που φέρουν μεταλλαγμένα μόρια αποΕ [166]. Είναι αξιοσημείωτο πως η μεταμόσχευση νεφρών σε ασθενείς με ΛΠΣ, οδηγεί κατά κανόνα στην επανεμφάνιση της νόσου, υποδεικνύοντας ότι η ΛΠΣ οφείλεται σε παράγοντες εκτός του νεφρού και σχετίζεται με τις μεταλλάξεις στο μόριο της απολιποπρωτεΐνης Ε που εντοπίζονται στους ασθενείς [163, 167]. Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΛΠΣ [162, 168, 169]. Πίνακας 4. Μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΛΠΣ. (Τροποποιημένος πίνακας από [162]).

Όνομα Μετάλλαξης	Υποκατάσταση αμινοξέων
AπoE Sendai	Arg145→Pro
ApoE1	Gly156-Gly173→0
AπoE Kyoto	Arg25→Cys
AπoE Tokyo-Maebashi	Leu141-Lys143→0 ή Arg142-Leu144→0
AπoE Tsukuba	Arg114→Cys
AπoE Chicago	Arg147→Pro
AπoE Okayama	Arg150→Gly
AπoE Guangzhou	Arg150→Pro
AπoE Hong Kong	Asp230→Tyr
AπoE Modena	Arg150→Cys
AπoE Las Vegas	Ala152→Lys
ΑποΕ5	Glu3→Lys
AπoE Osaka ή Kurashiki	Arg158→Pro

Οι ασθενείς με ΛΠΣ φέρουν τις μεταλλάξεις της αποΕ σε ετερόζυγη μορφή. Μέχρι σήμερα, έχει περιγραφεί η περίπτωση μόνο ενός ασθενή που παρουσίαζε ομοζυγωτία ως προς μεταλλαγμένη αποΕ (την R147P) [170]. Η εμφάνιση της νόσου κατ' εξοχήν σε ετεροζυγώτες μπορεί να συσχετιστεί με τη σπανιότητα της νόσου ή την αδυναμία επιβίωσης του ανθρώπου όταν υπάρχει ομοζυγωτία στη μεταλλαγμένη αποΕ [162, 170]. Οι περισσότεροι ασθενείς που πάσχουν από ΛΠΣ φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στην αποΕ όπου έχει λάβει χώρα υποκατάσταση μίας αργινίνης από προλίνη. Η μετάλλαξη που παρατηρείται με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ΛΠΣ είναι η αποΕ Sendai, που αντιστοιχεί στην υποκατάσταση της αργινίνης 145 από προλίνη και είναι η μετάλλαξη που εντοπίστηκε στον πρώτο ασθενή που διαγνώστηκε η παραπάνω νόσος [164]. Η προλίνη αποτελεί ιδιαίτερο αμινοξύ ως προς το ότι η πλευρική αλυσίδα της έχει κυκλική δομή και την καθιστά άκαμπτη. Στην ακαμψία της δομής της οφείλεται ο χαρακτηρισμός της ως αμινοξέος που σπάει τη δομή α-έλικας (helix-breaker) στις σφαιρικές πρωτεΐνες που την περιλαμβάνουν [158, 162]. Οι μεταλλάξεις υποκατάστασης της αργινίνης με προλίνη μπορεί να αποσταθεροποιούν τη δομή των μορίων της αποΕ και να καθιστούν προβληματικά τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια στα οποία συμμετέχουν οι μεταλλαγμένες αποΕ.

Η πιο πειστική ένδειξη της εμπλοκής της μεταλλαγμένης αποΕ στην παθοφυσιολογία της νόσου προκύπτει από πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα. Πράγματι, η επαγώμενη από ιούς έκφραση της αποΕ Sendai σε αποΕ knock-out ποντίκια οδήγησε σε ιστολογικές αλλαγές, ίδιες με εκείνες που παρατηρούνται σε περιπτώσεις ανθρώπων που πάσχουν από ΛΠΣ [171]. Αν και υπάρχει άμεση συσχέτιση των μεταλλάξεων της αποΕ με τη ΛΠΣ, και έχουν γίνει προσπάθειες κατανόησης του τρόπου σχηματισμού και εναπόθεσης λιποπρωτεϊνών στο σπείραμα, ο μηχανισμός παθογένεσης παραμένει άγνωστος. Η μελέτη των λειτουργικών και δομικών επιπτώσεων που προκαλούν οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με ΛΠΣ στο μόριο της αποΕ

κρίνεται απαραίτητη για την προσέγγιση και τον προσδιορισμό του μηχανισμού παθογένεσης της ΛΠΣ.

### 4.3.1 Προσπάθειες προσέγγισης του μηχανισμού παθογένεσης της ΛΠΣ

Η εμφάνιση των λιποπρωτεϊνικών θρόμβων στα νεφρά αποτελεί ιδιόμορφο χαρακτηριστικό της ΛΠΣ, καθώς είναι γνωστό πως τα αγγεία εκτός του σπειράματος παραμένουν φυσιολογικά [162]. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι πως ο σχηματισμός λιποπρωτεϊνικών συσσωματωμάτων μέσα στα τριχοειδή αγγεία διευκολύνεται από το μικροπεριβάλλον του νεφρικού σπειράματος. Πράγματι, η αύξηση της συγκέντρωσης λιποπρωτεϊνών που περιλαμβάνουν μη φυσιολογικά διαμορφωμένα μόρια αποΕ στο εσωτερικό των αγγείων κατά τη διάρκεια της υπερδιήθησης υγρών και μικρομορίων, μπορεί να προδιαθέσει στην ανάπτυξη λιποπρωτείνικών θρόμβων. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί πως λόγω της υποκατάστασης ή διαγραφής αμινοξέων, το ηλεκτρικό φορτίο των μεταλλαγμένων ισομορφών μπορεί να διαφέρει από αυτό των φυσιολογικών αποΕ και επομένως μπορεί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για την αρνητικά φορτισμένη βασική μεμβράνη του σπειράματος [162].

Έχει προταθεί πως το οξειδωτικό στρες μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών νεφρικών νόσων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η φυσιολογική αποΕ παρουσιάζει σημαντικές αντι-οξειδωτικές ιδιότητες και πως η υπεύθυνη περιοχή για αυτές εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης στους υποδοχείς της αποΕ [172].

Τέλος, έχει προταθεί πως η συγκρότηση λιποπρωτεϊνικών θρόμβων μπορεί να λαμβάνει χώρα στο μεσάγγειο χώρο και σε δεύτερο στάδιο, αυτοί οι θρόμβοι να μεταφέρονται στο χώρο κάτω από το ενδοθήλιο και στο εσωτερικό των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος. Ο προσδιορισμός «οσμιοφιλικής» ύλης σε χώρους κάτω από το ενδοθήλιο της σπειραματικής μεμβράνης βάσης και γύρω από το μεσάγγειο βρίσκεται σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση [162].

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

#### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε είναι μία πρωτεΐνη που παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης των λιπιδίων και της χοληστερόλης στον οργανισμό. Η αλληλεπίδρασή της με πλήθος ενζύμων και υποδοχέων είναι κρίσιμη για την εκκαθάριση των χυλομικρών και των LDL από την κυκλοφορία του αίματος καθώς και τη διεξαγωγή της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Ο πολυ-λειτουργικός ρόλος της αποΕ επιτυγχάνεται χάρη στα ιδιαίτερα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά που διαθέτει, γεγονός που καθιστά άρρηκτη τη σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας στο μόριο της αποΕ.

Το υψηλό ποσοστό δομής α-έλικας σε συνδυασμό με τη σημαντική δομική πλαστικότητα της αποΕ, της επιτρέπουν να περιέρχεται μεταξύ δύο καταστάσεων, μίας ελεύθερης λιπιδίων και μίας προσδεδεμένης σε λιποπρωτεΐνες. Η μετάβαση από τη μία κατάσταση στην άλλη, που είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του μορίου, προϋποθέτει εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση της αποΕ. Τυχόν αλλαγή σε κάποιο αμινοξύ της πρωτεΐνης μπορεί να μεταβάλλει τις θερμοδυναμικές ιδιότητές της συντελώντας σε «κλείδωμα» της αποΕ σε κάποια μη λειτουργική ή λιγότερο λειτουργική διαμόρφωση. Επίσης, η εισαγωγή μετάλλαξης, ακόμη και σημειακής, μπορεί να οδηγήσει σε τροποποιημένη αλληλεπίδραση της αποΕ με κάποιο ένζυμο ή υποδοχέα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφοροποιημένης λειτουργίας της αποΕ, ελλατωματικής ή και βελτιωμένης έναντι της φυσιολογικής.

Στην παρούσα μελέτη έγινε η υπόθεση πως σημειακές μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ που σχετίζονται με δυσλιπιδαιμίες προκαλούν αλλαγές στη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα του μορίου, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούν τη βάση για αλλαγές στη λειτουργία. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, καθώς και η επιβεβαίωση του παθογενούς δυναμικού των μεταλλάξεων που μελετήσαμε στα πλαίσια της χρήσης τους ως διαγνωστικών δεικτών. Επίσης, στην παρούσα εργασία θέσαμε στόχο τη χρήση φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων ως εργαλείων για τη διερεύνηση της σχέσης δομής-λειτουργίας της αποΕ. Τέλος, ένας ακόμη σκοπός της διατριβής ήταν η ανάπτυξη νέων ιδεών περί των μηχανισμών παθογένεσης των δυσλιπιδαιμιών που μελετήθηκαν (ΥΛΠ ΙΙΙ, ΛΠΣ, υπερτριγλυκεριδαιμία).

Για να προσεγγίσουμε τους σκοπούς της εργασίας, χρησιμοποιήσαμε το ίδιο σύστημα έκφρασης κυττάρων για την παραγωγή της αποΕ αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών της. Απομονώσαμε και καθαρίσαμε τις εκφρασμένες αποΕ προκειμένου να μελετήσουμε τα δομικά, βιοφυσικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά τους. Λάβαμε τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες των μεταλλαγμένων και μη αποΕ προς παρατήρηση τυχόν διαφορών στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής των μορίων. Επίσης μελετήσαμε το προφίλ θερμικής και χημικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων αποΕ έναντι της φυσιολογικής για να συγκρίνουμε τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των μορίων. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε αν η εισαγωγή των μεταλλάξεων επηρεάζει την έκταση των υδρόφοβων περιοχών της αποΕ που εκτίθενται στο διαλύτη, με τη χρήση φθορίζοντος ιχνηθέτη. Μελετήθηκε η διαφοροποίηση στο βαθμό ολιγομερισμού μεταξύ των μεταλλαγμένων και μη αποΕ με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η λειτουργική δοκιμασία της κινητικής αναμόρφωσης αιωρήματος DMPC από τις αποΕ, με στόχο να παρατηρηθεί τυχόν αδυναμία των μεταλλαγμένων αποΕ να προσδέσουν λιπίδια σε αντιπαραβολή με την αποΕ αγρίου τύπου.

Σε κάποιες περιπτώσεις, η διαφοροποίηση των δομικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων μεταξύ των ελεύθερων λιπιδίων μεταλλαγμένων και μη αποΕ, υποδείκνυε την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης των βιοφυσικών χαρακτηριστικών των αποΕ στη λιπιδιωμένη μορφή τους. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν ανασυγκροτημένα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με τις αποΕ (μεταλλαγμένες και μη). Στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια τύπου HDL έλαβε χώρα μελέτη της δευτεροταγούς δομής της περιεχόμενης αποΕ, του προφίλ θερμικής αποδιάταξης των λιποπρωτεϊνών, της συσσωμάτωσής τους καθώς και της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

#### ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

#### 6.1 Μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός είναι η μέθοδος εισαγωγής νέων γονιδίων σε έναν οργανισμό. Τα γονίδια που εισάγονται προσδίδουν συνήθως στον ξενιστή νέο φαινότυπο, ώστε το διαφορετικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό του μετασχηματισμένου έναντι του μη μετασχηματισμένου οργανισμού να αποτελεί κριτήριο διαφοροποίησής τους. Οι μετασχηματισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιλεγούν με βάση την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε νέα θρεπτικά μέσα, να ανθίστανται σε ουσίες που επηρεάζουν κάποια μεταβολική τους διεργασία, όπως τα αντιβιοτικά, ή και με ορατή αλλαγή στη μορφολογία των αποικιών. Τα κύτταρα που υφίστανται μεταβολή της θερμοκρασίας να εισαγάγουν στο εσωτερικό τους τον φορέα κλωνοποίησης μέσω οπών που φέρουν στην πλασματική τους μεμβράνη.

### 6.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος και επίστρωση τρυβλίων

- Αυτόκαυστος (Sanyo, Labo Autoclave)
- Τρυπτόνη (Applichem)
- Εκχύλισμα ζύμης (Applichem)
- NaCl (Merck)
- Άγαρ (Applichem)
- Λύχνος
- Στείρα τρυβλία (Costar)
- Αμπικιλλίνη (Applichem) ή Καναμυκίνη (Applichem)
- Διάλυμα αντιβιοτικού (stock) (αμπικιλλίνη: 100mg/mL ή καναμυκίνη: 50mg/mL, ανάλογα με το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται) (φυλάσσεται στους -20°C)
- Διάλυμα αιθανόλης 70% ν/ν

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό LB με τη διαλυτοποίηση 10g τρυπτόνης, 5g εκχυλίσματος ζύμης και 10g χλωριούχου νατρίου σε 1L νερό. Το θρεπτικό υλικό καθώς και τα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν στο μετασχηματισμό αποστειρώνονται στην αυτόκαυστο. Η επιφάνεια του εργαστηριακού πάγκου καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης 70% v/v και ανάβεται λύχνος με χαμηλή φλόγα, ώστε να δημιουργηθούν στείρες συνθήκες. Προστίθεται αντιβιοτικό στο διάλυμα LB-άγαρ σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL. Το διάλυμα αναδεύεται και αποχύνεται στο εσωτερικό αποστειρωμένων τρυβλίων ώστε να σχηματιστεί μία στιβάδα πάχους ~0,5cm. Τα τρυβλία που έχουν επιστρωθεί αφήνονται για λίγα λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί το περιεχόμενο

διάλυμα LB-άγαρ-αντιβιοτικού και ακολούθως επωάζονται στους 37°C ή αποθηκεύονται στους 4°C αναποδογυρισμένα (με τη στιβάδα του θρεπτικού υλικού προς τα πάνω).

# 6.1.1.1 Επίστρωση τρυβλίων LB-αγαρ για διαλογή χρώματος (Έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης μεταλλαξιγένεσης)

- X-gal (Sigma-Aldrich)
- IPTG (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα IPTG 10mM (Το IPTG διαλυτοποιείται σε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό).
- Διάλυμα X-gal 2% w/v. (Το X-gal διαλυτοποιείται σε DMSO. Παρασκευάζεται κάθε φορά φρέσκο διάλυμα πριν από τη χρήση).

Για την επίστρωση τρυβλίων LB-άγαρ ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 6.1.1. Στα επιστρωμένα τρυβλία που περιελάμβαναν αντιβιοτικό, προστέθηκαν 100μL διαλύματος IPTG και απλώθηκαν σε όλη την επιφάνεια με τη χρήση κεκαμμένης γυάλινης ράβδου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100μL διαλύματος X-gal 2% w/v και απλώθηκαν επίσης στην επιφάνεια των τρυβλίων. Τα τρυβλία καλύφθηκαν και αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30min, πριν την επίστρωση του αιωρήματος των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

### 6.1.2 Παραγωγή δεκτικών για μετασχηματισμό κυττάρων E.coli

- Δεκτικά (competent) κύτταρα E.coli [XL1-Blue (Stratagene) για αναπαραγωγή πλασμιδιακού DNA ή BL21-Gold DE3 (Stratagene) για έκφραση πρωτεΐνης]
- Αποστειρωμένο διάλυμα LB
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Αυτόκαυστος (Sanyo, Labo Autoclave)
- CaCl<sub>2</sub> (Fluka)
- Tris (Applichem)
- Γλυκερόλη 100% (Sigma) (Αποστειρώνεται στην αυτόκαυστο και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου)

Διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 100mM, Tris 20mM pH 8,0 (Παρασκευάζεται φρέσκο και αποστειρώνεται στην αυτόκαυστο)

Διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 100mM, Tris 20mM pH 8,0, 15% v/v γλυκερόλη (Παρασκευάζεται φρέσκο και αποστειρώνεται στην αυτόκαυστο)

 Μεταλλικός βρόχος, Γυάλινη κωνική φιάλη 1L, αποστειρωμένα σιφώνια μίας χρήσης, δοχεία τύπου falcon (50mL) και δοχεία τύπου «eppendorf» (1,5mL)

- Φυγόκεντρος (Universal 320)
- Φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS)
- Πλαστικές κυψελίδες

Λαμβάνουμε επιδεκτικά προς μετασχηματισμό κύτταρα με την επαφή αποστειρωμένου μεταλλικού βρόχου στην επιφάνεια του αιωρήματός τους και τα μεταφέρουμε σε δοχείο τύπου falcon που περιέχει 4mL αποστειρωμένου διαλύματος LB, υπό στείρες συνθήκες. Η επιφάνεια του δοχείου καλύπτεται με καπάκι (χαλαρά βιδωμένο) και η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο και αναπτύσσεται όλη τη νύχτα, υπό ανάδευση, σε 220rpm και 37°C. Την επόμενη μέρα, γίνεται αραίωση 1:100 της καλλιέργειας, με τη μεταφορά 2mL καλλιέργειας σε 198mL αποστειρωμένου διαλύματος LB σε στείρα κωνική φιάλη χωριτικότητας 1L. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε 220rpm, μέχρι η απορρόφηση του αιωρήματος στα 590nm να γίνει 0,6. Το αιώρημα φυγοκεντρείται για 20min στους 4°C σε 2500rpm. Γίνεται απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και το σύνολο των βακτηριακών κυττάρων αναδιασπείρεται σε 100mL αποστειρωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 100mM, Tris 20mM pH8,0. Το προκύπτον αιώρημα επωάζεται σε πάγο για 30min. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 20min, στους 4°C, σε 2500rpm. Αποχύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 2mL αποστειρωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 100mM, Tris 20mM pH8,0, 15% ν/ν γλυκερόλη, που έχει προψυχθεί σε πάγο. Το αιώρημα τοποθετείται σε πάγο και κλάσματα 50μL αιωρήματος μεταφέρονται σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου eppendorf. Τα δοχεία παραμένουν υπό ψύξη εντός λουτρού πάγου και μεταφέρονται αμέσως σε καταψύκτη στους -80°C για μακροχρόνια συντήρησή τους.

### 6.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

- Επιδεκτικά για μετασχηματισμό κύτταρα
- Μερκαπτοαιθανόλη (Applichem)
- MgCl<sub>2</sub> (Fluka)
- KCI (Sigma Aldrich)
- Φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,2μm (Whatman)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB
- Μεταλλική πλάκα ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (Labnet)
- Λύχνος
- Διάλυμα αιθανόλης 70% v/v
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης λαμβάνει χώρα μετασχηματισμός κυττάρων E.coli με φορέα πλασμιδιακό DNA, το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (εδώ: αμπικιλλίνη ή καναμυκίνη).

Μεταφέρονται τα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80°C όπου φυλάσσονται, σε πάγο για να αποψυχθούν. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου «eppendorf» που περιέχει 50μl επιδεκτικών κυττάρων, προστίθενται 1-10ng πλασμιδιακού DNA καθώς και 0,9μl μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση των συστατικών για να αναμιχθούν και τοποθέτησή τους σε πάγο για 30min. Έπειτα θερμαίνονται για 45sec στους 42°C και μεταφέρονται πάλι στον πάγο για 2min. Στη συνέχεια προστίθενται 950μl θρεπτικού μέσου LB. Το φιαλίδιο με τα κύτταρα που έχουν υποστεί μετασχηματισμό εισάγεται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220rpm) για 1h.

## 6.1.3.1 Μετασχηματισμός των υπερ-επιδεκτικών XL10-Gold κυττάρων με πλασμιδιακό DNA που έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση.

- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)
- Αποστειρωμένο διάλυμα θρεπτικού υλικού SOC

(Για την παρασκευή αποστειρωμένου διαλύματος SOC, αρχικά παρασκευάζεται και αποστειρώνεται διάλυμα τρυπτόνης 0.02g/mL, εκχυλίσματος ζύμης 0.005g/mL, NaCl 10mM και KCl 2,5mM. Πριν τη χρήση, προστίθεται φιλτραρισμένο (από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2μm) διάλυμα MgCl<sub>2</sub> (Cτελ=10mM) και φιλτραρισμένο διάλυμα γλυκόζης (Cτελ=20mM). Πριν τη χρήση του στο μετασχηματισμό, το θρεπτικό υλικό προθερμαίνεται στους 42°C.

Για το μετασχηματισμό μεταλλαγμένου πλασμιδιακού φορέα εντός βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκαν τα υπερ-επιδεκτικά XL10-Gold κύτταρα που παρέχονται από το kit.

Πριν το μετασχηματισμό, μεταφέρεται από τους -80°C ένα δοχείο με 45μL αιωρήματος XL10-Gold κυττάρων εντός λουτρού πάγου. Μόλις το αιώρημα αποψυχθεί, προστίθενται 2μL βμερκαπτοαιθανόλης (που περιλαμβάνεται στο kit). Το περιεχόμενο του δοχείου αναδεύεται ελαφρά και τοποθετείται στον πάγο ανά διαστήματα 2min, για 10min. Μεταφέρονται 5μL μεταλλαγμένου DNA που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Dpn I. Το περιεχόμενο του δοχείου αναδεύεται ελαφρά και αφήνεται σε λουτρό πάγου για 30min. Μετά την παρέλευση 30min, το δοχείο μεταφέρεται σε θερμαινόμενη πλάκα 42°C, για 30s. Στη συνέχεια, μεταφέρεται εντός λουτρού πάγου για 2min. Ακολούθως, προστίθενται 450μL προθερμασμένου διαλύματος μέσου SOC και το δοχείο με τα μετασχηματισμένα XL10-Gold κύτταρα επωάζεται στους 37°C, για 1h, υπό ανάδευση (225rpm).

Παράλληλα με το μετασχηματισμό των υπερ-επιδεκτικών XL10-Gold κυττάρων με πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο έκφρασης απολιποπρωτεΐνης E3 έγιναν οι μετασχηματισμοί των XL10-Gold κυττάρων με τα control πλασμίδια που παρέχονται από το kit. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που υποδεικνύει το QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit.

#### 6.2 Μεταλλαξιγένεση

## 6.2.1 Αρχή της τυποποιημένης μεθόδου μεταλλαξιγένεσης «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)».

Στην τυποποιημένη «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis» δοκιμασία λαμβάνει χώρα μία «τύπου PCR» αντίδραση εισαγωγής σημειακής μετάλλαξης στην αλληλουχία πλασμιδιακού DNA. Για την εισαγωγή της μετάλλαξης απαιτείται η χρήση κατάλληλων εκκινητών. Οι εκκινητές, νοηματικός και αντι-νοηματικός, είναι συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με τμήμα καθεμίας από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην τυποποιημένη αντίδραση μεταλλαξιγένεσης περιλαμβάνουν στη μέση περίπου της αλληλουχίας τους μία ή περισσότερες βάσεις μη συμπληρωματικές με το εκμαγείο, που κωδικοποιούν το επιθυμητό προς εισαγωγή αμινοξύ.



Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση σταδίων της διαδικασίας μεταλλαξιγένεσης «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis» (Τροποποιημένη εικόνα από [100]). Οι γκρι κύκλοι αναπαριστούν το μητρικό πλασμιδιακό DNA, ενώ οι κύκλοι με τη διακεκομένη γραμμή αναπαριστούν το νεοσυντιθέμενο μεταλλαγμένο DNA. Τα βέλη υποδεικνύουν τους εκκινητές 1 και 2 και τα τρίγωνα τη θέση της μετάλλαξης. Οι μικρές κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις ασυνέχειες στα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA.

Στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 95°C, οι εκκινητές προσδένονται στα συμπληρωματικά τμήματα DNA του εκμαγείου (εικόνα 38A) και η αλληλουχία τους επιμηκύνεται με την επίδραση της DNA πολυμεράσης παρουσία μίγματος δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTPs) σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό, συντίθενται νέοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί μεν των μητρικών, που όμως περιλαμβάνουν και την εισαχθείσα μετάλλαξη (εικόνα 38B). Οι νέοι, μεταλλαγμένοι κλώνοι που προκύπτουν περιλαμβάνουν μία ασυνέχεια στην αλληλουχία DNA τους, και δεν είναι κυκλικοί (nicked DNA). Πριν να ξεκινήσει ο επόμενος κύκλος πολυμερισμού, λαμβάνει χώρα αποσύνδεση των δύο κλώνων σε θερμοκρασία 95°C και επανασύνδεση των εκκινητών στα συμπληρωματικά τμήματα της μητρικής (μη μεταλλαγμένης) και της θυγατρικής μεταλλαγμένης αλληλουχίας DNA. Εξαιτίας του ότι οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι ώστε να είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και με

καθέναν από τους δύο κλώνους της ίδιας περιοχής DNA, δεν μπορεί να λάβει χώρα περαιτέρω επέκτασή τους όταν προσδεθούν σε μεταλλαγμένο θυγατρικό κλώνο (εικόνα 38Γ). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να γεφυρώσει την ασυνέχεια που έχει δημιουργηθεί στο μεταλλαγμένο κλώνο. Με τον τρόπο αυτό, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis» συντίθενται μεταλλαγμένα μόρια DNA από τη μητρική, μη μεταλλαγμένη αλληλουχία DNA και τα προϊόντα της αντιδρασης είναι όλα κομμένα σε ένα σημείο (nicked).

Το μητρικό DNA είναι μεθυλιωμένο σε αντιδιαστολή με το νεοσυντιθέμενο. Προκειμένου να απομακρυνθεί το μη μεταλλαγμένο DNA (μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο) που περιέχεται στο διάλυμα της αντίδρασης, γίνεται πέψη με το ένζυμο Dpn I. Τέλος, το μεταλλαγμένο DNA μετασχηματίζεται σε υπερ-επιδεκτικά κύτταρα XL10-Gold προκειμένου να αναπαραχθεί και να υποστεί αλληλούχιση προς επιβεβαίωση της επιθυμητής μεταλλαγμένης αλληλουχίας του.

## 6.2.2 Σχεδιασμός Εκκινητών (Primers) για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία πλασμιδιακού DNA.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει το QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στη συνέχεια.

 Για τη μετάλλαξη της απολιποπρωτεΐνης Ε4 σε Ε3, που περιλαμβάνει την μετατροπή της αργινίνης 112 σε κυστεΐνη (R112C) σχεδιάστηκαν οι εκκινητές:

E4R112C νοηματικός:

5'-GCG GAC ATG GAG GAC GTG TGC GGC CGC CTG GTG CAG-3'

E4R112C αντινοηματικός:

5'-CTG CAC CAG GCG GCC GCA CAC GTC CTC CAT GTC CGC-3'

Για τη μετάλλαξη της απολιποπρωτεΐνης Ε3 αγρίου τύπου στην μεταλλαγμένη E3R145P
 σχεδιάστηκαν οι εκκινητές:

E3R145P νοηματικός:

5'-CCT GCG CAA GCT GCC TAA GCG GCT CCT CCG-3'

E3R145P αντινοηματικός:

5'-CTG GTA CAC TGC CAG GGG CTT CTG CAG GTC ATC-3'

Για τη μετάλλαξη της απολιποπρωτεΐνης Ε3 αγρίου τύπου στην μεταλλαγμένη E3R147P σχεδιάστηκαν οι εκκινητές:

E3R147P νοηματικός:

5'-CGC AAG CTG CGT AAG CCG CTC CTC CGC G-3'

E3R147P αντινοηματικός:

5'-CGC GGA GGA GCG GCT TAC GCA GCT TGC G-3'

Για τη μετάλλαξη της απολιποπρωτεΐνης Ε3 αγρίου τύπου στην μεταλλαγμένη E3R158P σχεδιάστηκαν οι εκκινητές:

E3R158P νοηματικός:

5'-GAT GAC CTG CAG AAG CCC CTG GCA GTG TAC CAG-3'

E3R158P αντινοηματικός:

5'-CTG GTA CAC TGC CAG GGG CTT CTG CAG GTC ATC -3'

Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν και καθαρίστηκαν από την «VBC BIOTECH» (Αυστρία).

6.2.3 Εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του «QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit»

- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)
- Διαλύματα 250μg/mL πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών
- Πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει το γονίδιο έκφρασης της αποΕ

Η παρασκευή του διαλύματος των αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης περιλαμβάνει την εισαγωγή εντός δοχείου τύπου «eppendorf» 100ng του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, 5μL QuikSolution, 1μL μίγματος dNTP, 125ng νοηματικού εκκινητή (για την εισαγωγή της μετάλλαξης στον κλώνο 5΄-3΄) και 125ng αντινοηματικού εκκινητή (για την εισαγωγή της μετάλλαξης στον 3΄-5΄ κλώνο του υποστρώματος DNA). Το διάλυμα συμπληρώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 50μL. Έπειτα προστίθεται 1μL PfuUltra HF DNA πολυμεράσης (2,5U/μL).

Το τυφλό διάλυμα αντίδρασης παρασκευάζεται με την εισαγωγή 10ng του control DNAυποστρώματος (pWhitescript 4,5-kb control plasmid), 3μL QuikSolution, 1μL μίγματος dNTP, 125ng νοηματικού εκκινητή (primer #1) και 125ng αντινοηματικού εκκινητή (primer #2). Το διάλυμα συμπληρώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 50μL. Τέλος, προστίθεται 1μL PfuUltra HF DNA πολυμεράσης (2,5U/μL).

Το «pWhitescript 4,5-kb control» πλασμίδιο χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η ικανότητα των συστατικών του kit να οδηγήσουν σε επιτυχή αντίδραση μεταλλαξιγένεσης. Το πλασμίδιο control περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο λήξης (TAA) στην θέση που φυσιολογικά στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης θα υπήρχε το κωδικόνιο που κωδικοποιεί τη γλουταμίνη (CAA). Όταν τα υπερεπιδεκτικά ως προς μετασχηματισμό XL10-Gold κύτταρα (που παρέχονται από το kit), μετασχηματιστούν με το control πλασμίδιο και στρωθούν σε τρυβλίο LB-άγαρ που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη, θα αναπτυχθούν αποικίες λευκού χρώματος. Όταν όμως τα XL10-Gold κύτταρα μετασχηματιστούν με το μεταλλαγμένο pWhitescript 4,5-kb control πλασμίδιο που εκφράζει τη β-γαλακτοσιδάση και στρωθούν σε τρυβλίο LB-άγαρ που περιέχει αμπικιλλίνη, IPTG και X-gal, θα αναπτυχθούν αποικίες μπλε χρώματος. Οι μπλε αποικίες είναι συνέπεια επιτυχούς αντίδρασης μετάλλαξης καθώς παρουσία του IPTG επάγεται η έκφραση της βγαλακτοσιδάσης, η οποία έχοντας ως υπόστρωμα το X-gal παράγει προϊόν που έχει έντονο μπλε χρώμα.

Λαμβάνονται 5μL από τα διαλύματα των αντιδράσεων (control και μη) πριν να γίνει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) και φυλάσσονται στους -20°C. Έπειτα, τα διαλύματα των αντιδράσεων υφίστανται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού εντός PCR οργάνου. Οι παράμετροι που εισάγονται για την παραγωγή και εμπλουτισμό της μεταλλαγμένης αλληλουχίας ακολουθούν τις υποδείξεις που παρέχονται από το kit. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις στο όργανο PCR παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Παράμετροι που εισήχθηκαν στο πρόγραμμα του οργάνου PCR για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης.

Τμήμα	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	1	95°C	2min
		95°C	1min
2	18	66°C	50s
		68°C	17min
3	1	68°C	7min

Έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού τα δοχεία με τα προϊόντα της αντίδρασης μεταλλαξιγένεσης τοποθετούνται σε λουτρό πάγου για 2min. Λαμβάνονται 5μL από τα διαλύματα των αντιδράσεων για να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και να συγκριθούν με τα δείγματα 5μL που λήφθηκαν από τα αντίστοιχα διαλύματα πριν να διεξαχθούν οι αντιδράσεις.

Στο υπόλοιπο διάλυμα από τις αντιδράσεις προστίθεται το περιοριστικό ένζυμο Dpn I (10U/μL) για να γίνει πέψη του μητρικού DNA υποστρώματος. Το διάλυμα αναδεύεται καλά με τη χρήση πιπέτας, φυγοκεντρείται για 1min και επωάζεται για 1h στους 37°C. Ακολούθως, το διάλυμα μεταφέρεται στους -20°C για αποθήκευση.

### 6.3 Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

### 6.3.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Wide Mini-sub cell (Biorad)
- Φούρνος μικροκυμάτων

- Αγαρόζη (Biodiagnostics S.A.)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50x TAE (σύσταση: Tris-CH₃COOH 0,05M, EDTA 0,05M, pH 8,3)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (Γίνεται αραίωση 10mL διαλύματος 50x TAE με H<sub>2</sub>O σε συνολικό όγκο 500mL)
- Χτενάκια

Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού με την ανάμιξη 1g αγαρόζης σε 100mL διαλύματος 1x TAE. Το μίγμα μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 350Watt μέχρι να γίνει διαυγές ενώ παράλληλα αναδεύεται ανά διαστήματα για να γίνει ομοιογενές. Αφού διαυγαστεί, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου ή ψύχεται με τρεχούμενο νερό βρύσης για να κρυώσει και αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθετείται ειδικό χτενάκι που ορίζει τα πηγαδάκια φόρτωσης των δειγμάτων. Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί.

## 6.3.2 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση και προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

- Περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (Fermentas)
- Ρυθμιστικό διάλυμα EcoRI (Fermentas, σύσταση: 50 mM Tris-HCI, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100, 0.1mg/ml BSA, pH 7.5) Παρέχεται για χρήση με το ένζυμο EcoRI.

 Διάλυμα 10x BSA, (New England Biolabs). Το BSA χρησιμοποιείται για την σταθεροποίηση των περιοριστικών ενζύμων κατά την πέψη του DNA και την αποφυγή της προσκόλλησης του ενζύμου στα τοιχώματα του δοχείου της αντίδρασης.

- Μίγματα προτύπων μορίων DNA (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas)
- 6x Διάλυμα φόρτωσης και βαφής δείγματος, loading dye (Fermentas) (Παρέχεται μαζί με το μίγμα προτύπων μορίων DNA)
- Υδρόλουτρο

Επιλέγεται περιοριστική ενδονουκλεάση προς αναγνώριση και πέψη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλασμιδιακού DNA. Εδώ χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Ακολούθως αναμιγνύονται ~ 500ng από το πλασμιδιακό DNA με 1,0μL από το ρυθμιστικό διάλυμα «EcoRI με BSA», 1,0μL ενζύμου EcoRI και γίνεται συμπλήρωση με υπερκάθαρο νερό μέχρι συνολικού όγκου 15μL. Το δείγμα επωάζεται σε υδρόλουτρο στους 37°C για 1,5h κι έπειτα θερμαίνεται για 20min στους 80°C. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε πάγο. Στο διάλυμα προστίθενται 3μL διαλύματος φόρτωσης και βαφής (6x).

Τα δείγματα DNA (5μL) που λαμβάνονται από την αντίδραση εισαγωγής μετάλλαξης πριν και μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού, αναμιγνύονται με 2μL διαλύματος φόρτωσης και βαφής (6x) και 5μL υπερκάθαρου νερού. Τα δείγματα προς ανάλυση με άκοπο πλασμιδιακό DNA περιέχουν ~500ng DNA, 3μL διαλύματος φόρτωσης και βαφής (6x) και νερό μέχρι τελικού όγκου 18μL.

Παρασκευάζεται επίσης δείγμα με 7,0μL μίγματος προτύπων μορίων DNA, 3μL διαλύματος φόρτωσης και βαφής (6x) και 8,0μL υπερκαθαρού νερού. Το μέγεθος των περιεχόμενων στα δείγματα μορίων DNA ορίζεται από τις ζώνες του μίγματος προτύπων μορίων DNA γνωστού μεγέθους, καθώς αναλύονται με ηλεκτροφόρηση στην ίδια πηκτή.

## 6.3.3 Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Wide Mini-sub cell (Biorad)
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος, Power Pac 300 (Biorad)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)
- Τράπεζα UV (Vilber Loumat 365/312 nm)
- Φωτογραφική Μηχανή (Kodak DC120 200m)

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης, αφού προηγουμένως απομακρυνθεί το ειδικό χτενάκι. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με σταθερή τάση 90V για ~90min και λαμβάνει χώρα διαχωρισμός του DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση, γίνεται προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου εντός δοχείου που περιέχει την πηκτή αγαρόζης εμβαπτισμένη σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Λαμβάνει χώρα επώαση της πηκτής παρουσία 20μL βρωμιούχου αιθιδίου για 5-10min και ακολουθεί παρατήρηση των εμφανιζόμενων ζωνών DNA σε τράπεζα UV. Η εμφάνιση των ζωνών είναι δυνατή καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πηκτή αγαρόζης φωτογραφίζεται εκτεθημένη σε υπεριώδες φως.

## 6.4 Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με την τυποποιημένη δοκιμασία «QIAprep Spin Miniprep Kit» της QIAGEN

- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Φυγόκεντρος (Labnet)
- Στείρα τρυβλία με LB-άγαρ και αντιβιοτικό (σε Cτελ=100μg/mL)
- Γυάλινη ράβδος
- Μεταλλικός βρόχος
- Άγαρ (Applichem)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB (25g/L)
- Αμπικιλλίνη ή καναμυκίνη (Applichem)

- Διάλυμα αμπικιλλίνης ή καναμυκίνης(100mg/mL ή 50mg/mL αντίστοιχα)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
- Φυγόκεντρος (Labnet)
- Φυγόκεντρος (Universal 320)

Μεταφέρονται 50µL και 100µL μετασχηματισμένων βακτηρίων σε καθένα από 2 τρυβλία και διασπείρονται με χρήση γυάλινης ράβδου. Σε ένα τρυβλίο δεν μεταφέρονται βακτήρια και χρησιμοποιείται ως τυφλό. Τα τρυβλία μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 14-15h, προς ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων και σχηματισμό αποικιών.

Στη συνέχεια σε ένα δοχείο εισάγονται 15mL αποστειρωμένου διαλύματος LB και αντιβιοτικού (σε τελική συγκέντρωση 100µg/mL). Μεταφέρονται 5mL του διαλύματος LB-αντιβιοτικού σε καθένα από δύο αποστειρωμένα δοχεία τύπου falcon, χωριτικότητας 50mL. Στα δοχεία αυτά μεταφέρεται μία μοναδική αποικία με τη χρήση αποστειρωμένου βρόχου. Στο αρχικό δοχείο που περιέχονται πλέον 5mL διαλύματος LB-αμπικιλλίνης δεν προστίθεται αποικία βακτηρίων και χρησιμοποιείται η καλλιέργεια ως μάρτυρας (τυφλό). Τα δύο δοχεία με τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων καθώς και η καλλιέργεια-μάρτυρας μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, υπό ανάδευση (220rpm), όλη τη νύχτα (14-15h).

Την επόμενη μέρα εφ' όσον οι καλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί επαρκώς, λαμβάνονται 3,5mL αιωρήματος και φυγοκεντρούνται σε 4500rpm για 30min. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται στο ρυθμιστικό διάλυμα P1 (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNase A). Ακολουθεί αλκαλική λύση των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα P2 (200mM NaOH, 1% w/v). Το SDS διαλυτοποιεί τα φωσφολιπιδικά και πρωτεϊνικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, επιφέροντας λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών. Το NaOH αποδιατάσσει το χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό DNA καθώς και τις πρωτεΐνες. Η RNάση A, που προστίθεται στην αρχή της διαδικασίας, πέπτει επαρκώς το ελευθερούμενο RNA κατά την αλκαλική λύση. Στα χρονικά πλαίσια που απαιτούνται για τη βέλτιστη λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται η μέγιστη απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα χωρίς να απελευθερώνεται το χρωμοσωμικό DNA που σε κάποιες περιοχές του συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη. Το αλκαλικό λύμα εξουδετερώνεται με την προσθήκη του όξινου ρυθμιστικού διαλύματος N3 (GndHCl 4,2M, 0,9M CH<sub>3</sub>COOK, pH 4,8). Η υψηλή συγκέντρωση του άλατος CH<sub>3</sub>COONa που παράγεται, προκαλεί καταβύθιση του KDS. Ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού από το χρωμοσωμικό DNA βασίζεται στην συγκατακρήμνιση του μεμβρανοσύνδετου χρωμοσωμικού DNA με αδιάλυτα σύμπλοκα που περιέχουν αλάτι, απορρυπαντικό και πρωτείνες. Το πλασμιδιακό DNA, επαναδιατάσσεται σωστά και παραμένει σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο. Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και μεταφέρεται στη στήλη QIAprep spin που έχει τοποθετηθεί εντός δοχείου τύπου «eppendorf». Οι στήλες QIAprep περιλαμβάνουν μία μεβράνη πυριτίου για εκλεκτική προσρόφηση του πλασμιδιακού DNA που βρίσκεται σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας.Το RNA, οι κυτταρικές πρωτεΐνες και άλλοι μεταβολίτες περιέρχονται στο διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη έπειτα από φυγοκέντρηση σε 12000xg για 1min. Ακολουθεί έκπλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA με το ρυθμιστικό διάλυμα PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80%v/v αιθανόλη) και απομάκρυνση του διαλύματος έκπλυσης με φυγοκέντρηση (12000xg, 1min). Τέλος, το DNA αποδεσμεύεται από τη στήλη με 50μL υπερκάθαρου νερού, έπειτα από φυγοκέντρηση. Το εκλουσθέν διάλυμα με το περιεχόμενο πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στο δοχείο και αποθηκεύεται στους -20°C. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του διαλύματος στο φασματοφωτόμετρο Nano Drop και ανάλυση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

## 6.4.1 Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA που έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση

Το αιώρημα των μετασχηματισμένων βακτηρίων XL10-Gold με πλασμιδιακό DNA που έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση, φυγοκεντρείται στα 1500x g για 1,5min. Απομακρύνονται ~400μL από το υπερκείμενο μέσο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται στα εναπομείναντα ~100μL. Το αιώρημα μεταφέρεται και διασπείρεται στην επιφάνεια τρυβλίου με LB-άγαρ και αμπικιλλίνη με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου.

Ο επιτυχής μετασχηματισμός των XL10-Gold κυττάρων με το pUC18 transformation control πλασμίδιο δηλώνεται με την ανάπτυξη αποικιών στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού του τρυβλίου που περιέχει αμπικιλλίνη (100µg/mL). Επίσης, η ανάπτυξη αποικιών μπλε χρώματος στο τρυβλίο που επιστρώθηκε με το μεταλλαγμένο pWhitescript 4,5-kb control πλασμίδιο δηλώνει ότι ήταν επιτυχείς, τόσο η αντίδραση μετάλλαξης όσο και ο μετασχηματισμός των XL10-Gold κυττάρων. Ο σχηματισμός αποικιών στο τρυβλίο που επιστρώθηκαν με το καθένα από τα μεταλλαγμένα γονίδια έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης Ε3 δηλώνει την επιτυχία της εισαγωγής μετάλλαξης και του μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων.

Στη συνέχεια, λαμβάνονται δειγματοληπτικά τρεις αποικίες από κάθε τρυβλίο. Ακολουθείται η πορεία αναπαραγωγής, απομόνωσης και καθαρισμού του πλασμιδιακού DNA από το ίζημα των βακτηρίων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.4. Το DNA που απομονώνεται, εφ' όσον ποσοτικοποιηθεί και αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, υφίσταται αλληλούχιση προς επιβεβαίωση της εισαγωγής της επιθυμητής μετάλλαξης στο γονίδιο έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης Ε.

## 6.5 Ποσοτικοποίηση συστατικών διαλύματος

## 6.5.1 Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης.

- Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS.
- Ζεύγος Κυψελίδων Quartz (Fisher brand)

Το φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης περιλαμβάνει δύο ξεχωριστές θέσεις τοποθέτησης των κυψελίδων. Στη μία θέση τοποθετείται η κυψελίδα με το διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση ορίζεται ως μηδέν και ως προς το οποίο διορθώνεται η απορρόφηση του δείγματος. Αρχικά, εντός του ζεύγους των κυψελίδων τοποθετούνται από 700μL του ρυθμιστικού διαλύματος (που αποτελεί το διαλύτη των πρωτεϊνικών διαλυμάτων που θα ποσοτικοποιηθούν). Ορίζεται μηδενική η διαφορά της απορρόφησης των δύο διαλυμάτων. Ακολούθως, αφήνοντας την κυψελίδα με το ρυθμιστικό διάλυμα μηδενικής απορρόφησης στην θέση που διέρχεται η δέσμη αναφοράς, τοποθετούμε στην άλλη υποδοχή, τη δεύτερη κυψελίδα, στην οποία πλέον έχουμε εισάγει το πρωτεϊνικό διάλυμα. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος, που αντιστοιχεί στη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται στα 280nm και αντιστοιχεί στην απορρόφηση των αμινοξέων θρυπτοφάνης και τυροσίνης που περιλαμβάνονται στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Ο συντελεστής απορρόφησης της απολιποπρωτεΐνης Ε αγρίου τύπου (και των τριών ισομορφών) είναι 1,3 mL mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Οι συντελεστές απορρόφησης για τις μεταλλάξεις της απολιποπρωτεΐνης Ε στα 280nm, όπως υπολογίστηκαν από το εργαλείο βιβλιοπληροφορικής ProtParam (www.expasy.ch) παρουσιάζονται στον πίνακα 6:

Απολιποπρωτεΐνη Ε	ε <sub>280</sub> (mL mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
E2 (L261A, W264A, F265A)	1,15
E4 (L261A, W264A, F265A)	1.14
E3 R145C	1,3
E3 K146E	1,3
E3 R136S	1,3
E3 R→P	1,3
Trx-αποΕ3	1,12

Πίνακας 6: Συντελεστές απορρόφησης (στα 280nm) των μορίων απολιποπρωτέινης που μελετήθηκαν.

#### 6.5.2 Μέτρηση απορρόφησης διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nano-Drop.

Φασματοφωτόμετρο Nano Drop ND-1000

Ορίζεται ως μηδενική απορρόφηση, αυτή που μετράται όταν στην θέση τοποθέτησης του δείγματος, φορτώνεται 1μL διαλύτη. Ακολούθως, στην θέση αυτή τοποθετείται το δείγμα προς ποσοτικοποίηση.

Το δίκλωνο DNA έχει συντελεστή απορρόφησης 50mLx(µgxcm)<sup>-1</sup>. Ένα καθαρό δείγµα DNA παρουσιάζει αναλογία απορρόφησης A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> που να αντιστοιχεί σε 1,8, οπότε θεωρείται ότι δεν περιλαµβάνεται πρωτεΐνη στο δείγµα.

Στην περίπτωση ποσοτικοποίησης πρωτεϊνικού δείγματος, λαμβάνεται η απορρόφηση στα 280nm και χρησιμοποιείται ο εκάστοτε συντελεστής απορρόφησης (για την αποΕ, βλ. πίνακα 6).

## 6.5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Lowry.

- DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός 2mg/mL (BSA) (Pierce).

• DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (KCI 2,0 mg/L, KH<sub>2</sub>PO4 2,0mg/L, NaCI 80 mg/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21,7mg/L) (LONZA)

- Πλακίδιο 96 θέσεων ( Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG).

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στο γεγονός ότι κατιόντα δισθενούς χαλκού σχηματίζουν σύμπλοκα ιώδους χρώματος με τους πεπτιδικούς δεσμούς σε αλκαλικό περιβάλλον και υφίστανται αναγωγή σε κατιόντα μονοσθενούς χαλκού. Έπειτα προστίθεται διάλυμα Folin-Ciocalteu και τα περιεχόμενα σε αυτό μολυβδαινικά και βολφραμικά ιόντα ανάγονται προς σχηματισμό προϊόντος που έχει έντονο μπλε χρώμα. Κατά την αναγωγή των παραπάνω ιόντων οξειδώνονται κυρίως τα αμινοξέα τυροσίνη και θρυπτοφάνη και σε μικρότερο βαθμό η ιστιδίνη και η κυστεΐνη. Το μέγιστο της απορρόφησης είναι στα 750 nm και το ελάχιστο στα 405 nm.

Παρασκευάζεται διάλυμα «A+S», έπειτα από προσθήκη 20 μL αντιδραστηρίου S σε κάθε 1000 μL αντιδραστηρίου A. Γίνεται ανάμιξη 5 μL δείγματος με 25 μL διαλύματος «A+S» και έπειτα 200 μL αντιδραστηρίου B. Γίνεται επώαση των διαλυμάτων για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση στα 595 nm. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με 0,5, 1, 3, 5, 7,5 και 10 μg πρωτεΐνης από πρότυπο διάλυμα BSA, ακολουθώντας την ίδια κατεργασία. Τα διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη DPBS 1x, που αποτελεί και το τυφλό διάλυμα ως προς το οποίο μηδενίζεται η απορρόφηση. Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα πρωτεΐνης (σε μg) υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

### 6.5.4 Χρήση τυποποιημένης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό χοληστερόλης.

- Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός (Data-Cal της Thermo)
- Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου (Data-Trol της Thermo)
- Αντιδραστήριο μέτρησης χοληστερόλης (Infinity της Thermo)
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one)
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)

Η ολική χοληστερόλη του ορού προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται από την εστεράση της χοληστερόλης σε χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η ελεύθερη χοληστερόλη συμπεριλαμβανομένης και εκείνης που υπήρχε αρχικά, οξειδώνεται στη συνέχεια από την οξειδάση της χοληστερόλης σε χολεστ-4-εν-3-όνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 4-αμινοαντιπυρίνη και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505nm.

Σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας το βαθμονομητή πρότυπο ορό με βάση τον πίνακα 7. Κατόπιν τα πρότυπα και το δείγμα (συνολικού όγκου 50μL) αναμιγνύονται καλά με 270μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Για την παρακολούθηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της διαδικασίας χρησιμοποιείται ο φυσιολογικός ορός ελέγχου (5μL σε 15μL DPBS) και ακολούθως γίνεται προσθήκη 300μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10min και μέτρηση της απορρόφησης στα 505nm. Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης χοληστερόλης στα δείγματα γίνεται μέσω της καμπύλης αναφοράς (σχήμα 1), που πραγματοποιείται εκ νέου σε κάθε ποσοτικό προσδιορισμό.

Πίνακας 7. Όγκοι του βαθμονομητή προτύπου ορού και του DPBS που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής χοληστερόλης.

Όγκος πρότυπου βαθμονομητή ορού (μL)	Όγκος DPBS (μL)
0	50
5	45
10	40
15	35
30	20
40	10
50	0



Σχήμα 1. Γραφική παράσταση της απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων χοληστερόλης σε συνάρτηση με τη μάζα της περιεχόμενης χοληστερόλης.

#### 6.5.5 Χρήση τυποποιημένης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό φωσφολιπιδίων.

- Kit (Sentinel Diagnostics)
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)

Τα φωσφολιπίδια προσδιορίζονται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο. Η λεκιθίνη, σφιγγομυελίνη, και λυσολεκιθίνη υδρολύονται παρουσία της φωσφολιπάσης D σε χολίνη και φωσφατιδικό οξύ, N-ακυλο-σφιγγο-φωσφορικό και λυσοφωσφατιδικό οξύ, αντίστοιχα. Η χολίνη οξειδώνεται από την οξειδάση της χολίνης σε βεταΐνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με 4-αμινοαντιπυρίνη και 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ σε μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505nm.

Τα αντιδραστήρια πριν την έναρξη της διαδικασίας πρέπει να είναι στους 37°C. Σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη με βάση τον πίνακα 8. Κατόπιν τα πρότυπα και το δείγμα (5μL δείγματος σε 10μL DPBS) αναμιγνύονται καλά με 300μL διαλύματος R1. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10min και μέτρηση της απορρόφησης μέσα σε 30min στα 505nm. Η περιεχόμενη ποσότητα φωσφολιπιδίων στα δείγματα υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

Πίνακας 8. Όγκοι (μL) του προτύπου διαλύματος και του DPBS που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης προς ποσοτικοποίηση των φωσφολιπιδίων.

Όγκος προτύπου διαλύματος (μL)	Όγκος DPBS (μL)
0	15
2	13
4	11
10	5
15	0

### 6.5.6 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett.

- Θειικό οξύ (Fisher)
- Διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N
- Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v (Fisher)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο, (NH4)6Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4H<sub>2</sub>O, (Sigma)
- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου 5% w/v
- Αντιδραστήριο Fiske και SubbaRow (Sigma)

- Πρότυπο διάλυμα φωσφορικών, 0,2mg/mL (Sigma)
- Γυάλινοι βόλοι
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, 16x125mm (Fisher)
- Μεταλλικό στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων
- Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS
- Φούρνος
- Υδατόλουτρο

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει αρχικά την απελευθέρωση των φωσφορικών από τα φωσφολιπίδια με οξείδωση, κατά την οποία καταστρέφεται η οργανική ύλη. Κατά το στάδιο αυτό, γίνεται πέψη των λιπιδιωμένων πρωτεϊνών από το θειικό οξύ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (όξινη οξείδωση). Τα φωσφορικά που απελευθερώνονται αντιδρούν με το μολυβδαινικό αμμώνιο και αποδίδουν φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο. Το φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο ανάγεται υπό συνθήκες που δεν ανάγουν την περίσσεια του μολυβδαινίου και αποδίδεται ένα σύμπλοκο που καλείται «ετεροπολικό μπλε». Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί μια κολλοειδή διασπορά άγνωστης σύστασης, που μετράται φωτομετρικά στα 830 nm.

Για τον προσδιορισμό του φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett, σχηματίζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, εισάγοντας σε καθέναν από 7 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που συγκρατούνται σε μεταλλικό στήριγμα 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3 και 4 μg φωσφόρου από πρότυπο διάλυμα φωσφορικών 0,2mg/mL (εις διπλούν). Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες εισάγονται επίσης τα προς προσδιορισμό φωσφόρου δείγματα σε όγκο μικρότερο ή ίσο των 2mL και τοποθετούνται στο μεταλλικό στήριγμα. Σε καθένα δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0,5mL διαλύματος θειικού οξέος 10N εντός απαγωγού. Στο στόμιο κάθε σωλήνα τοποθετείται ένας γυάλινος βόλος διαμέτρου ίσης με αυτή του στομίου του σωλήνα. Το στήριγμα με τους καλυμμένους με βόλους σωλήνες μεταφέρεται σε φούρνο στους 170°C για τουλάχιστον 3 ώρες. Κατά τη διάρκεια του βρασμού των δειγμάτων, οι βόλοι που καλύπτουν την επιφάνεια κάθε σωλήνα, επιτρέπουν τη συγκράτηση των ατμών που τείνουν να διαφύγουν και την επανακύλισή τους στο εσωτερικό του σωλήνα. Επειδή οι βόλοι μπορεί μετατοπιστούν από το στόμιο κάποιων σωλήνων κατά τη μεταφορά τους στο φούρνο ή κατά το βρασμό, πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο φούρνο, καλύπτεται η επιφάνεια καθώς και τα πλάγια τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων με αλουμινόχαρτο για συγκράτηση των βόλων.

Το μεταλλικό στήριγμα με τα δείγματα απομακρύνεται από το φούρνο και αφού τα δείγματα κρυώσουν, απομακρύνονται οι βόλοι από την επιφάνεια των σωλήνων, ξεπλένονται καλά με νερό και στεγνώνονται με πετσέτα. Εισάγονται σε κάθε σωλήνα 0,5mL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% v/v. Αν τα δείγματα είναι πολύ σκούρα (περιέχουν πολύ άνθρακα) εισάγονται 0,8mL αντί για 0,5mL διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v. Η επιφάνεια κάθε σωλήνα καλύπτεται ξανά με ένα καθαρό βόλο, η επιφάνεια όλων των δοκιμαστικών σωλήνων στο

μεταλλικό στήριγμα καλύπτεται με ένα μεγάλο κομμάτι αλουμινόχαρτο και γίνεται μεταφορά των δειγμάτων και πάλι στο φούρνο στους 170°C για 3 h, για να ολοκληρωθεί η καύση και να αποσυντεθεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Μετά από 3h, τα δείγματα απομακρύνονται από το φούρνο και οι βόλοι ξαναπλένονται με άφθονο νερό και σκουπίζονται με πετσέτα. Σε κάθε δείγμα εισάγονται 4,4mL νερό, 0,2mL διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου 5% w/v και 0,2mL αντιδραστηρίου Fiske και SubbaRow. Γίνεται καλή ανάμιξη των συστατικών κάθε σωλήνα με ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα, τοποθετούνται οι βόλοι στην επιφάνεια των σωλήνων που συγκρατούνται στο μεταλλικό στήριγμα, καλύπτεται η επιφάνειά τους με αλουμινόχαρτο και το στήριγμα με τα δείγματα μεταφέρεται εντός υδατόλουτρου στους 90°C για 20min.

Στη συνέχεια, τα δείγματα απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και αφού κρυώσουν, μετράται η απορρόφησή τους στα 830 nm σε φασματοφωτόμετρο. Το διάλυμα με μηδενική συγκέντρωση φωσφόρου χρησιμοποιείται ως τυφλό για τον ορισμό της μηδενικής απορρόφησης. Σχηματίζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς από τις τιμές απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων γίνεται από την καμπύλη αναφοράς.

### 6.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

## 6.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου γίνεται με βάση το μέγεθός τους. Η πηκτή σχηματίζεται μετά από συμπολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου με το αντιδραστήριο διασταύρωσης N-N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο. Για να ξεκινήσει ο συμπολυμερισμός προστίθεται διάλυμα APS, ένας εκκινητής που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, καθώς και TEMED που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα συμπολυμερισμού. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε αποδιατακτικές συνθήκες καθώς στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθεται δωδεκυλοθειικό νάτριο, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των φυσικών πρωτεϊνών και τις αποδιατάσσει. Λόγω του αρνητικού φορτίου του SDS που είναι δεσμευμένο στη μετουσιωμένη πλέον πρωτεΐνη, το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτείνης καθίσταται αμελητέο ώστε να μην επιδρά στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η κίνηση των αρνητικά φορτισμένων συμπλόκων πρωτεΐνης-SDS γίνεται από την κάθοδο προς την άνοδο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η προστιθέμονη μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών συντελώντας επίσης στην αποδιάταξη τους.

#### 6.6.1.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- Tris (Applichem)
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N-N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου 37,5:1, διάλυμα 30% (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1,5M pH 8,8

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1,0M pH 6,8
- Διάλυμα 10% w/v δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) (Sigma)
- Διάλυμα 10% w/v υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) (Sigma), φύλαξη στους -20°C
- N,N-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED) (Sigma)

Παρασκευάζονται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου, η πηκτή επιστίβασης (stacking gel) και η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel). Οι δύο πηκτές διαφέρουν στο μέγεθος των πόρων, στο pH και στην ιοντική ισχύ. Το stacking gel βοηθά στη επιστίβαση των πρωτεϊνών σε μια στενή ζώνη, ώστε τελικά να εισέλθουν όλες οι πρωτεΐνες ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Το πυκνότερο πλέγμα μέσω του οποίου διέρχονται τα μόρια των πρωτεϊνών στο resolving gel επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Πρώτα ετοιμάζεται το sandwich της ηλεκτροφόρησης με την κατάλληλη τοποθέτηση των δύο γυάλινων πλακών. Στη συνέχεια, τοποθετείται το ειδικό χτενάκι και σημειώνεται 1cm από το κάτω άκρο του (μέχρι αυτό το σημείο πρέπει να φτάσει η πηκτή διαχωρισμού).

Για την παρασκευή πηκτής διαχωρισμού 12% γίνεται ανάμιξη 4mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/Ν-Ν΄-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου με 2,5mL Tris 1,5M pH 8,8, 100μL διαλύματος SDS 10% και 3,3mL νερού. Στη συνέχεια, προστίθενται 100μL διαλύματος APS 10% και 4μL TEMED. Το μίγμα τοποθετείται στον ενδιάμεσο χώρο των δύο πλακών και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30min. Η πηκτή διαχωρισμού καλύπτεται με ισοπροπανόλη, η οποία απομακρύνεται αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός.

Για την παρασκευή πηκτής επιστίβασης γίνεται ανάμιξη 415μL διαλύματος ακρυλαμιδίου/Ν-Ν΄μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου με 315μL Tris 1M pH 6,8, 25μL διαλύματος SDS 10% και 1.7mL νερού. Στη συνέχεια, προστίθενται 25μL διαλύματος APS 10% και 2,5μl TEMED. Το μίγμα προστίθεται μέχρι να καλυφθεί όλος ο ενδιάμεσος χώρος ανάμεσα στις δύο πλάκες και μετά τοποθετείται το ειδικό χτενάκι. Μετά από 30min πολυμερισμού, το χτενάκι απομακρύνεται και τα φρεάτια που έχουν σχηματιστεί ξεπλένονται με νερό και μετά με 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

## 6.6.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Διάλυμα 10% w/v δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) (Sigma)
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue, BPB): Το BPB είναι βαφή-δείκτης.
  Επειδή είναι αρνητικά φορτισμένο σε pH>4,6 κινείται προς την κάθοδο. Λόγω του ότι είναι μικρό μόριο κινείται πιο γρήγορα στην πηκτή από τις πρωτεΐνες.

5x διάλυμα φόρτωσης δείγματος (sample loading buffer): 900μL 1M Tris-HCl pH 6,8,
 3,75mL γλυκερόλη, 3mL SDS 10% (w/v), 750μL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1,5mL κυανούν της
 βρωμοφαινόλης 1% και 5,1mL απεσταγμένο νερό.

- 10x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer): 30 gr Tris, 143,5 gr γλυκίνη, 10 gr SDS.
  Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στο 1 lt με απεσταγμένο νερό.
- 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer): (Γίνεται αραίωση 100mL διαλύματος με  $H_2O$  σε συνολικό όγκο 1L)
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175kDa, New England Biolabs).
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad)

Στα δείγματα γίνεται προσθήκη διαλύματος φόρτωσης δείγματος σε όγκο που να αντιστοιχεί στο 1/5 του συνολικού όγκου του δείγματος πρωτεΐνης. Το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης περιλαμβάνει SDS και μερκαπτοαιθανόλη που αποδιατάσσουν τα πρωτεϊνικά δείγματα με τη βοήθεια θέρμανσης για 5min στους 95°C. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται και πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών.

Η συσκευή γεμίζεται με 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως η πηκτή. Στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης περιέχεται γλυκερόλη, η οποία αυξάνει το ειδικό βάρος του μίγματος και επιτρέπει την καλύτερη είσοδο και τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια. Τα δείγματα τοποθετούνται με τη βοήθεια πιπέτας με στενό ακροφύσιο στα πηγαδάκια της πηκτής.

### 6.6.1.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται υπό σταθερή τάση 85V για το διάστημα που τα δείγματα διατρέχουν την πηκτή επιστίβασης. Εφόσον τα δείγματα περιέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται με σταθερή τάση 120V για περίπου 1,5h.

Όταν η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί, η πηκτή απομακρύνεται από τα τζάμια στα οποία περιέχεται και ακολουθεί χρώση προς εμφάνιση των ζωνών που αντιστοιχούν στα συστατικά των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί (βλ. παρ. 6.6.3.1- 6.6.3.2).

## 6.6.2 Ηλεκτροφόρηση πηκτής διαβαθμισμένης πυκνότητας

Η ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ανασυγκροτημένης HDL σε πηκτή διαβαθμισμένης πυκνότητας, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης των υποπληθυσμών των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνονται στα δείγματα με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο.

## 6.6.2.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου/Ν,Ν'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου 37,5:1, διάλυμα 30% (w/v)
  (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCI 1,5M, pH 8,8
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου 10% w/v (APS) (Sigma). Φυλάσσεται τους -20°C.

- Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) (Sigma)
- Θάλαμος παρασκευής πηκτών Mini Protean 3 Multi Casting Chamber (Biorad)
- Συσκευή βαθμίδωσης Hoefer SG gradient maker (General Electric).
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας 4-20% v/v.

Για να φτιαχτούν 12 πηκτές απαιτούνται περίπου 110mL διαλύματος. Ο μισός του συνολικού όγκου (55mL) τοποθετείται σε κάθε θάλαμο της συσκευής βαθμίδωσης. Στο θάλαμο Α τοποθετείται το πυκνό διάλυμα, ενώ στο θάλαμο Β το αραιό. Η σύσταση των δύο διαλυμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Συστατικά και ποσότητες της πηκτής διαβαθμισμένης πυκνότητας.

Συστατικά πηκτής	Πυκνό 20% v/v	Αραιό 4% ν/ν
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% ν/ν	36,7mL	7,3mL
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	13,8mL	13,8mL
Απεσταγμένο H₂O	4,5mL	34mL
APS 10% w/v	275µL	275µL
TEMED	27,5µL	27,5µL

Η συσκευή βαθμίδωσης τοποθετείται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα (σχήμα 2) και σε καθέναν από τους δυο θαλάμους τοποθετείται ένας μικρός μαγνήτης. Ανοίγονται οι βαλβίδες που κρατούν τους δύο θαλάμους κλειστούς και το περιεχόμενό τους αναμιγνύεται εντός του θαλάμου Β. Η ροή του διαλύματος δεν πρέπει να είναι πολύ γρήγορη, ώστε να υπάρχει επαρκής χρόνος για καλή ανάμιξη των δύο διαλυμάτων στο θάλαμο Β. Το μίγμα της πηκτής ρέει από το θάλαμο Β προς το θάλαμο παρασκευής πηκτών, όπου σχηματίζεται η διαβάθμιση των πηκτών. Οι πηκτές χρειάζονται περίπου 1h για να πήξουν. Έπειτα τοποθετούνται και φυλάσσονται στους 4°C μέχρι και 3 εβδομάδες.





### 6.6.2.2 Προετοιμασία και διαχωρισμός δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

• Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x): Διαλυτοποίηση 3g Tris και 14,4g γλυκίνη σε 1L απεσταγμένου νερού.

 Διάλυμα φόρτωσης (4x): Tris-HCI 50mM, pH 6,8, γλυκερόλη 0.2% v/v, διάλυμα βρωμοφαινόλης μπλε 0,08% w/v

• High Molecular Weight Calibration Kit (HMWCK, Amersham) για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10 x 8 cm.
- Ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) για τη ρύθμιση του πάχους της πηκτής (1,0mm)
- Ειδική χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων της πηκτής.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-protean II (Biorad)
- Τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων απαιτείται ανάμιξη του διαλύματος των σωματιδίων rHDL (5-10µg), με διάλυμα φόρτωσης (4x), ώστε ο συνολικός όγκος του δείγματος να μην ξεπερνά τα 20µL και η τελική συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης να είναι 1x. Στην πηκτή φορτώνεται επίσης διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών HMWCK (11µL). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή, το δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με το προψυγμένο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x) και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 100V, για 3,5h, υπό ψύξη (4°C).

Στην πηκτή φορτώνονται τα δείγματα εις διπλούν, αφήνοντας κάποια πηγάδια κενά μεταξύ των δύο σειρών δειγμάτων. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή κόβεται με λεπίδα στη μέση και το ένα μέρος αυτής (που περιλαμβάνει το διάλυμα των πρωτεϊνών με μεγάλο μοριακό βάρος, HMWCK) βάφεται με τη χρωστική Coomassie Blue, ενώ το άλλο τμήμα της πηκτής βάφεται με τη χρωστική Sudan Black B.

## 6.6.3 Χρώση της πηκτής προς εμφάνιση των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί.

## 6.6.3.1 Χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Blue.

- Coomassie Brilliant Blue (Applichem)
- Διάλυμα χρωστικής: 1g Coomassie Brilliant Blue, 480mL μεθανόλη, 100mL οξικό οξύ. Το διάλυμα συμπληρώνεται ως το 1L με απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα αποχρωματισμού (destaining buffer): 5% οξικό οξύ

Η πηκτή με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες απομακρύνεται από το sandwich ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα της χρωστικής Coomassie Blue, έτσι ώστε όλη η επιφάνεια της πηκτής να καλύπτεται από το διάλυμα. Η πηκτή παραμένει στο διάλυμα της χρωστικής για
20min υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια το διάλυμα της χρωστικής απομακρύνεται από το δοχείο και ο αποχρωματισμός της βαμμένης μπλε πηκτής γίνεται με προσθήκη διαλύματος αποχρωματισμού σε τέτοιο όγκο που να καλύπτεται η επιφάνεια της πηκτής. Μέσα στο δοχείο τοποθετούνται διπλωμένα κομμάτια χαρτοπετσέτας για να διευκολύνουν τον αποχρωματισμό της πηκτής απορροφώντας τη χρωστική.

### 6.6.3.2 Χρώση των λιπιδικών συστατικών των δειγμάτων με τη χρωστική Sudan Black B.

• Χρωστική Sudan Black B (Sigma-Aldrich)

Διάλυμα χρωστικής Sudan Black B (500mg χρωστικής διαλυτοποιούνται σε 20ml ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 15 οξικού οξέος και τέλος, 85mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα υφίσταται ανάδευση για 30min και φυγοκεντρείται προς απομάκρυνση τυχόν ιζήματος).

• Διάλυμα αποχρωματισμού (150mL οξικού οξέος, 200mL ακετόνης και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1L).

Η πηκτή μεταφέρεται εντός δοχείου που περιέχει διάλυμα χρωστικής σε όγκο που να καλύπτει την επιφάνεια της πηκτής. Η πηκτή αφήνεται όλη τη νύχτα στο διάλυμα της χρωστικής υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, απομακρύνεται το διάλυμα Sudan Black B και εισάγεται διάλυμα αποχρωματισμού. Ο αποχρωματισμός της πηκτής λαμβάνει χώρα υπό ανάδευση και ολοκληρώνεται έπειτα από τρεις αλλαγές του διαλύματος αποχρωματισμού με φρέσκο.

# 6.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση (ανοσοαποτύπωση Western)

- Tris (Applichem)
- Γλυκίνη (Sigma)
- Μεθανόλη (Merck)
- Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 12,5x: 30g Tris, 144g γλυκίνη στα 800mL νερό

Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 1x: 80mL διαλύματος μεταφοράς 12,5x, 200mL μεθανόλη 720mL νερό.

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Corp.)
- Χαρτί Whatman
- Άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait)
- Tween-20 (Sigma)
- Διάλυμα πλύσης (PBS/Tween-20 0,1%)
- Διάλυμα blocking (5%w/v άπαχο γάλα σε σκόνη σε διάλυμα πλύσης)

- Συσκευή μεταφοράς (Bio-Rad)
- Τροφοδοτικό Consort Bioblock E341
- Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiliminescene, ECL) (Pierce)

• Μηχάνημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Luminescent Image Analyzer, LAS 4000, Fujifilm)

- Πρωτεύον αντίσωμα (6C5 αποΕ, μονοκλωνικό αντίσωμα μυός, Ottawa Heart Corporation, Ottawa, Canada)
- Δευτερεύον αντίσωμα αίγας έναντι της ανοσοσφαιρίνης μυός συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδας (HRP) (Novagen, EMD Chemicals, San Diego, CA, USA)

Οι πρωτεΐνες έπειτα από το διαχωρισμό τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρονται με ανοσοαποτύπωση σε μεβράνη νιτροκυτταρίνης προς ακινητοποίηση. Н πηκτή πολυακρυλαμιδίου επωάζεται για 10min σε διάλυμα μεταφοράς 1x και κατόπιν τοποθετείται μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τα φύλλα χαρτιού whatman στην κασέτα μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από την πηκτή πολυκρυλαμιδίου στη νιτροκυτταρίνη γίνεται με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου αφού προηγουμένως απομακρυνθεί το SDS από την πηκτή. Η απομάκρυνση του SDS από την πηκτή γίνεται με την επώαση της πηκτής στο διάλυμα μεταφοράς που περιέχει μεθανόλη. Η μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται με σταθερή τάση 120V και διαρκεί 1h και 45min, στους 4°C. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε πλαστικό δοχείο, επωάζεται με διάλυμα blocking για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα blocking περιλαμβάνει παράγοντες που αποκλείουν τη μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπως άπαχο γάλα και Tween-20.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα πλύσης 3 φορές (για 10min κάθε φορά). Μεταφέρεται σε ειδικό σακουλάκι όπου προστίθεται το πρωτεύον αντίσωμα (6C5 αποΕ) σε διάλυμα blocking (σε αναλογία 1:1000) και επωάζεται στους 37°C για 1h υπό ανακίνηση. Το πρωτεύον αντίσωμα προσδένεται στην «προς ανίχνευση» πρωτεΐνη (αποΕ), ως προς την οποία είναι ειδικό. Έπειτα γίνονται και πάλι 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης, για 10min έκαστη, προκειμένου να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το πρωτεύον αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί.

Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται σε καθαρό σακουλάκι με το δευτερεύον αντίσωμα αίγας έναντι ανοσοσφαιρίνης μυός σε διάλυμα blocking (σε αναλογία 1:5000) και επωάζεται στους 37°C για ~ 1h υπό ανακίνηση. Το δευτερεύον αντίσωμα προσδένεται στο πρωτεύον, ανιχνεύοντας έτσι το σύμπλοκο πρωτεύοντος αντισώματος- πρωτεΐνης στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 10min κάθε φορά με διάλυμα πλυσίματος και 1 φορά με PBS 1x. Η μεμβράνη επωάζεται με το μίγμα διαλυμάτων του kit χημειοφωταύγειας. Το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (HRP) που είναι συζευγμένο με το δευτερεύον αντίσωμα οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπόστρωμα λουμινόλη προκαλεί την εκπομπή φωτονίων, τα οποία ανιχνεύονται από το μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας. Αφού τοποθετηθεί η μεμβράνη στο μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας, συλλέγονται φωτογραφίες της μεμβράνης στον υπολογιστή. Η θέση εμφάνισης της ζώνης στην εικόνα της μεμβράνης αντιστοιχεί στη θέση του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου- αντισώματος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανίχνευση των «προς ανίχνευση» πρωτεϊνών. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα, τόσο περισσότερο δευτερεύον αντίσωμα δεσμεύεται και τόσο πιο έντονο είναι το σήμα χημειοφωταύγειας που λαμβάνεται.

### 6.8 Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης 3C- His πρωτεάσης.

#### 6.8.1 Έκφραση της 3C- His πρωτεάσης

- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB
- Καναμυκίνη (Applichem)
- Διάλυμα καναμυκίνης 50mg/mL (stock) (Φυλάσσεται στους -20°C).
- Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (2L)
- Δοχεία τύπου falcon, αποστειρωμένα σιφώνια μιας χρήσης, αποστειρωμένα ρύγχη αυτόματων πιπετών (Greiner Bio-one)
- Φυγόκεντρος (Sorval), δοχεία φυγοκέντρησης χωριτικότητας 250mL
- Φυγόκεντρος (Labnet)

Γίνεται μετασχηματισμός BL21-Gold DE3 επιδεκτικών κυττάρων με το φορέα pEt24-His-3C που φέρει το γονίδιο έκφρασης της 3C πρωτεάσης με ετικέτα 6 ιστιδινών καθώς και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (βλ. παρ. 6.1.3). Το πλασμίδιο pET-24/His-3C αποτελεί ευγενική προσφορά από τον Dr. Arie Geerlof (EMBL, Heidelberg, Germany).

Εφόσον αναπτυχθούν αποικίες σε τρυβλία LB-άγαρ που περιέχουν καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50µg/mL, λαµβάνεται μία αποικία κάθε φορά και µεταφέρεται υπό στείρες συνθήκες σε καθένα από δύο δοχεία τύπου falcon χωριτικότητας 50mL, όπου περιέχονται 10mL θρεπτικού υλικού LB και καναµυκίνη σε συγκέντρωση 50µg/mL. Παράλληλα σε ένα άλλο δοχείο τύπου falconF εισάγονται 10mL LB και καναµυκίνη (50µg/mL), απουσία αποικίας και το διάλυμα χρησιµοποιείται ως καλλιέργεια-µάρτυρας (τυφλό). Τα δοχεία με τις καλλιέργειες µεταφέρονται εντός επωαστικού κλιβάνου (µε το καπάκι βιδωµένο χαλαρά) και επωάζονται στους 37°C, σε 220rpm, για περίπου 14-16h (όλη τη νύχτα). Επιλέγεται µία από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν και φυγοκεντρείται για 15min σε 6500rpm σε 4°C. Γίνεται απόχυση του υπερκειµένου και το ίζηµα των βακτηρίων αναδιασπείρεται σε 10mL φρέσκου θρεπτικού υλικού

LB με καναμυκίνη (50µg/mL). Μεταφέρονται από 5mL καλλιέργειας σε καθεμία από 2 κωνικές φιάλες που περιέχουν 495mL θρεπτικού υλικού LB και καναμυκίνη (50µg/mL), υπό στείρες συνθήκες. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C, υπό ανάδευση σε 220rpm, μέχρι η απορρόφησή τους στα 595nm να γίνει ~0,6 (χρόνος επώασης περίπου 2,5- 3h). Όταν η απορρόφηση των καλλιεργειών φτάσει τα επιθυμητά επίπεδα, προστίθεται διάλυμα IPTG στο αιώρημα των κυττάρων σε τελική συγκέντρωση 0,5mM. Αμέσως μετά την προσθήκη IPTG, πριν ακόμη λάβει χώρα επαγωγή της έκφρασης της 3C- His πρωτεάσης, λαμβάνεται δείγμα ~1mL από το αιώρημα των κυττάρων κάθε κωνικής φιάλης. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται εντός επωαστικού κλιβάνου και επωάζονται σε θερμοκρασία 20°C, υπό ανάδευση (220rpm), για 14-16h (όλη τη νύχτα). Την επόμενη μέρα, λαμβάνεται δείγμα ~1mL από καθεμία από τις δύο καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε δοχεία φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούνται σε 4000rpm, για 20min, στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων φυλάσσεται προσωρινά στους -80°C.

Τα δείγματα (~1mL) που έχουν ληφθεί πριν και μετά την επαγωγή της έκφρασης της 3C-His πρωτεάσης από κάθε κωνική φιάλη, φυγοκεντρούνται σε 9000rpm, για 5min κι έπειτα από απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των βακτηρίων που σχηματίζεται, φυλάσσεται στους -20°C. Το ίζημα βακτηρίων κάθε δείγματος αναδιασπείρεται σε 50μL διαλύματος φόρτωσης (5x) και 50μL απεσταγμένου νερού. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να παρατηρηθεί η η έκβαση της έκφρασης της 3C-His πρωτεάσης.

### 6.8.2 Απομόνωση και καθαρισμός της 3C- His πρωτεάσης

- French Press (SLM-AMINCO, USA)
- Tris (Applichem)
- NaCl (Merck)
- PMSF (Applichem)
- Υπερφυγόκεντρος (Beckman) και δοχεία υπερφυγοκέντρησης χωριτικότητας 20mL
- Αιώρημα ΝΙ-ΝΤΑ σε 20% αιθανόλη ν/ν.
- Χρωματογραφική στήλη

• Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο, 0,2% Tween v/v και PMSF 1mM).

• Ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης και καθαρισμού:

20mM Tris-HCI, pH 7,5, 0,5M NaCl απουσία ιμιδαζολίου και με ιμιδαζόλιο σε συγκεντρώσεις 20mM, 50mM, 150mM, 300mM και 500mM

• Μεμβράνη διαπίδυσης, MWCO: 10kDa (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm)

- Φυγόκεντρος (Universal 320)
- Γλυκερόλη (Applichem)

Τα δοχεία με το ίζημα των κυττάρων, που έχουν υπερεκφράσει την 3C-His πρωτεάση, μεταφέρονται από τους -80°C σε λουτρό πάγου. Το ίζημα βακτηρίων από καλλιέργεια 500mL (από κάθε κωνική φιάλη) αναδιασπείρεται υπό ψύξη σε 20mL διαλύματος λύσης. Μεταφέρονται από 20mL αιωρήματος κυττάρων σε δύο δοχεία τύπου falcon και κάθε αιώρημα υφίσταται λύση σε όργανο τύπου «French Press». Τα κύτταρα τόσο πριν, όσο και μετά τη λύση, φυλάσσονται εντός λουτρού πάγου. Η διαδικασία λύσης επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά για κάθε δείγμα. Λαμβάνονται 50μL από το λύμα κάθε καλλιέργειας και φυλάσσονται στους -20°C. Το λύμα των κυττάρων μεταφέρεται εντός δοχείων υπερφυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται σε 100000 x g, στους 6°C, για 1h.

Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα (διαλυτή πρωτεΐνη) από την υπερφυγοκέντρηση κάθε καλλιέργειας (~20mL), μεταφέρεται εντός δοχείων τύπου falcon σε λουτρό πάγου και φυλάσσεται δείγμα ~50μL στους -20°C. Στο υπερκείμενο διάλυμα κάθε καλλιέργειας μεταφέρεται ~1mL της ρητίνης Ni-NTA (που έχει εκπλυθεί παρατεταμένα με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο). Ακολουθεί πρόσδεση της 3C- His πρωτεάσης στη ρητίνη για 1h, υπό ήπια ανάδευση, στους 4°C.

Σε άδεια χρωματογραφική στήλη φορτώνεται το αιώρημα Ni-NTA με την προσδεδεμένη 3C- His πρωτεάση και παράλληλα συλλέγεται το διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη και περιλαμβάνει συστατικά που δεν προσδέθηκαν στο πληρωτικό υλικό (flow-through). To «flow-through» διάλυμα διέρχεται από τη στήλη δύο επιπλέον φορές κι έπειτα ακολουθεί έκπλυση του πληρωτικού υλικού με φρέσκο ψυχρό διάλυμα πρόσδεσης (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο). Κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης μέσω της στήλης, λαμβάνεται δείγμα από το εκλουσθέν διάλυμα και εξετάζεται η παρουσία πρωτεΐνης σε αυτό με τη δοκιμασία Brandford. Η 3C- His πρωτεάση εκλούεται καθαρή με ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl και συγκέντρωση ιμιδαζολίου από 20mM μέχρι και 300mM. Λαμβάνεται δείγμα 40μL από τα διαλύματα που εκλούονται από τη στήλη και φυλάσσονται στους -20°C.

Τα δείγματα που λήφθηκαν μετά τη λύση των κυττάρων, την υπερφυγοκέντρηση, καθώς και από τα διαλύματα που εκλούστηκαν κατά τον καθαρισμό της 3C-His πρωτεάσης μέσω στήλης συγγενείας, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες για να παρατηρηθεί η έκβαση της απομόνωσης και του καθαρισμού της εκφρασμένης πρωτεάσης.

Τα κλάσματα που περιέχουν καθαρή 3C-His πρωτεάση μεταφέρονται εντός μεμβράνης διαπίδυσης και διαπιδώνται έναντι 2L ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl όλη τη νύχτα στους 4°C, προς απομάκρυνση του περιεχόμενου ιμιδαζολίου στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αλλάζεται με φρέσκο και η διαπίδυση διαρκεί 6 επιπλέον ώρες. Τέλος, γίνεται νέα αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με φρέσκο και η διαπίδυση λαμβάνει χώρα όλη τη νύχτα. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση των διαλυμάτων 3C-His πρωτεάσης σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (βλ. παρ. 6.5.1) και προστίθεται γλυκερόλη σε περιεκτικότητα 10% v/v. Τα κλάσματα φυλάσσονται στους -20°C.

### 6.9 Έκφραση απολιποπρωτεϊνών Ε3 σε σύστημα E.coli και καθαρισμός.

#### 6.9.1 Έκφραση της χιμαιρικής Trx-αποΕ3

- Επιδεκτικά ως προς μετασχηματισμό κύτταρα BL21-Gold DE3. (Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού απαιτείται αιώρημα 50μL που φυλάσσεται στους -80°C).
- Πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης E3 μεταλλαγμένης και μη (pEt32a-E3)
- Στείρα τρυβλία με LB-άγαρ και αμπικιλλίνη (σε Cτελ=100μg/mL)
- Αμπικιλλίνη (Applichem)
- Διάλυμα αμπικιλλίνης 100mg/mL (stock) (Φυλάσσεται στους -20°C)
- Φυγόκεντρος (Universal 320)

Η πειραματική διαδικασία του μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων λαμβάνει χώρα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.1.3. Για την έκφραση πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων BL21-Gold DE3 με το πλασμιδιακό DNA «pEt32a-E3wt» (που έχει παρασκευαστεί από το «pEt32a-E4wt» με την εισαγωγή της μετάλλαξης E4R122C) [173, 174]. Για την έκφραση των μεταλλαγμένων αποΕ χρησιμοποιείται το αντίστοιχο πλασμιδιακό DNA «pEt32a-E3R145P», «pEt32a-E3R147P» ή «pEt32a-E3R158P». Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη. Συνεπώς, κατά την επίστρωση των τρυβλίων LB-άγαρ προστίθεται αμπικιλλίνη, ώστε η τελική συγκέντρωσή της στο θρεπτικό υλικό να είναι 100μg/mL και να είναι εφικτή η διάκριση επιτυχούς ή μη μετασχηματισμού των κυττάρων.

Την επόμενη μέρα, εφ' όσον ο μετασχηματισμός των βακτηρίων ήταν επιτυχής, έχουν αναπτυχθεί αποικίες στην επιφάνεια των τρυβλίων. Σε καθένα από δύο στείρα δοχεία τύπου falcon, που περιέχουν 13mL θρεπτικού υλικού LB και αμπικιλλίνη (σε συγκέντρωση 100µg/mL), μεταφέρεται μία αποικία μετασχηματισμένων BL21-Gold DE3 κυττάρων. Παράλληλα σε ένα άλλο δοχείο, μεταφέρονται 13mL θρεπτικού υλικού LB και αμπικιλλίνη και χρησιμοποιούνται ως διάλυμα- μάρτυρας (τυφλό), καθώς δεν εισάγεται σε αυτά αποικία βακτηρίων. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο και επωάζονται υπό ανάδευση 220rpm, στους 37°C για 3-4 ώρες. Οι καλλιέργειες απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο όταν η απορρόφησή τους στα 590nm κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6. Για το λόγο αυτό, μετά από 2,5 ώρες επώασης, λαμβάνονται δείγματα από τις καλλιέργειες ανά διαστήματα και μετράται η απορρόφηση του αιωρήματος των βακτηρίων στα 590nm για να μην ξεπεραστεί το όριο απορρόφησης 0,6. Όταν η απορρόφηση του αιωρήματος βρίσκεται στα επιθυμητά επίπεδα, γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών σε 4500 x g για 20min, υπό ψύξη (4°C). Το υπερκείμενο των κυττάρων

αποχύνεται- υπό στείρες συνθήκες- και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε φρέσκο διάλυμα LB που περιέχει αμπικιλλίνη (100μg/mL), στον όγκο που είχαν τα διαλύματα πριν τη φυγοκέντρηση. Τα αιωρήματα των βακτηρίων αποθηκεύονται όλη τη νύχτα στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, λαμβάνεται μία καλλιέργεια και υφίσταται ξανά φυγοκέντρηση σε 4500 x g για 20min, στους 4°C. Γίνεται απόχυση του θρεπτικού υλικού υπό στείρες συνθήκες και επαναιώρηση των κυττάρων σε φρέσκο διάλυμα LB που περιέχει αμπικιλλίνη και έχει προθερμανθεί στους 37°C. Μεταφέρονται 5mL από την πρώτη καλλιέργεια- υπό στείρες συνθήκες- σε καθεμία απο δύο κωνικές φιάλες που περιέχουν 495mL αποστειρωμένου και προθερμασμένου (στους 37°C) θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλλίνη (100µg/mL). Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση σε 220rpm, μέχρι η απορρόφησή τους στα 590nm να γίνει 0,6. Όταν η απορρόφηση του αιωρήματος στις δύο κωνικές φθάσει την επιθυμητή τιμή (OD~0,6), προστίθεται διάλυμα IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και το αιώρημα επωάζεται για 2h προς επαγωγή της έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης E3. Μετά την παρέλευση των 2h, οι δύο κωνικές απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο και το αιώρημα κάθε φιάλης φυγοκεντρείται σε 2600 x g, στους 4°C, για 20min. Γίνεται απόχυση του υπερκειμένου θρεπτικού μέσου και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80°C.

Πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης E3, λαμβάνεται δείγμα ~1mL από το αιώρημα κάθε κωνικής, φυγοκεντρείται σε 9000rpm για 5min, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων φυλάσσεται στους -20°C. Το ίζημα των κυττάρων κάθε δείγματος αναδιασπείρεται σε 50μL διαλύματος φόρτωσης δείγματος (5x) και 50μL απεσταγμένου νερού. Προστίθεται επίσης DTT σε τελική συγκέντρωση 1mM. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ελέγχεται η επιτυχία έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης.

# 6.9.2 Απομόνωση και καθαρισμός της χιμαιρικής Trx-αποE3 (52kDa) με στήλη συγγενείας Ni-NTA

- French Press (SLM-AMINCO, USA)
- Complete mini EDTA-free protease inhibitors cocktail (Roche)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Applichem)

 Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 0,1mg/mL λυσοζύμη, 1mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 4 δισκία κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών απουσία EDTA ανά 40mL ρυθμιστικού διαλύματος)

- Υπερφυγόκεντρος (Beckman)
- Αιώρημα ΝΙ-ΝΤΑ σε 20% αιθανόλη ν/ν.
- Χρωματογραφική στήλη

• Ρυθμιστικά διαλύματα:

20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl απουσία ιμιδαζολίου και με ιμιδαζόλιο 5mM, 10mM, 20mM, 300mM και 500mM

- Μεμβράνη διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που να επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 10000Da (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm)
- Φυγόκεντρος (Universal 320)

Το ίζημα των κυττάρων από καλλιέργεια 500mL αναδιασπείρεται σε 20mL διαλύματος λύσης. Το αιώρημα των κυττάρων υφίσταται λύση στο πιεστήριο French Press υπό 10000psi. Τα κύτταρα φυλάσσονται εντός λουτρού πάγου. Η διαδικασία λύσης επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά για κάθε δείγμα. Λαμβάνονται 50μL από το λύμα κάθε καλλιέργειας και φυλάσσονται στους -20°C.

Ακολούθως, το λύμα των κυττάρων μεταφέρεται σε δοχεία υπερφυγοκέντρησης. Λαμβάνει χώρα υπερφυγοκέντρηση σε 100000x g για 1h στους 4°C. Το υπερκείμενο του λύματος αποχύνεται σε νέα δοχεία τύπου falcon και λαμβάνεται δείγμα 50μL, που επίσης φυλάσσεται στους -20°C. Τα δείγματα λύματος και υπερκειμένου διαλύματος (έπειτα από υπερφυγοκέντρηση) αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και παρακολουθείται η έκβαση της απομόνωσης της απολιποπρωτεΐνης Ε3.

Η συγκέντρωση του υπερκειμένου (από την υπερφυγοκέντρηση) διαλύματος με την εκφρασμένη απολιποπρωτεΐνη Ε3 ρυθμίζεται σε 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 5mM Ιμιδαζόλιο. Το πληρωτικό υλικό Ni-NTA (~4mL) μεταφέρεται εντός χρωματογραφικής στήλης και εκπλένεται αρχικά με 5 όγκους στήλης απεσταγμένο νερό προς απομάκρυνση του διαλύματος αιθανόλης και έπειτα με 5 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 5mM Ιμιδαζόλιο. Στη συνέχεια το αιώρημα του πληρωτικού υλικού διαιρείται στα δύο και μεταφέρεται σε δύο δοχεία τύπου falcon. Λαμβάνει χώρα φυγοκέντρηση σε 1000 x g για 15min. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται με προσοχή (ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατόν λιγότερη ποσότητα Ni-NTA) και σε κάθε δοχείο εισάγονται από 20mL διαλύματος της εκφρασμένης απολιποπρωτεΐνης. Το δύο δοχεία με το πληρωτικό υλικό και το προς πρόσδεση πρωτεϊνικό διάλυμα υφίστανται ανάδευση στους 4°C όλη τη νύχτα. Η απολιποπρωτεΐνη E3 περιλαμβάνει μία αλληλουχία έξι ιστιδινών (6 His-taq). Η κάθε ιστιδίνη της 6 His-taqged πρωτεΐνης συνδέεται μέσω του ιμιδαζολικού της δακτυλίου με δύο περιοχές πρόσδεσης των ιόντων Ni<sup>2+</sup>, καθώς οι άλλες τέσσερις περιοχές πρόσδεσης των Ni<sup>2+</sup> είναι κατειλλημένες από τις καρβοξυλικές ομάδες του νιτριλοτριοξικού οξέος (ΝΤΑ). Το Νi-ΝΤΑ είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε ρητίνη αγαρόζης.

Την επόμενη μέρα, το αιώρημα Ni-NTA- πρωτεϊνικού διαλύματος μεταφέρεται εντός χρωματογραφικής στήλης. Το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται εντός δοχείου τύπου falcon και περνιέται ξανά από τη στήλη με αργή ροή (~1σταγόνα/sec) 2 φορές. Στη συνέχεια, το διάλυμα που δεν προσδέθηκε στο πληρωτικό υλικό της στήλης (flow-through) φυλάσσεται στους 4°C.

Η στήλη εκπλένεται με ρυθμιστικά διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου ώστε αρχικά να επιτευχθεί η απομάκρυνση των καθόλου ή ελαφρά συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών και τελικά να εκλουστεί μόνο η καθαρισμένη απολιποπρωτεϊνη Ε3. Επιλέγεται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου για την έκλουση της προσδεδεμένης στη στήλη πρωτεΐνης λόγω της δομικής ομοιότητας του ιμιδαζολίου με την ιστιδίνη, αφού αποτελεί τμήμα της πλευρικής αλυσίδας της. Καθώς το πληρωτικό υλικό της στήλης εκπλένεται με το διάλυμα του ιμιδαζολίου, επιτυγχάνεται η αντικατάσταση της προσδεδεμένης στο Ni-NTA 6 His-tagged πρωτεΐνης με μόρια ιμιδαζολίου και συνεπώς η απελευθέρωση της πρωτεΐνης.

Αρχικά, γίνεται έκπλυση του πληρωτικού υλικού της στήλης με 180mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 10mM Ιμιδαζόλιο. Το διάλυμα έκπλυσης που διέρχεται από τη στήλη συλλέγεται σε κλάσματα των 50mL σε δοχεία τύπου falcon στους 4°C. Ακολουθεί έκπλυση με 200mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 20mM Ιμιδαζόλιο. Έπειτα γίνεται έκλουση της καθαρισμένης απολιποπρωτεΐνης με 60mL ρυθμιστικού διάλυμα συλλέγεται σε κλάσματα των 50mL σε δοχεία τύπου falcon στους 4°C. Ακολουθεί έκπλυση με 200mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 20mM Ιμιδαζόλιο. Έπειτα γίνεται έκλουση της καθαρισμένης απολιποπρωτεΐνης με 60mL ρυθμιστικού διάλυμα συλλέγεται σε κλάσματα των 5mL. Τέλος, γίνεται έκλουση με 20mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 500mM Ιμιδαζόλιο που εφόσον διέλθουν από το πληρωτικό υλικό της στήλης, συλλέγονται σε κλάσματα των 5mL και φυλάσσονται στους 4°C.

Τα κλάσματα που περιλαμβάνουν καθαρή απολιποπρωτεΐνη- όπως διαπιστώνεται έπειτα από ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% v/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες- συλλέγονται και μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης (με MWCO 10000Da). Το διάλυμα της καθαρής πρωτεΐνης διαπιδάται έναντι 2L ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl προς απομάκρυνση του ιμιδαζολίου που περιέχεται σε αυτό. Η διαπίδυση γίνεται υπό ανάδευση, στους 4°C, όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αλλάζεται με φρέσκο και η διαπίδυση συνεχίζεται για ~6h. Το απόγευμα αλλάζεται και πάλι το διάλυμα διαπίδυσης με φρέσκο και η διαπίδυση διεξάγεται όλη τη νύχτα, υπό ψύξη και ανάδευση.

## 6.9.3 Αντίδραση αποκοπής της ετικέτας «Trx- 6 His» από τη χιμαιρική Trx-αποΕ3 με 3C-His πρωτεάση.

- Διάλυμα 3C-His πρωτεάσης
- DTT (Applichem)

Η απολιποπρωτεΐνη Ε που εκφράζεται από τον τροποποιημένο φορέα pEt-32a, φέρει την αμινοξική αλληλουχία της θειορεδοξίνης 1 (Trx) που συνδέεται μέσω ενός ολιγοπεπτιδίου με την ετικέτα των 6 ιστιδινών (6 His). Επιπλέον περιλαμβάνει την αλληλουχία «Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro» που αναγνωρίζεται από τη 3C πρωτεάση. Η 3C πρωτεάση υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης της παραπάνω αλληλουχίας.

Η αντίδραση πέψης της χιμαιρικής Trx-αποE3 οδηγεί στην παραγωγή μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ~18kDa, που περιλαμβάνει την αμινοξική αλληλουχία της θειορεδοξίνης, την ετικέτα 6 ιστιδινών, την περιοχής πέψης από τη θρομβίνη και καταλήγει στην αλληλουχία Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln που προέκυψε από την δράση της 3C πρωτεάσης. Επιπλέον, από την ολοκληρωμένη αντίδραση πέψης της χιμαιρικής Trx-αποE3 (~52kDa) από την 3C πρωτεάση παράγεται η 34kDa αποE3, που είναι και το επιθυμητό προϊόν. Η αποE3 απομονώνεται από το διάλυμα των προϊόντων της αντίδρασης καθώς διέρχεται μέσω στήλης συγγενείας Ni-NTA. Τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος κατακρατούνται από το πληρωτικό υλικό της στήλης καθώς και το πολυπεπτίδιο που περιλαμβάνει θειορεδοξίνη και η ανασυνδυασμένη 3C-His πρωτεάση διαθέτουν ετικέτα 6 ιστιδινών.

Προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη αναλογία 3C-πρωτεάσης: Trx-αποE (w/w) που απαιτείται για την πλήρη αποκοπή της αλληλουχίας θειορεδοξίνης από την αποΕ, έγιναν δοκιμαστικές αντιδράσεις σε διαφορετικές αναλογίες ενζύμου: χιμαιρικής πρωτεΐνης (Trx-αποE3), για 24h στους 37°C. Λήφθηκε δείγμα από κάθε ενζυμική αντίδραση και αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στο σχήμα 3, παρουσιάζεται χαρακτηριστικά η ανάλυση ενζυμικών αντιδράσεων με υπόστρωμα την αποΕ3 αγρίου τύπου. Η 3C-πρωτεάση ήταν αρκετά δραστική ώστε να πέψει τις συντηγμένες Trx-αποE3 ακόμα και σε αναλογία 1:80 w/w 3C-πρωτεάσης:Trx-αποE.



Σχήμα 3. Ανάλυση δειγμάτων από το διάλυμα ενζυμικών αντιδράσεων πέψης της χιμαιρικής TrxαποΕ3 wt από τη 3C-πρωτεάση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η 3C-πρωτεάση πέπτει την TrxαποΕ3wt σε αναλογία 1:80w/w, στους 37°C για 24h.

Τελικά, επελέγη η αντίδραση της 3C-His πρωτεάσης με υπόστρωμα τη συνολική ποσότητα της χιμαιρικής απολιποπρωτεΐνης να γίνεται σε αναλογία 1:80 w/w στους 37°C για 24h. Η αντίδραση διεξάγεται σε διάλυμα που περιέχει 20mM Tris-HCl, 0,5M NaCl και 10mM DTT.

## 6.9.4 Απομόνωση της καθαρής 34kDa- απολιποπρωτεΐνης από τα προϊόντα της αντίδρασης

- Ουρία (Applichem)
- Αιώρημα Νi-ΝΤΑ σε αιθανόλη 20% v/v
- Χρωματογραφική στήλη
- 1M Tris-HCl, pH 8,0 (stock)
- 2M NaCl (stock)
- 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl
- NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)
- 0.3M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (stock)
- 5mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- Μεμβράνη διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που να επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 10000Da (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm)

Εφόσον ολοκληρωθεί η ενζυμική αντίδραση αποκοπής της ετικέτας «θειορεδοξίνη- 6 ιστιδίνες» από την απολιποπρωτεΐνη Ε, προστίθεται ουρία στο διάλυμα της αντίδρασης ώστε η συγκέντρωση ουρίας να γίνει 6Μ και το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Υπό τις συνθήκες αυτές, επιτυγχάνεται η αποδιάταξη τυχόν συμπλεγμάτων μεταξύ της χιμαιρικής Trx-αποE3 (52kDa), απολιποπρωτεΐνης E3 (34kDa) και της κομμένης θειορεδοξίνης. Ακολούθως, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθεται 1mL ρητίνης Ni-NTA για κάθε 4mg χιμαιρικής αποΕ3 και λαμβάνει χώρα περιστροφική ανάδευση του αιωρήματος για 1h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατά την οποία λαμβάνει χώρα πρόσδεση της ανασυνδυασμένης 3C πρωτεάσης, της θειορεδοξίνης και τυχόν χιμαιρικής αποΕ3 (που δεν έχει πεφθεί από το ένζυμο) στη ρητίνη μέσω των ετικετών 6His. Το διάλυμα της αντίδρασης με τη ρητίνη φορτώνεται σε άδεια χρωματογραφική στήλη και έπειτα συλλέγεται και φυλάσσεται στους 4°C. Το συλλεχθέν διάλυμα περιλαμβάνει την απολιποπρωτεΐνη Ε3 34kDa. Λαμβάνεται δείγμα από το παραπάνω διάλυμα για την ανάλυσή του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% ν/ν. Το διάλυμα υφίσταται παρατεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος όξινου ανθρακικού αμμωνίου 5mM. Συγκεκριμένα, διεξάγονται 3 διαπιδύσεις στους 4°C, εκ των οποίων η μία διεξάγεται όλη τη νύχτα. Το διαπιδυθέν διάλυμα ποσοτικοποιείται με μέτρηση της απορρόφησής του, χωρίζεται σε κλάσματα και ψύχεται υπό κλίση στους -80°C. Τέλος, λαμβάνει χώρα λυοφιλίωση των παγωμένων διαλυμάτων και η λυοφιλιωμένη πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -80°C.

#### 6.10 Έκφραση απολιποπρωτεϊνών σε σύστημα κυττάρων HTB-13 και καθαρισμός

## 6.10.1 Ανάπτυξη και διατήρηση καλλιέργειας κυττάρων ΗΤΒ-13 σε φιάλες επίπεδης επιφάνειας.

- Κύτταρα HTB-13 (American Type Culture Collection, κωδική ονομασία SW1783)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιεργειών Leibovitz L-15 που περιέχει Glutamax (Invitrogen Corp.), εμπλουτισμένο με:
- 10% FBS (Sigma)
- ο 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη (Sigma)
- Διάλυμα Θρυψίνης 0,25% (w/v) /Na<sub>2</sub>EDTA 0.02% (w/v) σε PBS χωρίς  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  (Biochrom AG).
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιεργειών επιφάνειας 25, 75 και 175 cm<sup>2</sup>, αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon 15 και 50mL και αποστειρωμένα σιφώνια (Greiner bio-one)
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets)
- Επωαστικός κλίβανος θεμοκρασίας 37°C (Thermo Scientific)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Heraeus, Labofuge 400R)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus)

Τα κύτταρα HTB-13 είναι κύτταρα αστροκυτώματος ανθρώπου που δεν εκφράζουν ενδογενώς την απολιποπρωτεϊνη Ε. Καλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> ή 175 cm<sup>-2</sup> και αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C. Όταν αναπτυχθούν στο 90% της κατάστασης συμβολής, ανακαλλιεργούνται με θρυψινοποίηση κάθε 3 μέρες. Απομακρύνεται το παλιό θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται σε 3mL διαλύματος θρυψίνης 0,25%(w/v) /Na<sub>2</sub>EDTA 0.02%(w/v) ανά φιάλη καλλιέργειας 75cm<sup>2</sup>. Μετά από επώαση 5min σε θερμοκρασία 37°C και έντονη ανακίνηση της φιάλης καλλιέργειας, προστίθενται 3mL εμβρυικού ορού μόσχου και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon 15mL. Γίνεται φυγοκέντρηση του αιωρήματος σε 300 x g για 10min, αποχύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επωμέρνο όγκο φρέσκου μέσου Leibovitz L-15 που περιέχει 1% v/v πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και 10% v/v FBS. Τα κύτταρα αραιώνονται και μεταφέρονται σε νέες ή στις ίδιες φιάλες ώστε να καλύπτουν το 1/3 της επιφάνειας της φιάλης.

### 6.10.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων HTB-13

- DMSO (Sigma)
- Διάλυμα 90% FBS (v/v)/ 10% DMSO (v/v)
- Αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων σε υγρό άζωτο (Greiner bio-one)

Τα επιπλέον υλικά που απαιτούνται για το χειρισμό των κυττάρων HTB-13 είναι κοινά με τα υλικά της παραγράφου 6.10.1.

Για τη δημιουργία stock κατεψυγμένων κυττάρων, γίνεται αποκόλληση κυττάρων HTB-13- που έχουν αναπτυχθεί μέχρι συμβολής- από την επιφάνεια της φιάλης καλλιέργειας με θρυψινοποίηση (βλ. παρ. 6.10.1). Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon 15mL και φυγοκεντρείται στα 300 x g για 10min. Έπειτα το υπερκείμενο των κυττάρων υγρό αποχύνεται και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 3mL 90% FBS (v/v) /10% DMSO (v/v). Στη συνέχεια τα κύτταρα μοιράζονται σε ειδικά αποστειρωμένα φιαλίδια (1mL κυττάρων ανά φιαλίδιο). Σε κάθε φιαλίδιο εισάγεται το 1/3 των κυττάρων από φιάλη καλλιέργειας 75cm<sup>2</sup> που βρισκόταν σε συμβολή πριν από την κατάψυξη. Το DMSO αποτελεί συστατικό του διαλύματος κατάψυξης καθώς έχει κρυοπροστατευτικές ιδιότητες και μεταβάλλει τις φυσικοχημικές παραμέτρους της μεμβράνης των κυττάρων συντελώντας στην αποφυγή μηχανικής βλάβης που μπορεί να προκληθεί από τη βαθιά ψύξη. Κάθε φιαλίδιο με εναιώρημα κυττάρων τοποθετείται σε κουτί πολυστυρενίου και φυλάσσεται στους -80°C για 48h. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται αργός ρυθμός κατάψυξης. Κατόπιν τα φιαλίδια τοποθετούνται σε δοχείο υγρού αζώτου, όπου και φυλάσσονται. Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στο υγρό άζωτο (-196°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Κατά την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται απότομο πέρασμα των κυττάρων από τους -196°C στους 37°C. Τα φιαλίδια με τα κατεψυγμένα κύτταρα ανασύρονται από το υγρό άζωτο, αποψύχονται σε υδατόλουτρο στους 37°C και το περιεχόμενό τους μεταφέρεται σε φιάλες καλλιέργειας που περιέχουν πλήρες θρεπτικό υλικό, που επίσης βρίσκεται σε θερμοκρασία 37°C. Μετά από 18-24h ελέγχεται στο μικροσκόπιο η βιωσιμότητα των κυττάρων και ο βαθμός προσκόλλησής τους στον πυθμένα της φιάλης. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται προς απομάκρυνση του DMSO και των νεκρών κυττάρων. Για να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα σε οποιαδήποτε πειραματική δοκιμασία ανακαλλιεργούνται τουλάχιστον 4 φορές μετά από την έναρξη της καλλιέργειάς τους.

#### 6.10.3 Μεταφορά και ανάπτυξη HTB-13 κυττάρων σε κυλινδρικά δοχεία (Roller bottles)

• Επωαστικός κλίβανος κυλινδρικών δοχείων τύπου «roller bottles», θερμοκρασίας 37°C.

Τα επιπλέον υλικά που απαιτούνται για το χειρισμό των κυττάρων HTB-13 είναι κοινά με τα υλικά της παραγράφου 6.10.1

Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν μέχρι συμβολής σε φιάλες 175cm<sup>2</sup>, απομακρύνεται το παλιό θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται με 10mL διαλύματος θρυψίνης 0,25% (w/v) /Na<sub>2</sub>EDTA 0.02%(w/v) για 5min στους 37°C. Απαιτείται καλή ανακίνηση των φιαλών καλλιέργειας για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνειά τους. Τα 10mL αιωρήματος κυττάρων αραιώνονται με την προσθήκη 90mL πλήρους μέσου (Leibovitz L-15 με 1% v/v πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και 10% v/v FBS). Γίνεται μεταφορά των 100mL αιωρήματος σε κυλινδρικό δοχείο επιφάνειας 1750cm<sup>2</sup>. Έπειτα από 5 μέρες επώασης σε επωαστικό κλίβανο κυλινδρικά περιστρεφόμενων δοχείων, απομακρύνεται το μέσο και προστίθενται στο δοχείο 20mL διαλύματος θρυψινοποίησης. Το δοχείο μεταφέρεται για 5-10min στον επωαστικό κλίβανο- όπου γίνεται βραδεία περιστροφή του- ώστε να χαλαρώσουν οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την κυλινδρική επιφάνεια του δοχείου και μεταξύ τους. Στη συνέχεια προστίθενται 20mL πλήρους μέσου, τοποθετείται το καπάκι και γίνεται ανακίνηση του διαλύματος σε όλη την επιφάνεια του δοχείου και μεταξύ τους. Στη συνέχεια προστίθενται 20mL πλήρους μέσου, τοποθετείται το καπάκι και γίνεται ανακίνηση του διαλύματος σε όλη την επιφάνεια του δοχείου κυλινδρικά ώστε να αναμιχθούν τα κύτταρα με το μέσο. Έπειτα προσαρμόζεται ακροφύσιο πιπέτας τύπου Gilson (για μεταφορά 1000μl) σε αποστειρωμένο σιφώνιο των 25mL και με εισρόφηση και εκρόφηση που επαναλαμβάνεται 3-4 φορές επιτυγχάνεται το σπάσιμο των συσσωμάτων των κυττάρων. Γίνεται αραίωση του αιωρήματος των κυττάρων με την προσθήκη 460mL μέσου Leibovitz L-15, 1%(v/v) πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και 10%(v/v) FBS. Μεταφέρονται από 100mL αιωρήματος κυττάρων σε καθένα από 5 κυλινδρικά δοχεία, τα οποία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο. Έπειτα από επτά μέρες γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου με φρέσκο. Πέντε μέρες μετά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου με σοενοϊό για την έκφραση ανασυνδυασμένων απολιποπρωτεϊνών.

## 6.10.4 Επιμόλυνση ΗΤΒ-13 κυττάρων με τη χρήση αδενοϊών και συγκομιδή του μέσου με την εκφρασμένη πρωτεΐνη [91, 118]

- Φυγόκεντρος J2-21 (Beckman) με στροφέα JA-20
- Αποστειρωμένα Δοχεία με βιδωτό υπερκείμενο δοχείο που φέρει φίλτρο 0,2μm (Thermo Scientific 2, Nalgene 2, MF752,# 09-741-201)
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets)
- Επωαστικός κλίβανος κυλινδρικά περιστρεφόμενων δοχείων θερμοκρασίας 37°C.
- Θρεπτικό μέσο καλλιεργειών Leibovitz's L-15 που περιέχει Glutamax (Invitrogen Corp.), εμπλουτισμένο με:
- ο 100U/mL πενικιλίνη και 100µg/mL στρεπτομυκίνη (Sigma)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate buffered Saline (LONZA)
- Αποστειρωμένα δοχεία φυγοκέντρησης (Nalgene, 500mL)

Οι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της απολιποπρωτεΐνης E3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων αυτής (R145C, K146E, R136S) παρασκευάστηκαν από τον Dr Alexander Vezeridis στο εργαστήριο του Δρ Βασίλη Ζαννή (εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Πανεπιστήμιο Βοστώνης). Οι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των απολιποπρωτεϊνών E2 και E4 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών τους [L261A, W264A, F265A] παρασκευάστηκαν από τον Δρ. Κωνσταντίνο Δροσάτο [129]. Όταν τα κύτταρα ΗΤΒ-13 αναπτυχθούν στο 80% της κατάστασης συμβολής των κυλινδρικών δοχείων επιφάνειας 1750cm<sup>2</sup> (οπότε ο αριθμός τους ανέρχεται περίπου σε 1,2 x 10<sup>8</sup> κύτταρα ανά δοχείο), απομακρύνεται όλη η ποσότητα του πλήρους μέσου από τα κυλινδρικά δοχεία. Εισάγονται 50mL μέσου Leibovitz L-15 που περιέχει 1% ν/ν πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και 2% θερμο-αδρανοποιημένο ορό αλόγου. Επίσης προστίθεται διάλυμα αδενοϊού σε ποσότητα που να αντιστοιχεί σε πολλαπλότητα μόλυνσης 20 pfu/ κύτταρο. Γίνεται ανακίνηση του δοχείου ώστε το μέσο με τον αδενοϊό να μεταφερθεί σε όλη την επιφάνειά του και το δοχείο μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο υπό κυλινδρική περιστροφή ?rpm στους 37°C. Το μέσο απομακρύνεται 24h μετά την επιμόλυνση και ακολουθεί έκπλυση με 50mL DPBS. Το DPBS απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται και δεύτερη έκπλυση με DPBS και απόχυσή του. Τέλος, προστίθενται 50mL μέσο Leibovitz L-15 εμπλουτισμένο με 1% (v/v) πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Το μέσο με την εκφρασμένη πρωτεΐνη συλλέγεται 24h αργότερα. Η συγκομιδή του μέσου επαναλαμβάνεται κάθε 24h για 5-6 μέρες και κάθε φορά προστίθενται 43mL φρέσκου μέσου (απουσία ορού). Το συλλεχθέν μέσο φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 15min και το υπερκείμενο διάλυμα φιλτράρεται μέσο φίλτρου 0,2μm για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και η συσσωματωμένη πρωτεΐνη που κατακρημνίζεται. Το φιλτραρισμένο μέσο με την εκφρασμένη πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να γίνει ο καθαρισμός του. Σε κάθε συγκομιδή λαμβάνονται ~100μΙ δείγμα από το μέσο για να αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

## 6.10.5 Απομόνωση και καθαρισμός απολιποπρωτεϊνών με το πρωτόκολλο σχηματισμού πρωτεολιποσωμάτων/ υπερφυγοκέντρησης-επίπλευσης/ απολιπιδίωσης

Το πρωτόκολλο για την απομόνωση και τον καθαρισμό των απολιποπρωτεϊνών από το μέσο που συνελλέγη μετά από την επιμόλυνση των ΗΤΒ-13 κυττάρων με τους αδενοϊούς που έφεραν την αλληλουχία έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Εκτίμηση της ποσότητας της εκφρασμένης απολιποπρωτεΐνης που περιέχεται στο μέσο της καλλιέργειας από κάθε μέρα συγκομιδής με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

> Διαπίδυση του μέσου έναντι 25mM NH₄HCO₃ και λυοφιλίωση του διαλύματος της ακαθάριστης πρωτεΐνης μέχρι ξηρού.

Σχηματισμός πρωτεολιποσωμάτων.

> Δημιουργία βαθμίδωσης πυκνότητας και υπερφυγοκέντρηση (επίπλευση).

Διαχωρισμός κλασμάτων και ανάλυση δείγματος από κάθε κλάσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Απολιπιδίωση των κλασμάτων που περιλαμβάνουν καθαρή απολιποπρωτεΐνη (Επανάληψη x 3 φορές). Ποσοτικοποίηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry (περιγραφή στην παράγραφο 6.5.3)

Ανίχνευση-προσδιορισμός φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett (περιγραφή στην παράγραφο 6.5.6)

≻ Διαπίδυση έναντι 25mM NH₄HCO₃ και λυοφιλίωση.

## 6.10.5.1 Διαπίδυση του μέσου έναντι 25mM ΝΗ₄ΗCO₃ και λυοφιλίωση του διαλύματος της ακαθάριστης πρωτεΐνης μέχρι ξηρού.

- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)
- $\Delta i \alpha \lambda u \mu \alpha NH_4 HCO_3 1,5M$  (60x, stock)
- Διάλυμα NH₄HCO₃ 25mM (1x)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 12000-14000, Fisher Scientific)
- Λυοφιλιωτής (VirTis Freezemobile 25ES)
- Δοχεία Λυοφιλίωσης 900mL με λαστιχένιο επίθεμα, γυάλινη βαλβίδα σύνδεσης και φίλτρα (VirTis)

Για να καταστεί ευκολότερη η διεξαγωγή της απομόνωσης και του καθαρισμού της κάθε απολιποπρωτεΐνης, το συλλεχθέν μέσο συμπυκνώνεται με λυοφιλίωση μέχρι τελικού όγκου ~200mL. Στη συνέχεια, το μέσο υφίσταται εκτεταμένη διαπίδυση έναντι 4L διαλύματος 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (3 αλλαγές, εκ των οποίων οι δύο διεξάγονται όλη τη νύχτα). Ακολουθεί δεύτερη λυοφιλίωση, η οποία διεξάγεται μέχρι ξηρού.

### 6.10.5.2 Σχηματισμός πρωτεολιποσωμάτων

- Οβίδα παροχής Ν<sub>2</sub> (g)
- Χλωροφόρμιο, Μεθανόλη (Merck)
- Διάλυμα χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1)
- L-α-φωσφατιδυλοχολίνη, POPC (Avanti Polar Lipids)
- Χοληστερόλη (Sigma)
- Χολικό Νάτριο (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα A: Tris-HCI 10mM, NaCl 150mM, EDTA 0.01% w/v, pH 8,0
- Διάλυμα χολικού νατρίου 30mg/mL (stock) (διαλυτοποιημένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Α)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 12000-14000Da, Fisher Scientific)
- Γυάλινη πιπέτα Pasteur, γυάλινη κωνική φιάλη, γυάλινα αποστειρωμένα σιφώνια και πουάρ

Γίνεται ζύγιση 9,5mg POPC και 0,47mg χοληστερόλης για κάθε mg απολιποπρωτεΐνης που περιέχεται στη λυοφιλιωμένη σκόνη από το συνολικό όγκο μέσου που συνελέγη. Οι ποσότητες POPC και χοληστερόλης μεταφέρονται σε γυάλινη κωνική φιάλη. Εισάγονται 10mL διαλύματος χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1) και τα λιπίδια και η χοληστερόλη διαλυτοποιούνται και αναμιγνύονται με ανακίνηση της κωνικής φιάλης. Στη συνέχεια εντός απαγωγού γίνεται ξήρανση του μίγματος λιπιδίων- χοληστερόλης με την παροχή αερίου αζώτου στην κωνική φιάλη. Για το σχηματισμό των πρωτεολιποσωμάτων απαιτούνται 0.42mL ρυθμιστικού διαλύματος A ανά mg απολιποπρωτεΐνης. Υπολογίζεται ο συνολικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος Α που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό πρωτεολιποσωμάτων και ένα μέρος αυτού φυλάσσεται για τη διαλυτοποίηση της λιοφιλιωμένης απολιποπρωτεΐνης, ενώ το υπόλοιπο εισάγεται στην κωνική φιάλη με το ξηρό μίγμα λιπιδίων-χοληστερόλης. Στην κωνική φιάλη εισάγεται μαγνητικός αναδευτήρας και παρέχεται αέριο άζωτο για να πληρωθεί κατά το δυνατόν το εσωτερικό της φιάλης, το στόμιο της οποίας καλύπτεται με parafilm. Το περιεχόμενο της φιάλης υφίσταται ανάδευση στους 4°C για 1h προς σχηματισμό γαλακτώματος λιπιδίων-χοληστερόλης. Το περιεχόμενο άζωτο στην κωνική φιάλη προστατεύει τα λιπίδια από ενδεχόμενη οξείδωσή τους από το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα. Η υπόλοιπη ποσότητα διαλύματος άλατος χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση της λυοφιλιωμένης σκόνης πρωτεΐνης. Μετά από παρέλευση μίας ώρας ανάδευσης του γαλακτώματος λιπιδίων- χοληστερόλης, εισάγεται στην κωνική φιάλη το διάλυμα της πρωτεΐνης. Το εσωτερικό της φιάλης πληρώνεται και πάλι με αέριο άζωτο, το στόμιό της καλύπτεται με parafilm και η ανάδευση με τον μαγνητικό αναδευτήρα συνεχίζεται για άλλη μία ώρα, στους 4°C. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα χολικού νατρίου (συγκέντρωσης 30mg/mL) στο περιεχόμενο της κωνικής φιάλης. Η ποσότητα του χολικού νατρίου που απαιτείται για το σχηματισμό των πρωτεολιποσωμάτων αντιστοιχεί σε 4,5mg ανά mg πρωτεΐνης. Μετά την προσθήκη του διαλύματος χολικού νατρίου, η ανάδευση συνεχίζεται για μία επιπλέον ώρα, στους 4°C, σε περιβάλλον αζώτου. Το διάλυμα των πρωτεολιποσωμάτων μεταφέρεται εντός σωλήνα διαπίδυσης και λαμβάνει χώρα διαπίδυση έναντι 1L διαλύματος ρυθμιστικού διαλύμετος Α, στους 4°C, όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αλλάζεται με φρέσκο 2 φορές, με κάθε διαπίδυση να διαρκεί 5 h.

#### 6.10.5.3 Δημιουργία βαθμίδωσης πυκνότητας και υπερφυγοκέντρηση (επίπλευση).

- Υπερφυγόκεντρος (Beckman) με στροφέα SW28
- Πλαστικοί σωλήνες χωριτικότητας 40mL για υπερφυγοκέντρηση (Beckman)
- Βρωμιούχο κάλιο, KBr (Sigma)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)
- Διάλυμα KBr, πυκνότητας 1,019g/mL (σε διαλύτη DPBS 1x)
- Διάλυμα KBr, πυκνότητας 1,063g/mL (σε διαλύτη DPBS 1x)

Σε πλαστικούς σωλήνες υπερφυγοκέντρησης εισάγονται με αποστειρωμένο σιφώνιο 13,2mL διαλύματος πρωτεολιποσωμάτων, των οποίων η πυκνότητα έχει ρυθμιστεί σε 1,21g/mL έπειτα από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας σκόνης βρωμιούχου καλίου. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αποστειρωμένου σιφωνίου επιστιβάζονται 6,6mL διαλύματος βρωμιούχου καλίου σε DPBS πυκνότητας 1,063g/mL στο διάλυμα των πρωτεολιποσωμάτων. Η επιστίβαση γίνεται αργά και κρατώντας το σιφώνιο υπό κλίση, ώστε να αποφευχθεί η ανάμιξη των στιβάδων διαφορετικής πυκνότητας. Έπειτα, γίνεται μεταφορά στιβάδας 6,6mL διαλύματος KBr σε DPBS πυκνότητας 1,019g/mL και τέλος, 13,2mL διαλύματος DPBS. Οι σωλήνες με τα διαλύματα διαβαθμισμένης πυκνότητας τοποθετούνται στους υποδοχείς στροφέα SW28 σε υπεφυγόκεντρο Beckman και φυγοκεντρήθηκαν υπό κενό, σε 28000rpm για 22h στους 4°C.

### 6.10.5.4 Διαχωρισμός κλασμάτων και ανάλυση δείγματος από κάθε κλάσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

• Γυάλινοι σωλήνες (Fisher) και υγρή μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO 12000Da, Fisher)

Μετά την υπερφυγοκέντρηση, τα δοχεία με τα διαλύματα διαβαθμισμένης πυκνότητας απομακρύνονται προσεκτικά από τον στροφέα για να μην αναμιχθούν οι στιβάδες και με αποστειρωμένο σιφώνιο αντλούνται κλάσματα όγκου 2,2mL από την επιφάνεια του διαλύματος με αργή ροή. Τα κλάσματα μεταφέρονται σε αριθμημένους γυάλινους σωλήνες. Μετά από τη μεταφορά όλου του περιεχόμενου όγκου από τα δοχεία υπερφυγοκέντρησης στους γυάλινους σωλήνες, λαμβάνεται δείγμα 20μL από κάθε κλάσμα για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η ανάλυση αυτή θα δώσει πληροφορίες για το ποια κλάσματα θα παρουσιάζουν ζώνη που θα αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος ~36kDa. Τα κλάσματα αυτά, αφού διαπιδυθούν συλλέγονται για να υποστούν απολιπιδίωση.

Το στόμιο κάθε σωλήνα καλύπτεται με υγρή μεμβράνη διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο των 12000kDa. Η μεμβράνη ασφαλίζεται στο στόμιο του κάθε γυάλινου σωλήνα με την τοποθέτηση ενός πλαστικού δακτυλίου, διαμέτρου ίσης με αυτή του σωλήνα, ώστε να αποφευχθεί η διαρροή διαλύματος από το εσωτερικό του σωλήνα. Όλοι οι σωλήνες με τα κλάσματα από την υπερφυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας τοποθετούνται με τη μεμβράνη διαπίδυσης προς τα κάτω, εντός μεγάλου ποτηριού ζέσεως όγκου 4L που περιέχει υπερκάθαρο νερό. Στο δοχείο εισάγεται μαγνητικός αναδευτήρας και τα δείγματα διαπιδώνται στους 4 °C, υπό ανάδευση, όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με φρέσκο νερό και η διαπίδυση συνεχίζεται για 4 h. Τέλος, μετά από δεύτερη ανανέωση του νερού στο ποτήρι ζέσης, συνεχίζεται η διεξαγωγή διαπίδυσης για επιπλέον 4 h.

#### 6.10.5.5 Απολιπιδίωση των κλασμάτων που περιλαμβάνουν καθαρή απολιποπρωτεΐνη

Οβίδα παροχής Ν<sub>2</sub> (g)

- Φυγόκεντρος J2-21 (Beckman) με στροφέα JA-20
- Γυάλινα δοχεία φυγοκέντρησης Corex, χωριτικότητας 30mL με καπάκι (Fisher)
- Χλωροφόρμιο, Μεθανόλη (Merck)
- Διάλυμα χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1)
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1,5M (60x, stock)
- Διάλυμα NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>0,1M
- Υδροχλωρική γουανιδίνη, ultra pure (Applichem)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0Μ (σε διαλύτη DPBS 1x)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 10mM, pH 8,0
- Γυάλινα σιφώνια

Λαμβάνονται τα κλάσματα που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία φυγοκέντρησης, που η εσωτερική τους επιφάνεια είναι επικαλυμμένη με σιλικόνη. Μεταφέρονται περίπου 3mL διαλύματος λιπιδιωμένης απολιποπρωτεΐνης σε κάθε δοχείο φυγοκέντρησης και προστίθενται 3mL διαλύματος NH₄HCO₃ 0,1Μ. Έπειτα εισάγονται στο δοχείο φυγοκέντρησης 23,1mL διαλύματος χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1). Οι δύο φάσεις (πολική και άπολη) αναμιγνύονται με έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για ~3min. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο για ~3min. Έπειτα αναδεύονται ξανά έντονα για ~3min και τοποθετούνται ακολούθως σε πάγο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές και τα δοχεία με τα δείγματα προς απολιπιδίωση αφήνονται στον πάγο για τουλάχιστον 3 ώρες. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα φυγοκέντρησή τους σε 8000rpm στους 4 °C για 30min προς διαχωρισμό των δύο φάσεων. Κατά τη φυγοκέντρηση, συνήθως σχηματίζεται ένα στρώμα άμορφου λευκού ιζήματος στη μεσεπιφάνεια της άπολης (κάτω στιβάδα) και της πολικής φάσης (πάνω στιβάδα). Το λευκό ίζημα αντιστοιχεί σε κατακρημνισμένη απολιποπρωτεΐνη Ε. Γίνεται διαχωρισμός των φάσεων, με προσεκτική άντληση της κάτω (άπολης) στιβάδας με χρήση γυάλινης αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur, ώστε να μην αναμιχθούν οι στιβάδες μεταξύ τους. Στο δοχείο φυγοκέντρησης παραμένουν η πολική φάση, που περιέχει την απολιποπρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή και η κατακρημνισμένη απολιποπρωτεΐνη, υπό μορφή λευκού ιζήματος. Ο όγκος της πολικής στιβάδας είναι αυξημένος σε σχέση με τον αρχικό των 6mL που εισήχθηκαν, καθώς περιέχεται χλωροφόρμιο και μεθανόλη σε μικρό ποσοστό. Ακολουθεί παροχή αερίου αζώτου στην πολική στιβάδα εντός απαγωγού, με τέτοια ροή που να επιτρέπει την ανάδευση όλου του όγκου της στιβάδας καθώς

και τη δημιουργία φυσαλίδων στην επιφάνειά της, προς απομάκρυνση του μικρού ποσοστού των περιεχόμενων πτητικών διαλυτών (χλωροφορμίου και μεθανόλης). Όταν πλέον ο όγκος της πολικής φάσης γίνει και πάλι ~6mL, προστίθενται εκ νέου ~23,1mL διαλύματος χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1) για να λάβει χώρα και δεύτερη απολιπιδίωση του διαλύματος απολιποπρωτεΐνης Ε. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές για την απολιπιδίωση των απολιπιδίων. Έπειτα από την τρίτη απολιπιδίωση ελέγχεται αν έχει γίνει πλήρης απομάκρυνση των φωσφολιπιδίων, με προσδιορισμό του περιεχόμενου φωσφόρου στο διάλυμα απολιποπρωτεΐνης με τη μέθοδο Bartlett (παράγραφος 6.5.6). Αν ανιχνευθεί φωσφόρος με τη μέθοδο Bartlett, το διάλυμα απολιποπρωτεΐνης υφίσταται ξανά

Μετά την τελευταία απολιπιδίωση, απομακρύνεται προσεκτικά με τη χρήση γυάλινης αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur η υδατική στιβάδα, ώστε να μην αναμιχθεί με το λευκό ίζημα, ούτε με την άπολη (κάτω) στιβάδα. Ακολούθως απομακρύνεται το ίζημα μαζί με μέρος υδατικής στιβάδας που έχει απομείνει, χωρίς να γίνει ανάμιξη με την άπολη φάση. Το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη που περιέχονται στην υδατική στιβάδα απομακρύνονται υπό ροή αερίου αζώτου και ένα δείγμα από το διάλυμα της απολιποπρωτεΐνης υποβάλλεται σε προσδιορισμό φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlet. Τα δείγματα που περιέχουν καθαρή, απολιπιδιωμένη απολιποπρωτεΐνη, υφίστανται λιοφιλίωση.

Το λευκό ίζημα αντιστοιχεί σε κατακρημνισμένη απολιποπρωτεΐνη. Προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0Μ μέχρι διαλυτοποίησης του ιζήματος, προς αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Η αποδιάταξη διεξάγεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως το διάλυμα της πρωτεΐνης μεταφέρεται σε σωλήνα διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που να επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο των 12-14kDa. Λαμβάνει χώρα διαπίδυση έναντι 2L διαλύματος Tris 10mM, pH 8,0 στους 4°C, όλη τη νύχτα, προς επαναδιάταξη της απολιποπρωτεΐνης. Την επόμενη μέρα, γίνονται 2 επιπλέον διαπιδύσεις διάρκειας 6h η καθεμία και τέλος, άλλη μία διαπίδυση που αφήνεται να διεξαχθεί όλη τη νύχτα. Όπως έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο Bartlett, η απολιποπρωτεΐνη που λαμβάνεται από διαλυτοποίηση- αποδιάταξη και επαναδιάταξη του λευκού άμορφου ιζήματος είναι απολιπιδιωμένη. Τα διαλύματα με την καθαρή, απολιπιδιωμένη πρωτεΐνη μεταφέρονται σε σωλήνα διαπίδυσης NH₄HCO<sub>3</sub> 25mM όλη τη νύχτα, στους 4°C. Την επόμενη μέρα, ακολουθούν τρεις επιπλέον διαπιδύσεις. Οι δύο πρώτες διεξάγονται για 6h έκαστη, ενώ η τελευταία διεξάγεται όλη τη νύχτα. Το διαπιδυσεις διάρως η μερος και διαπιδώμενη πρωτεΐνη αποθηκεύεται στους -80°C.

Κατά τη διεξαγωγή των απολιπιδιώσεων λαμβάνονται δείγματα από τις διαχωριζόμενες φάσεις και ελέχεται η πορεία της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, ελέγχεται ότι οι εκχυλίσεις και ο διαχωρισμός των φάσεων έχει διεξαχθεί με επιτυχία, καθώς δεν αναμένεται να περιέχεται πρωτεΐνη στην άπολη φάση και αναμένεται να παρατηρείται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου ζώνη που να αντιστοιχεί σε ~36kDa τόσο στα δείγματα από την υδατική φάση, όσο και από «διάλυμα» που περιέχει λευκό ίζημα. Επιπλέον, ελέγχεται η ποιότητα της πρωτεΐνης κατά την πορεία της απολιπιδίωσης.

### 6.11 Καθαρισμός απολιποπρωτεϊνών με τη χρήση FPLC

### 6.11.1 Παρασκευή πληρωτικού υλικού στήλης εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης 6Β.

- Κωνική φιάλη τύπου «Erlenmeyer» (χωριτικότητας 500mL)
- Θειική δεξτράνη (Pharmacia)
- Εποξυ-ενεργοποιημένη σεφαρόζη 6B (Pharmacia)
- Γυάλινη στήλη χρωματογραφίας Econo 2,5x 20cm (Biorad)
- Χωνί με ενσωματωμένο ηθμό από πορώδες υλικό
- Διάλυμα σύζευξης (0,2M NaHCO<sub>3</sub>, pH11,0). Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου με οπές διαμέτρου 0,22μm.
- Αιθανολαμίνη (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης (0,1M CH<sub>3</sub>COOH, 0,5M NaCl, pH 4,0). Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου με οπές διαμέτρου 0,22μm.
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA).

Εντός κωνικής φιάλης (τύπου «Erlenmeyer») γίνεται ανάμιξη 10g εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης 6B με 300mL απεσταγμένου νερού. Το αιώρημα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1h προκειμένου να ενυδατωθεί η ρητίνη. Στο στόμιο της κωνικής φιάλης τοποθετείται χωνί με ενσωματωμένο ηθμό από πορώδες υλικό. Η κωνική φιάλη συνδέεται σε γραμμή κενού, το αιώρημα ρητίνης μεταφέρεται στο χωνί και εκπλένεται με 2L αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού. Σε 100mL διαλύματος σύζευξης διαλυτοποιούνται 6g θειικής δεξτράνης. Η ρητίνη μεταφέρεται εντός του διαλύματος θειικής δεξτράνης. Το αιώρημα εισάγεται σε επωαστικό κλίβανο και ανακινείται ήπια όλη τη νύχτα, στους 37°C. Την επόμενη μέρα, προστίθενται 10mL αιθανολαμίνης στο αιώρημα και γίνεται ανακίνηση στους 37°C, όλη τη νύχτα. Το μίγμα μεταφέρεται στο χωνί με τον ενσωματωμένο ηθμό και εκπλένεται με 1L διαλύματος σύζευξης διάλυμα του πληρωτικού υλικού σε DPBS φυλάσσεται στους 4°C. Για να πακεταριστεί η στήλη, φορτώνονται στην κολόνα ~20mL πληρωτικού υλικού και εκπλένονται με 0,5L DPBS.

### 6.11.2 Προετοιμασία δείγματος πριν τη φόρτωση στη στήλη

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (20mM Tris, 0,2M NaCl, pH 7,4). Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου με οπές 0,22μm.

Οι πρωτεΐνες προς καθαρισμό λαμβάνονται από επιμόλυνση HTB-13 κυττάρων με αδενοϊούς. Το μέσο που συλλέγεται έπειτα από την επιμόλυνση υφίσταται λυοφιλίωση προς συμπύκνωση, έπειτα διαπίδυση έναντι 25mM NH₄HCO₃ και ξανά λυοφιλίωση μέχρι ξηρού (περιγραφή στην παράγραφο 6.10.5.1). Η λυοφιλιωμένη σκόνη κάθε απολιποπρωτεΐνης προς καθαρισμό διαλυτοποιείται στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης σεφαρόζης. Σε περίπτωση που δεν διαλυτοποιείται, προστίθεται υδροχλωρική γουανιδίνη, σε τελική συγκέντρωση 6M. Το διάλυμα με την υδροχλωρική γουανιδίνη αποδιατάσσεται για 1h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα υφίσταται διαπίδυση έναντι 20mM Tris, 0,2M NaCl, pH 7,4 όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα διαπιδάται δύο φορές για 6h και τέλος, υφίσταται διαπίδυση όλη τη νύχτα.

## 6.11.3 Εξισορρόπηση της στήλης και καθαρισμός αποΕ.

- Σύστημα FPLC (AKTA)
- Χρωματογραφική στήλη εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης 6Β
- Ρυθμιστικό διάλυμα Α (20mM Tris, 0,2M NaCl, pH 7,4)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Β (20mM Tris, 1M NaCl, pH 7,4)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Γ (20mM Tris, 1,2M NaCl, pH 7,4)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Δ (20mM Tris, 2M NaCl, pH 7,4)

Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των απολιποπρωτεϊνών. Κατά κανόνα τηρήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Η στήλη εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα Α. Η έκπλυση γίνεται με ροή 1mL/min για 30min. Το διάλυμα της πρωτεΐνης φορτώνεται στη στήλη με αργή ροή 0,2mL/min, ενώ παράλληλα συλλέγεται το διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη και δεν συγκρατείται στο πληρωτικό της υλικό (flow-through). Στη συνέχεια, ακολουθείται βαθμίδα έκλουσης από 100% διαλύματος Α σε 100% διάλυμα Β, με ροή 1mL/min και συνολικό χρόνο διεξαγωγής της βαθμίδας 90min. Έπειτα η στήλη εκπλένεται με 100% διάλυμα Β για 30min (υπό ροή 1mL/min). Η στήλη εκπλένεται 100% διάλυμα Γ για επιπλέον 30min και τέλος, εκπλένεται με διάλυμα Δ για 30min υπό την ίδια ροή. Η συλλογή των κλασμάτων γίνεται σε δοχεία τύπου «eppendorf» ανά 1,5mL. Η αποΕ εκλούεται μεταξύ συγκεντρώσεων 260mM και 480mM NaCl.

# 6.12 Αντίδραση απογλυκοζυλίωσης της αποΕ με τη χρήση του ενζύμου νευραμινιδάση [118]

- Νευραμινιδάση, 50000U/mL (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα G1 10x (50mM κιτρικό νάτριο, pH 6,0 στους 25°C). Παρέχεται μαζί με τη νευραμινιδάση (New England Biolabs)
- Υδρόλουτρο

Σε 55μL διαλύματος της αντίδρασης απογλυκοζυλίωσης περιλαμβάνεται αποΕ (σε DPBS) σε τελική συγκέντρωση ~0,09mg/mL, 5,5μL διαλύματος G1 (10x) και 10units νευραμινιδάσης. Παράλληλα με την αντίδραση απογλυκοζυλίωσης, παρασκευάζεται διάλυμα-μάρτυρας, στο οποίο δεν περιέχεται ένζυμο, αλλά μόνο 5,5μL διαλύματος G1. Τα διαλύματα, παρουσία ενζύμου και μη, επωάζονται σε υδρόλουτρο 37°C για 4h.

Μετά την επώαση, λαμβάνεται ίσος όγκος δείγματος από το διάλυμα της αντίδρασης και το διάλυμα- μάρτυρα. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, για να παρατηρηθεί η μεταβολή στο μοριακό βάρος των ζωνών των απογλυκοζυλιωμένων δειγμάτων σε σχέση με τα μη απογλυκοζυλιωμένα.

## 6.13 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) με αποΕ3 [173]

- 2-ολεϋλ-1-παλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (POPC, Sigma Aldrich)
- Χοληστερόλη (Sigma Alrdrich)
- Χολικό νάτριο (Sigma Aldrich)
- Stock διάλυμα POPC 20mg/mL σε διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1)
- Stock διάλυμα χοληστερόλης 2mg/mL σε διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.01% w/v EDTA, pH 8,0)
- Stock διάλυμα χολικού νατρίου 30mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (1x)
- αποΕ3 (λυοφιλιωμένη)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Μεθανόλη (Merck)
- EDTA (Riedel de-Haën)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
- Οβίδα Ν<sub>2</sub>
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μεμβράνη διαπίδυσης, MWCO 12000Da (Sigma-Aldrich)
- Υγρή Μεμβράνη διαπίδυσης, MWCO 50kDa (Fisher)

Για την παρασκευή συμπλόκων rHDL, χρησιμοποιείται 100:10:1:100 (POPC: χοληστερόλης: apoE3: χολικού νατρίου). Σε ένα τυπικό πείραμα, μεταφέρονται 56,5μg χοληστερόλης (από το stock διάλυμα χοληστερόλης 2mg/mL σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη, 2:1) και 1,11mg POPC (από το stock διάλυμα POPC 20mg/mL σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη, 2:1). Το μίγμα λιπιδίων-

χοληστερόλης ξηραίνεται υπό ροή αζώτου και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.01% w/v EDTA, pH 8,0) με επαναλαμβανόμενη ήπια ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 30s ακολουθούμενη απο επώαση σε λουτρό πάγου για 30s. Η διαδικασία παρασκευής ομογενούς αιωρήματος λιπιδίων-χοληστερόλης διαρκεί 1h. Ακολούθως, προστίθενται 0,63mg χολικού νατρίου και το αιώρημα διαυγάζεται και φυλάσσεται σε λουτρό πάγου για 1h. Έπειτα γίνεται προσθήκη 0,5mg αποΕ3 και η επώαση του αιωρήματος σε πάγο συνεχίζεται για μία επιπλέον ώρα. Ακολουθεί διαπίδυση του αιωρήματος έναντι διαλύματος άλατος 1x, στους 4°C, με την οποία επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του χολικού νατρίου μέσω μεμβράνης διαπίδυσης με οπές που επιτρέπουν τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 12000Da. Η διαπίδυση διεξάγεται όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα λαμβάνουν χώρα δύο διαπιδύσεις διάρκειας 4h και τέλος, τα δείγματα διαπιδώνται όλη τη νύχτα. Το πρωί της επόμενης μέρας, γίνεται αντικατάσταση της μεμβράνης διαπίδυσης με νέα που επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 50kDa προς απομάκρυνση των μορίων της πρωτεΐνης που δεν έχουν προσδεθεί στα λιποσώματα. Λαμβάνουν χώρα δύο διαπιδύσεις διάρκειας 4h και έπειτα από μία τρίτη αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης, τα δείγματα διαπιδώνται όλη τη νύχτα. Στα σωματίδια διαβιβάζεται αέριο άζωτο για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπιδίων και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

Προκειμένου να γίνει χαρακτηρισμός και σύγκριση των σωματιδίων rHDL που περιλαμβάνουν αποΕ3 (αγρίου τύπου ή κάποια από τις τρεις μεταλλάξεις της), όλα τα δείγματα παρασκευάζονται από το ίδιο αιώρημα λιπιδίων-χοληστερόλης (4x). Το αιώρημα χωρίζεται σε τέσσερις γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιέχουν καθένα από τα τέσσερα πρωτεϊνικά δείγματα αποΕ3. Η πειραματική διαδικασία παρασκευής σωματιδίων διεξάγεται παράλληλα για όλα τα δείγματα αποΕ.

# 6.14 Πέψη της «ελεύθερης λιπιδίων» ή «εντός λιποπρωτεϊνών» αποΕ με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστάση [173].

- Θρυψίνη (Applichem, Γερμανία)
- Χυμοθρυψίνη (Applichem, Γερμανία)
- Ελαστάση (Applichem, Γερμανία)
- PMSF (Applichem)
- Υδρόλουτρο

Σε διάλυμα ελεύθερης λιπιδίων αποΕ ή ανασυγκροτημένων σωματιδίων «τύπου HDL» συγκέντρωσης 0,08mg/mL προστίθεται διάλυμα θρυψίνης, χυμοθρυψίνης, ή ελαστάσης σε τελική συγκέντρωση 0,01, 0,1, 1 και 10μg/mL. Το διάλυμα κάθε αντίδρασης καθίσταται ομοιογενές με ανάδευση με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Η διεξαγωγή των αντιδράσεων διακόπτεται με την προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 1,7mM και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο.

Ακολουθεί ανάλυση των διαλυμάτων κάθε αντίδρασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παρ. 6.6.1) προς μελέτη των προϊόντων πρωτεόλυσης και τυχόν συσσώρευση ευαίσθητων σε πρωτεόλυση θραυσμάτων της ελεύθερης ή προσδεδεμένης σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αποΕ.

### 6.15 Προετοιμασία δειγμάτων για βιοφυσική μελέτη [91, 118, 173]

- Μεμβράνη διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που να επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 10000Da (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm)
- Φυγόκεντρος (Labnet)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)

Πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τη βιοφυσική και λειτουργική μελέτη της λιπιδιωμένης και μη αποΕ, τα λυοφιλιωμένα πρωτεϊνικά δείγματα που φυλάσσονται στους -80°C, υφίστανται αποδιάταξη σε συγκέντρωση 0,2mg/mL με τη χρήση διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης 6M, σε διαλύτη DPBS και 1mM DTT. Η αποδιάταξη λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1h. Ακολούθως, τα δείγματα υφίστανται διαπίδυση έναντι 2L διαλύματος DPBS, στους 4°C, μέσω μεμβράνης με οπές που να επιτρέπουν τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 10kDa. Η διαπίδυση διαρκεί όλη τη νύχτα και την επόμενη μέρα, λαμβάνει χώρα μία διαπίδυση διάρκειας 6h, ακολουθούμενη από νέα που διεξάγεται και πάλι όλη τη νύχτα. Με την παρατεταμένη διαπίδυση επιτυγχάνεται η σταδιακή απομάκρυνση του αποδιατάκτη από το περιβάλλον της πρωτεΐνης και η επαναδιάταξή της σε λειτουργική διαμόρφωση.

Η αποΕ συσσωματώνεται και κατακρημνίζεται. Για το λόγο αυτό, πριν από κάθε πείραμα μελέτης της σχέσης δομής- λειτουργίας της, μετά την επαναδιάταξη, λαμβάνει χώρα φυγοκέντρηση για 15min, σε 12000g προς απομάκρυνση τυχόν ιζήματος και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος. Στο διάλυμα των πρωτεϊνών προστίθεται DDT ώστε η τελική του συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 1mM. Ακολούθως, τα πρωτεϊνικά διαλύματα ποσοτικοποιούνται και φυλάσσονται σε πάγο μέχρι τη χρήση τους στα πειράματα.

#### 6.16 Πειράματα φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190-260nm) χρησιμοποιείταιι προς προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού που λαμβάνεται για κάθε πρωτεΐνη σχετίζεται με το ποσοστό των καταλοίπων που βρίσκονται σε δομή α-έλικας, β-φύλλου, β-στροφής και τυχαίου σπειράματος. Κάθε πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού αποτελεί γραμμικό συνδυασμό των παραπάνω χαρακτηριστικών φασμάτων με την προσθήκη ενός επιπλέον όρου που αντιστοιχεί στη συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων.

### 6.16.1 Λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού και επεξεργασία [91, 118, 173]

- Φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)
- Θερμοστάτης Peltier
- Κυψελίδα χαλαζία με οπτική διαδρομή 1mm (Hellma, Germany)
- Διάλυμα DPBS 1x (KCl 0,2 mg/L, KH<sub>2</sub>PO4 0,2mg/L, NaCl 8mg/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,17mg/L) (LONZA).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.01% w/v EDTA, pH 8,0)

Για τη λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού εισάγονται εντός της κυψελίδας χαλαζία 150μL δείγματος ελεύθερης λιπιδίων ή προσδεδεμένης σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αποΕ. Τα δείγματα περιλαμβάνουν αποΕ σε συγκέντρωση ~0,1mg/mL. Πριν την εισαγωγή του δείγματος της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ, εισάγονται 150μL διαλύματος DPBS, έναντι του οποίου γίνονται οι διαπιδύσεις αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Πριν την εισαγωγή δείγματος λιποπρωτεϊνικών σωματίδιαν αποΕ, εισάγονται 150μL του ρυθμιστικού διαλύματος 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.01% w/v EDTA, pH 8,0, που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση ως τυφλό και το φάσμα του αφαιρείται στη συνέχεια από το φάσμα της πρωτεΐνης ή των ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνών αντίστοιχα.

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για τη λήψη των φασμάτων είναι οι ακόλουθες: Εύρος μήκους κύματος: 190-260nm για τα πρωτεϊνικά δείγματα και 200-260nm για τα λιποπρωτεϊνικά δείγματα, εύρος ζώνης: 1nm, χρόνος απόκρισης: 8s, χρόνος λήψης μέτρησης: 0,2nm, ταχύτητα λήψης φάσματος: 50nm/min. Για κάθε πρωτεΐνη λαμβάνονται τουλάχιστον 5 φάσματα και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών.

Μετά τη διόρθωση των φασμάτων κάθε δείγματος ως προς το τυφλό, ακολουθεί αποσυνέλιξη μέσω της μεθόδου CDSSTR του διακομιστή Dichroweb (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml), προκειμένου να ληφθεί το % ποσοστό των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της αποΕ.

Στα διορθωμένα φάσματα, υπολογίζεται επίσης η μοριακή ελλειπτικότητα κάθε απολιποπρωτεΐνης από το σήμα κυκλικού διχρωισμού μέσω της εξίσωσης (1) (βλ. παρ. 3.2). Το %ποσοστό α-έλικας που περιέχεται στην αποΕ στα 208 και 222nm υπολογίζεται από τις εξισώσεις (3) και (4) αντίστοιχα (βλ. παρ. 3.2).

6.16.2 Θερμική αποδιάταξη της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ, επεξεργασία και εξαγωγή αποτελεσμάτων [91, 118, 173]

• Φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)

- Θερμοστάτης Peltier
- Κυψελίδα χαλαζία με οπτική διαδρομή 1mm (Hellma, Germany)

Στα πειράματα θερμικής αποδιάταξης της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ παρατηρείται η μεταβολή της ελλειπτικότητας στα 222nm της αποΕ συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των απολιποπρωτεϊνών μελετάται στην περιοχή θερμοκρασιών 20°C-80°C (ή 90°C), καθώς η μετάπτωση από τη διατεταγμένη στην αποδιατεταγμένη κατάσταση της αποΕ παρατηρείται στα πλαίσια της περιοχής αυτής. Η θερμοκρασία αυξάνεται ανά 0,2°C, με ρυθμό μεταβολής 1°C/min.

Τα πειραματικά δεδομένα που αντιστοιχούν σε μεταβολή θερμοκρασίας από 30°C έως 80°C συλλέγονται και υφίστανται προσαρμογή (fit) σε σιγμοειδή καμπύλη Boltzman ή σε μοντέλο αποδιάταξης τριών καταστάσεων, με το πρόγραμμα Prism [91].

Οι θερμοδυναμικές πληροφορίες μπορούν να ληφθούν από τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης με τη χρήση της εξίσωσης van't Hoff:

 $d(lnk)/d(1/T)=-\Delta H/R.$ 

(6)

Στο σχήμα της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης η θερμοκρασία μετάπτωσης, Tm, καθορίζει το μεσαίο σημείο της μετάπτωσης και η ενθαλπία van't Hoff, ΔH, είναι αντιστρόφως ανάλογη του εύρους της μετάπτωσης. Η αποδιάταξη της αποΕ περιλαμβάνει τη μετάπτωση μεταξύ δύο καταστάσεων, την διατεταγμένης F, και της αποδιατεταγμένης U:

F↔U

Η σταθερά ισορροπίας για αυτή την παραπάνω αντίδραση δίνεται από την εξίσωση:

k= U/ F=f/ (1-f)

(7)

όπου f είναι το κλάσμα της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης και μπορεί να υπολογιστεί αλγεβρικά από την κλασματική μεταβολή του σήματος κατά τη θερμική αποδιάταξη [94].

Εφόσον τα συλλεχθέντα πειραματικά αποτελέσματα αναλυθούν σε γράφημα που περιλαμβάνει στον άξονα y το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 222nm και στον άξονα x την θερμοκρασία (σε °C) προκύπτει μία σιγμοειδής καμπύλη που περιγράφει τη μετάπτωση από την κατάσταση F στην κατάσταση U. Τα πειραματικά δεδομένα μπορούν να προσαρμοστούν σε μοντέλο Boltzman και να ληφθούν οι τιμές σήματος διατεταγμένης (S<sub>F</sub>) και αποδιατεταγένης πρωτεΐνης (S<sub>U</sub>), που υπολογίζονται από το πρόγραμμα προσαρμογής. Εναλλακτικά οι τιμές S<sub>F</sub> και S<sub>U</sub> μπορούν να ληφθούν από γραμμική προέκταση της προ- και μετα- μεταπτωτικής περιοχής, χωρίς την προσαρμογή σε μοντέλο Boltzman [175].

Στην περιοχή της μετάπτωσης, προσδιορίζεται για κάθε θερμοκρασία η σταθερά k από τη σχέση:

 $k_{eq}(T)=(S_{F}-S_{obs})/(S_{obs}-S_{U}),$ 

όπου S<sub>obs</sub>(T) είναι το σήμα που λαμβάνεται πειραματικά σε κάθε θερμοκρασία. Σχηματίζεται η γραφική παράσταση ln(k<sub>eq</sub>)=f(1/T), όπου η θερμοκρασία T είναι σε Kelvin και προσδιορίζεται η εξίσωση της γραμμικής γραφικής παράστασης, y=αx+β, που αντιστοιχεί στην εξίσωση

(8)

(9).

(10)

### $ln(k_{eq})=\Delta S/R-(\Delta H/R)\cdot 1/T$

R είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων που ισούται με 1,98 cal/(mol·K) και ΔS, είναι η μεταβολή στην εντροπία. Η μεταβολή στην ενθαλπία, ΔΗ (σε cal/mol), αντιστοιχεί στην απόλυτη τιμή της κλίσης της εξίσωσης πολλαπλασιασμένης με την τιμή της παγκόσμιας σταθεράς αερίων [175].

Ο συντελεστής συνεργιστικότητας της μετάπτωσης, n, υπολογίζεται από την εξίσωση Hill:

n=(log81)/ log(T<sub>0,9</sub>/T<sub>0,1</sub>),

όπου Τ<sub>0,9</sub> και Τ<sub>0,1</sub> είναι οι θερμοκρασίες στις οποίες η μετάπτωση αποδιάταξης έχει φτάσει σε ποσοστό 90 και 10% αντίστοιχα [95].

# 6.16.2.1 Πειράματα μελέτης της αντιστρεπτότητας της θερμικής αποδιάταξης της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ [91]

- Φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)
- Θερμοστάτης Peltier
- Κυψελίδα χαλαζία με οπτική διαδρομή 1mm (Hellma, Germany)

Η μελέτη της αντιστρεπτότητας (reversibility) της μεταβολής της δευτεροταγούς δομής της αποΕ περιλαμβάνει την αποδιάταξή της με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 20°C σε 80°C, ακολουθούμενη από μείωση από 80°C σε 20°C και τέλος ξανά από 20°C σε 80°C, με ταχύτητα μεταβολής της θερμοκρασίας 1°C/min. Η αύξηση της θερμοκρασία γίνεται ανά 0,2°C και λαμβάνεται το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 222nm. Το πείραμα της αντιστρεπτότητας της θερμικής αποδιάταξης δίνει πληροφορίες σχετικά με τη δομική πλαστικότητα της αποΕ καθώς και την τάση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης να συσσωματώνεται μη αντιστρεπτά.

Τα πειραματικά δεδομένα που συλλέγονται, κανονικοποιούνται ώστε το σήμα κυκλικού διχρωισμού (που λαμβάνεται κατά την πρώτη αποδιάταξη) σε θερμοκρασία 20°C να αντιστοιχεί στο 0% της αποδιάταξης και το σήμα που λαμβάνεται στους 80°C (εφόσον η καμπύλη έχει φτάσει σε «plateau») να αντιστοιχεί στο 100% της αποδιάταξης. Με αντίστοιχη κανονικοποίηση, παρατηρείται το ποσοστό ανάκτησης της δευτεροταγούς δομής κάθε απολιποπρωτεΐνης κατά την επαναδιάταξή της από 80°C σε 20°C και τέλος, το ποσοτό αποδιάταξης κατά τη δεύτερη αποδιάταξή της από 20 σε 80°C.

## 6.16.3 Θερμική αποδιάταξη λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν αποΕ [173]

Στα πειράματα θερμικής αποδιάταξης των ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνών «τύπου HDL» παρατηρείται η μεταβολή της ελλειπτικότητας στα 222nm της προσδεδεμένης σε

λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αποΕ συναρτήσει της θερμοκρασίας και κατά συνέπεια, μελετάται η σταθερότητα της δομής των λιποπρωτεϊνών έναντι της αύξησης της θερμοκρασίας. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος η θερμοκρασία αυξάνεται από 20 μέχρι και 95°C με ταχύτητα μεταβολής 1°C/min. Οι παράμετροι διεξαγωγής του πειράματος είναι οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται κατά τη θερμική αποδιάταξη της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ (βλ. παρ. 6.16.2).

### 6.17 Πειράματα φθορισμομετρίας [91, 118, 173]

### 6.17.1 Χημική αποδιάταξη

- Φασματοφθορισμόμετρο PTI Quantamaster 3500 (Photon Technology International, New Jersey) ή F-2500 Hitachi (High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan), με προσαρμοσμένο σύστημα ανάδευσης με μαγνητικό αναδευτήρα.
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0Μ σε διαλύτη DPBS 1x
- Κυψελίδα χαλαζία χωριτικότητας 4mL (Hellma)

Στην κυψελίδα εισάγεται 1,5mL διαλύματος πρωτεΐνης και ακολουθεί τιτλοδότηση με προσθήκη σταδιακά αυξανόμενου όγκου διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0M, μέχρι τελικής συγκέντρωσης αποδιατάκτη ~3,5M. Η ομοιογένεια του πρωτεΐνικού διαλύματος έπειτα από κάθε προσθήκη του αποδιατάκτη επιτυγχάνεται με ήπια ανάδευση. Το δείγμα επωάζεται για 2min στο σκοτάδι για να αποκατασταθεί η ισορροπία αναδιπλωμένης- αποδιπλωμένης πρωτεΐνης και ακολούθως, λαμβάνεται το σήμα φθορισμού στα 340nm, έπειτα από διέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης στα 295nm.

Τα πειραματικά δεδομένα από τη χημική αποδιάταξη προσαρμόζονται μαθηματικά σε μοντέλο αποδιάταξης τριών καταστάσεων (βλ. παρ. 3.3.1):

N⇔I⇔U

Γίνεται προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης τριών καταστάσεων, με τη χρήση της εξίσωσης:

$$y = [TN + A_1 \times (T_1 + T_U \times A_2)] / [1 + A_1 \times (1 + A_2)],$$
(11)

όπου y είναι το σήμα φθορισμού, Τ<sub>Ν</sub>, Τι, Τ<sub>υ</sub> είναι το σήμα φθορισμού για τη διατεταγμένη, ενδιάμεση και αποδιατεταγμένη κατάσταση της πρωτεΐνης αντίστοιχα [176]. Τα Α₁ και Α₂ είναι:

$$A_{1} = \exp \left[ \left[ m_{ni} x(x - x_{ni50}) \right] / RxT \right]$$
(12)

(13).

και A<sub>2</sub> =exp [[
$$m_{iu}$$
×(x-x<sub>iu50</sub>)]/R×T]

Το x είναι η συγκέντρωση του αποδιατάκτη σε M, R είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων (0,001986 kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) και T, η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα το πείραμα (298K). Οι παράμετροι x<sub>ni50</sub> και x<sub>iu50</sub> δηλώνουν τη συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης που απαιτείται ώστε οι μεταπτώσεις από τη διατεταγμένη στην ενδιάμεση και από την ενδιάμεση στην αποδιατεταγμένη κατάσταση να έχουν διεξαχθεί κατά 50%, αντίστοιχα. Οι παράμετροι m<sub>ni</sub>

και m<sub>iu</sub> αντιστοιχούν στην κλίση της μετάπτωσης από τη διατεταγμένη στην ενδιάμεση κατάσταση και από την ενδιάμεση στην αποδιατεταγμένη όταν αυτή έχει επίσης διεξαχθεί κατά 50%, αντίστοιχα.

Οι ακόλουθες εξισώσεις:

$$\Delta G_2 = m_{iu} \times x_{iu50} \tag{15}$$

χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό:

 $\circ$  της φαινόμενης μεταβολής της ενέργειας κατά Gibbs,  $\Delta G_1$ , κατά την πρώτη μετάπτωση από την διατεταγμένη (N-native) στην ενδιάμεση κατάσταση (I-intermediate),

της φαινόμενης μεταβολής της ενέργειας κατά Gibbs, ΔG<sub>2</sub>, κατά την μετάπτωση από την ενδιάμεση (Ι) στην αποδιατεταγμένη κατάσταση (U-unfolded) και

της ΔG<sub>total</sub>, που αντιστοιχεί στη συνολική μεταβολή της φαινόμενης ενέργειας
 κατά Gibbs από τη διατεταγμένη στην αποδιατεταγμένη κατάσταση.

Τέλος, λαμβάνει χώρα κανονικοποίηση των πειραματικών αποτελεμάτων της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού και των προσαρμοσμένων (fitted) σε κλίμακα από 1 (100% διατεταγμένη δομή) σε 0 (0% διατεταγμένη δομή).

### 6.17.2 Πρόσδεση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS [91, 118, 173]

- Φασματοφθορισμόμετρο PTI Quantamaster 3500 (Photon Technology International, New Jersey)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA)
- Κυψελίδα χαλαζία χωριτικότητας 4mL (Hellma)
- ANS (1-anilinonafthalene-8-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich)
- DMSO (Sigma)
- Διάλυμα 50mM ANS σε DMSO (Stock)
- Πλακίδιο 96 θέσεων ( Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN infinite® M200).

Στα πειράματα πρόσδεσης ANS που πραγματοποιούνται στο φασματοφθορισμόμετρο PTI Quantamaster 3500, χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία, εντός της οποίας εισάγεται 1,5mL διαλύματος αποΕ σε συγκέντρωση 0.04mg/mL. Λαμβάνει χώρα διέγερση του δείγματος στα 395nm και η λήψη του φάσματος γίνεται στα 420-550nm. Λαμβάνονται τα φάσματα φθορισμού των απολιποπρωτεϊνών Ε μετά την προσθήκη 7,5μL stock διαλύματος ANS (τελική συγκέντρωση ANS ~250μM), καθώς και το φάσμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης.

Στα πειράματα πρόσδεσης ANS που πραγματοποιούνται στο μετρητή φθορισμού πλακιδίων, πραγματοποιείται και πάλι διέγερση των δειγμάτων στα 395nm και λήψη του φάσματος φθορισμού στην περιοχή 420-550nm. Τα δείγματα βρίσκονται σε πηγάδια πλακιδίου 96 θέσεων. Σε κάθε πηγάδι εισάγονται 160μL δείγματος και προστίθεται 1μL από το stock διάλυμα ANS (τελική συγκέντρωση ANS ~310μM). Μία σειρά πηγαδιών περιλαμβάνει τυφλά δείγματα, που περιέχουν 160μL διαλύματος DPBS και 1μL ANS. Στα πηγάδια των ακόλουθων σειρών, περιλαμβάνονται πολλαπλά δείγματα που περιέχουν 160μL δείγματος αποΕ αγρίου τύπου ή μετάλλαξης (συγκέντρωσης 0,66mg/mL) και 1μL stock διαλύματος ANS.

Υπολογίζεται η επιφάνεια που καλύπτει κάθε φάσμα στην περιοχή 420-550nm. Ακολούθως, υπολογίζονται οι λόγοι της επιφάνειας του φάσματος του ιχνηθέτη με πρωτεΐνη προς την επιφάνεια του φάσματος του ιχνηθέτη απουσία πρωτεΐνης και λαμβάνεται ο μέσος όρος για κάθε δείγμα. Όσο μεγαλύτερος ο παραπάνω λόγος, τόσο πιο εκτεταμένη υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης είναι εκτεθημένη στο διαλύτη και προσβάσιμη από το ANS για πρόσδεσή του.

### 6.18 Πείραμα διαύγασης αιωρήματος DMPC από αποΕ [91, 118, 173]

### 6.18.1 Παρασκευή αιωρήματος DMPC

- DMPC (Sigma-Aldrich)
- Χλωροφόρμιο, Μεθανόλη (Merck)
- Διάλυμα χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1)
- DPBS 10x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (LONZA).
- DTT (Applichem)
- Οβίδα αζώτου
- Γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας
- Λουτρό υπερήχων
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0M σε DPBS 1x

 Διάλυμα διαπίδυσης (1x DPBS, 0,1mM EDTA) έναντι του οποίου έγινε η διαπίδυση επαναδιάταξης των πρωτεϊνικών δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα αναμόρφωσης του DMPC. Το διάλυμα διαπίδυσης υφίσταται απαέρωση εντός λουτρού υπερήχων.

• Διάλυμα Α: 2.45Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, 2,45mM DTT σε διάλυμα διαπίδυσης

Ζυγίζεται DMPC εντός γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα και διαλυτοποιείται σε διάλυμα χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1) σε συγκέντρωση ~10mg/mL. Κατόπιν, εξατμίζονται οι πτητικοί διαλύτες υπό ροή αερίου αζώτου. Τα ξηραμένα λιπίδια επαναιωρούνται στο απαερωμένο διάλυμα διαπίδυσης σε συγκέντρωση 4,46mg/mL. Το αιώρημα DMPC παρασκευάζεται έπειτα από ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 10min. Ακολούθως, το αιώρημα λιπιδίων αναμιγνύεται με απαερωμένο διάλυμα Α προς ρύθμιση σε συγκέντρωση 1,55mg DMPC/mL σε DPBS 1x, 0,1mM EDTA, 1,6mM DTT και 1,6M υδροχλωρική γουανιδίνη.

#### 6.18.2 Κινητική διαύγασης αιωρήματος DMPC από αποΕ

- Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS
- Θερμοστάτης Perkin-Elmer PCB 1500 Peltier
- 5 Κυψελίδες Quartz (Fisher brand)
- EDTA (Riedel de-Haën)
- DTT (Applichem)
- Βρωμιούχο κάλιο (Sigma)

DPBS 1x, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (KCI 0,2 mg/L, KH<sub>2</sub>PO4 0,2mg/L, NaCI 8mg/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,17mg/L) (LONZA).

- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0M σε DPBS 1x
- Διάλυμα Α: 2.45Μ υδροχλωρικής γουανιδίνης, 2,45mM DTT σε διάλυμα διαπίδυσης
- Ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (DPBS 1x, 47,5%w/v KBr, 0,1mM EDTA)

Στο φασματοφωτόμετρο είναι προσαρμοσμένη μετακινούμενη βάση που περιλαμβάνει πολλαπλούς υποδοχείς κυψελίδων για τη διεξαγωγή πειραμάτων κινητικής. Παράλληλα το φασματοφωτόμετρο είναι συνδεδεμένο με θερμοστάτη που επιτρέπει τη ρύθμιση και διατήρηση της θερμοκρασίας των δειγμάτων που περιέχονται στις κυψελίδες στους 24±0.1°C. Πέντε κυψελίδες τοποθετούνται σε γειτονικές θέσεις στους υποδοχείς της μετακινούμενης βάσης του φασματοφωτομέτρου. Στις πέντε κυψελίδες εισάγονται 974,1μL διαλύματος διαπίδυσης, 81μL ρυθμιστικού διαλύματος άλατος και 44,9μL διαλύματος Α. Η απορρόφηση των δειγμάτων (απουσία πρωτεΐνης και DMPC) στα 325nm, ορίζεται μηδενική. Σε καθεμία από τις τέσσερις κυψελίδες εισάγονται 950μ διαλύματος απο αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης (συγκέντρωσης 0,05mg/mL). Στην κυψελίδα που περιλαμβάνει το τυφλό διάλυμα, εισάγονται 950μL διαλύματος διαπίδυσης, απουσία πρωτεΐνης. Ακολούθως, εισάγονται 81μL ρυθμιστικού διαλύματος άλατος σε κάθε δείγμα (τυφλό και μη). Τέλος, προστίθενται 69μL αιωρήματος DMPC συγκέντρωσης 1,55mg/mL σε διάλυμα που περιλαμβάνει DPBS 1x, 0,1 EDTA, 1,6mM DTT και 1,6M υδροχλωρική γουανιδίνη. Αναδεύονται όλα τα δείγματα ώστε να γίνουν ομοιογενή και ξεκινάει η μελέτη της κινητικής διαύγασης των δειγμάτων, που διαρκεί 1h. Παρατηρείται η μείωση της απορρόφησης (σκέδασης) των δειγμάτων στα 325nm και λαμβάνονται μετρήσεις ανά min. Όλα τα δείγματα αναδεύονται ανά 2min με τη χρήση πιπέτας προς διατήρηση της ομοιογένειάς τους.

Γίνεται προσαρμογή (fit) των πειραματικών αποτελεσμάτων σε μοντέλο εκθετικής μείωσης δύο φάσεων με το πρόγραμμα Prism, προκειμένου να μελετηθούν τυχόν διαφορές στις παραμέτρους της κινητικής αναμόρφωσης των σωματιδίων από την αποΕ αγρίου τύπου συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες.

### 6.19 Πειράματα Δυναμικής Σκέδασης φωτός (DLS) [91, 173]

- Μετρητής μεγέθους σωματιδίων Zetasizer nano series (Malvern Instruments Ltd, UK)
- Κυψελίδα χαλαζία χωριτικότητας 4mL (Hellma)

Τα πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός διεξήχθηκαν από τη Δρ. Ελένη Ευθυμιάδου (Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) [173]. Στην κυψελίδα εισάγεται 1mL δείγματος ελεύθερης λιπιδίων αποΕ ή λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν αποΕ σε συγκέντρωση 0.1mg/mL. Ακολούθως, το δείγμα εισάγεται στην υποδοχή του οργάνου και καταγράφεται η κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου των περιεχόμενων αποΕ ή λιποπρωτεϊνών αντίστοιχα.

## 6.20 Λήψη εικόνων των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιλαμβάνουν αποΕ με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

Η λήψη εικόνων των ανασυγκροτημένων σωματιδίων «τύπου HDL» με αποΕ3 αγρίου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της έλαβε χώρα με τη χρήση της μεθόδου σταγόνας αρνητικής χρώσης από τον Dr. Donald Gatz (Τμήμα Φυσιολογίας και Βιοφυσικής, Πανεπιστήμιο Βοστώνης) [173].

Επιλέγουμε δειγματοληπτικά 100 σωματίδια «τύπου HDL» με αποΕ3 από κάθε εικόνα και μετράμε τη διάμετρό τους με τη χρήση του λογισμικού Adobe Photoshop. Ακολούθως, αναπαριστούμε τους υποπληθυσμούς των ανασυγκροτημένων σωματιδίων σε γράφημα κατανομής συχνότητας βάσει της διαμέτρου τους με τη χρήση του προγράμματος Graphpad prism.

# 6.21 Πείραμα συσσωμάτωσης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» έπειτα από επώαση με τη φωσφολιπάση Α2 [173]

- Φωσφολιπάση A2 (Sigma-Aldrich)
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Pierce)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (5mM HEPES, pH 7,4, 140mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>)
- Υδρόλουτρο

Σε δείγμα ανασυγκροτημένων σωματιδίων «τύπου HDL», σε συγκέντρωση 0,1mg/mL ως προς αποΕ, προστίθεται φωσφολιπάση A2 και αλβουμίνη ορού βοός σε τελική συγκέντρωση 150ng/mL και 1mg/mL αντίστοιχα. Το διάλυμα της αντίδρασης περιλαμβάνει 5mM HEPES, pH 7,4, 140mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub> και 5mM MgCl<sub>2</sub>. Το διάλυμα της αντίδρασης καθίσταται

ομοιογενές με ανάδευση και επωάζεται σε υδρόλουτρο στους 37°C. Μετράται η υδροδυναμική διάμετρος των περιεχόμενων σωματιδίων στο διάλυμα της αντίδρασης αμέσως μετά την ανάμιξη των συστατικών της (σε χρόνο μηδέν), καθώς και μετά την πάροδο 24h, με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή μελετώνται σημειακές μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ- που έχουν συσχετιστεί με διαφοροποίηση της λειτουργίας της αποΕ από τη φυσιολογική- ως προς την επίδρασή τους στη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα του μορίου.

Πιο συγκεκριμένα, προσεγγίζεται η σχέση δομής- λειτουργίας της αποΕ μέσα από τη μελέτη των δομικών μεταβολών που επάγουν στο μόριο της αποΕ:

- μεταλλάξεις που επιδρούν αρνητικά στη βιολογική λειτουργία της αποΕ καθώς
  σχετίζονται με παθογένεια (λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια, υπερλιποπρωτεϊναιμία
  τύπου III) και
- μεταλλάξεις που επιδρούν θετικά στη βιολογική λειτουργία της αποΕ, καθώς δρουν θεραπευτικά έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας σε αποΑ-Ι και αποΕ knock-out ποντίκια.

Η μελέτη περιλαμβάνει την έκφραση των αποΕ, μεταλλαγμένων και μη, στο ίδιο σύστημα έκφρασης κυττάρων, ακολουθώντας κοινό πρωτόκολλο καθαρισμού και κατεργασίας και ακολούθως τη διεξαγωγή βιοφυσικών πειραμάτων στα μεταλλαγμένα μόρια σε αντιπαραβολή με την αποΕ αγρίου τύπου.

Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης κάθε «ομάδας» μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ. Ακολούθως (στο κεφάλαιο 8), συζητώνται τα αποτελέσματα και εξάγωνται τα συμπεράσματα από κάθε μεμονωμένη μελέτη. Τέλος, καταγράφονται τα συνολικά συμπεράσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της υπόθεσης της παρούσας διατριβής.

# 7.1 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΥΛΠΙΙΙ σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Η ΥΛΠΙΙΙ είναι μία νόσος που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, καθώς και τη συσσώρευση β-VLDL σωματιδίων στο πλάσμα των ασθενών (βλ. παρ. 4.1.3). Τα β-VLDL σωματίδια αποτελούν πλούσια σε χοληστερόλη και τριγλυκερίδια υπολείμματα χυλομικρών και VLDL. Η συσσώρευσή τους αποτελεί- κατά κύριο λόγο- συνέπεια της ελλιπούς εκκαθάρισής τους από το πλάσμα λόγω της χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης της περιεχόμενης σε αυτά αποΕ στους LDL υποδοχείς. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενών που πάσχουν από ΥΛΠΙΙΙ είναι ομόζυγοι στο αλληλόμορφο που κωδικοποιεί την έκφραση της αποΕ2. Η συσχέτιση της αποΕ2 με την ΥΛΠΙΙΙ αποδίδεται κυρίως στην πολύ μικρή συγγένεια πρόσδεσής της στον LDL υποδοχέα -μικρότερη από 2%- συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Οι σημειακές, φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις αποΕ3 R145C, K146E και R136S έχουν συσχετιστεί με επικρατή μορφή κληρονομικότητας της νόσου. Οι παραπάνω μεταλλάξεις εντοπίζονται στην έλικα 4 του δεματιού τεσσάρων ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ,

εντός της περιοχής πρόσδεσης στον LDL-υποδοχέα και κωδικοποιούν μη συντηρητικές υποκαταστάσεις αμινοξέων (εικόνα 39).



Εικόνα 39. Αναπαράσταση τύπου cartoon της δομής της αμινο-τελικής περιοχής της ανθρώπινης αποΕ3 (PDB: 1LPE), όπου παρουσιάζεται η θέση των μεταλλάξεων Ε3 R145C, K146E και R136S [91].

Καθεμία από τις μεταλλάξεις παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα. Οι αποE3 R145C, K146E και R136S παρουσιάζουν 55%, λιγότερη από 10% και 60% συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου, αντίστοιχα. Αν και καθεμία από τις παραπάνω μεταλλάξεις διαθέτει μικρή συγγένεια πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα, καμία τους δεν διαθέτει τόσο χαμηλή (<2%) όσο η αποE2.

Το γεγονός πως η ΥΛΠΙΙΙ εμφανίζεται κατά 90% σε άτομα που φέρουν δύο αλληλόμορφα ε2, ενώ αρκεί ένα αλληλόμορφο ε3 που να κωδικοποιεί μία από τις παραπάνω μεταλλάξεις για την εμφάνιση της νόσου, υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός παθογένεσης δεν περιορίζεται στις αλλαγές συγγένειας με τον υποδοχέα LDL. Στην προσπάθεια εύρεσης διαφορετικού μηχανισμού αποφασίσαμε να μελετήσουμε το αν αυτές οι μεταλάξεις επηρεάζουν τη δομική και θερμοδυναμική ακεραιότητα της αποΕ3, καταγράφοντας τα θερμοδυναμικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων της αποΕ3 σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Υποθέσαμε επίσης, πως οι παρατηρούμενες δομικές αλλαγές μπορεί να συνδέονται μεταξύ τους με ένα κοινό μοτίβο που να σχετίζεται και να υποδεικνύει στοιχεία του μηχανισμού παθογένεσης της νόσου. Προς διερεύνηση των παραπάνω στόχων εκφράσαμε και καθαρίσαμε στη συνέχεια βιοφυσικά και λειτουργικά (με τη δοκιμασία αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC).

### 7.1.1 Έκφραση και καθαρισμός της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων Ε3 R145C, Ε3 K146E και Ε3 R136S σε σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων, HTB-13.

Οι αποΕ3 αγρίου τύπου, R145C, K146E και R136S εκφράστηκαν σε κύτταρα HTB-13 έπειτα από μόλυνση με αδενοϊούς που έφεραν το γονίδιο έκφρασης των αντίστοιχων απολιποπρωτεϊνών (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Τομέας Μοριακής Γενετικής). Το πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι ότι ο ιικός φορέας μπορεί να
χρησιμοποιηθεί και για επιμόλυνση διαγονιδιακών ποντικιών στα οποία έχει προηγουμένως εξαλειφθεί το γονίδιο της αποΕ, ώστε να μελετηθούν οι επιδράσεις των μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ και σε πειραματόζωα. Το μέσο με την εκφρασμένη αποΕ3 χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό πρωτεολιποσωμάτων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.10.5.2. Δημιουργήσαμε διαβάθμιση πυκνότητας στο διάλυμα πρωτεολιποσωμάτων και ακολούθως υπερφυγοκεντρήσαμε το διάλυμα και το διαχωρίσαμε σε κλάσματα (βλ. παρ. 6.10.5.3-6.10.5.4). Αναλύσαμε δείγμα από κάθε κλάσμα σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, όπως παρουσιάζεται ενδεικτικά στις πηκτές του σχήματος 4. Στην πηκτή 4Α, παρατηρείται πως τα πρωτεολιποσώματα (που περιέχουν αποΕ3) περιέχονται στα κλάσματα 7-11, ενώ τα επόμενα κλάσματα (πηκτή 4Β) περιλαμβάνουν εκτός από αποΕ και άλλες πρωτεΐνες του συλλεχθέντος μέσου.

Prestained Marker lug 5ug BSA BSA 175kDa	10ug 20ul 20 BSA Fr1 F	Dul 20ul 20ul r2 Fr3 Fr4	20ul 20ul 20 Fr5 Fr6 F	oul 20ul 20 r7 Fr8 Fi	ul 20ul 9 Fr10	20ul Fr11	Prestained Marker 1ug 5ug 9u 175kDa BSA BSA B	ug 20ul SA Fr12	20uf 20ul Fr13 Fr14	20ul 20ul Fr15 Fr16	20ul Fr17	20ul 20ul Fr18 Fr19
80kDa	a diversity						80kDa					
58kDa							58kDa					
46kDa				7			46kDa					
				-	. 64			-			0	
30kDa				10 A			30kDa					
25kDa						-	25kDa		22	<b>1</b> 10		
			0									
		C										
17kDa	1						B. <sup>17kDa</sup>					

Σχήμα 4. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος από τα κλάσματα 1-11 (πηκτή Α) και 12-19 (πηκτή Β) που διαχωρίστηκαν έπειτα από την υπερφυγοκέντρηση του διαλύματος διαβαθμισμένης πυκνότητας.

Στη συνέχεια, τα κλάσματα με την καθαρή λιπιδιωμένη αποΕ3 υπέστησαν απολιπιδίωση (βλ. παρ. 6.10.5.5). Στο σχήμα 5 αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες οι καθαρισμένες, απολιπιδιωμένες αποΕ3 αγρίου τύπου, R145C, K146E και R136S. Οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο από 98% καθαρές.



#### Σχήμα 5. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των αποΕ3, μεταλλαγμένων και μη [91].

Στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου (σχήμα 5) παρατηρείται πως σε κάθε δείγμα αποΕ3, μεταλλαγμένης ή μη, αντιστοιχούν δύο ζώνες. Η αποΕ όταν εκφράζεται σε σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων γλυκοζυλιώνεται [10]. Η μία ζώνη (που εμφανίζεται σε υψηλότερο μοριακό βάρος) αντιστοιχεί σε γλυκοζυλιωμένη μορφή της αποΕ3, όπως επιβεβαιώθηκε από μετατόπιση ή και εξάλειψή της έπειτα από ενζυμική αντίδραση απογλυκοζυλίωσης των δειγμάτων της αποΕ3 από νευραμινιδάση (βλ. παρ. 6.12). Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η ανάλυση των απογλυκοζυλιωμένων και μη αποΕ3 αγρίου τύπου, R145C, K146E και R136S σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.



Σχήμα 6. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των απογλυκοζυλιωμένων και μη αποΕ3 που εκφράστηκαν σε σύστημα ΗΤΒ-13 κυττάρων.

#### 7.1.2 Μελέτη της ελικότητας των E3R145, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την Ε3 αγρίου τύπου με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού.

Το γεγονός πως οι τρεις μεταλλάξεις προς μελέτη εντοπίζονται σε περιοχή α-έλικας της αποΕ3 (εικόνα 39) μας οδήγησε να μελετήσουμε αν επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της περιοχής. Για το λόγο αυτό λάβαμε το φάσμα κυκλικού διχρωισμού κάθε μετάλλαξης της αποΕ3 στην περιοχή του άπω υπεριώδους και το συγκρίναμε με το φάσμα της αποΕ3 αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 7. Το σχήμα του φάσματος στην περιοχή 190-260nm ήταν κοινό μεταξύ της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της, γεγονός που υποδηλώνει πως οι μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.



Σχήμα 7. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της, Ε3 R145C, Ε3 K146E και Ε3 R136S. Ένθετο: Ραβδόγραμμα της % ελικότητας κάθε μορφής της αποΕ3, μεταλλαγμένης και μη [91].

Οι τρεις μεταλλαγμένες μορφές της αποΕ3 υπολογίστηκε πως περιέχουν αντίστοιχα ποσοστά δευτεροταγούς δομής μεταξύ τους και με την αποΕ3 αγρίου τύπου, όπως γίνεται φανερό από τον πίνακα 10. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα περιεχόμενα ποσοστά α- έλικας στα 222nm, όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση (4) (παρ. 6.16.1), καθώς και τα ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής που περιέχουν οι αποΕ3 μορφές, έπειτα από την αποσυνέλιξη των φασμάτων τους με το πρόγραμμα CDSSTR του διακομιστή Dichroweb (βλ. παρ. 6.16.1). Στο ένθετο ραβδόγραμμα του σχήματος 7 αναπαρίσταται γραφικά η % ελικότητα στα 222nm των αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της.

Πίνακας 10. Εκατοστιαία ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της αποΕ3 και των μεταλλάξεών της (Ε3 R145C, Ε3 K146E και E3R136S) που προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες [91].

ΑποΕ3	% α-ελικότητα	CDSSTR					
Anolo	222nm	% α-έλικα	% β-φύλλο	% στροφή	% απουσία δομής	NRMSD	
wт	58,7± 3,2	62	15	10	13	0,004	
R145C	56,8± 1,2	59	16	11	14	0,005	
K146E	59,7± 2,2	61	16	10	12	0,004	
R136S	59,4± 4,9	60	16	11	14	0,004	

Η εισαγωγή των μεταλλάξεων οδηγεί στην εμφάνιση μικρών και μη στατιστικά σημαντικών αλλαγών στη δευτεροταγή δομή της αποΕ3, παρ' ότι τα πειραματικά δεδομένα προέκυψαν από τη μελέτη διαφορετικών προετοιμασιών (παρτίδων) πρωτεΐνης που μετρήθηκαν διαφορετικές μέρες. Συμπερασματικά, οι μεταλλάξεις R145C, K146E και R136S δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δευτεροταγή δομή της αποΕ3.

# 7.1.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των E3R145C, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου.

Στη συνέχεια μελετήσαμε αν οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΕ3 διαφοροποιούνται ως προς τη θερμοδυναμική τους σταθερότητα σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Παρακολουθήσαμε τη μοριακή ελλειπτικότητα κάθε μορφής της αποΕ3 (μεταλλαγμένης και μη) στα 222nm σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος από τους 20 μέχρι και τους 80°C (σχήμα 8).



### Σχήμα 8. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης κάθε μετάλλαξης (αποΕ3 R145C, K146E, R136S) σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου [91].

Όλες οι μεταλλάξεις, αντίστοιχα με την αποΕ3 αγρίου τύπου, υπέστηκαν μία σχετικά μη συνεργιστική μετάπτωση σε μία αποδιπλωμένη κατάσταση που περιελάμβανε σημαντικά μικρότερο ποσοστό α-έλικας από την αρχική αναδιπλωμένη κατάσταση της αποΕ3.

Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε σιγμοειδή εξίσωση Boltzmann που περιγράφει τη μετάπτωση μεταξύ δύο καταστάσεων. Παρ' όλο που η θερμική αποδιάταξη της αποΕ3 δεν είναι πλήρως αντιστρεπτή- καθώς η πρωτεΐνη συσσωματώνεται- η παραπάνω ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί

και στο παρελθόν ως μέθοδος αντιπαραβολής των παρατηρούμενων μεταβολών μεταξύ μεταλλάξεων της αποΕ3, κυρίως επειδή η θερμική αποδιάταξη της πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα ταχύτερα από τις μη αντιστρεπτές μεταβολές συσσωμάτωσής της [93]. Υπολογίσαμε τη θερμοκρασία μετάπτωσης της θερμικής αποδιάταξης, Tm, το φαινόμενο συντελεστή συνεργιστικότητας, n, και τη φαινόμενη μεταβολή ενθαλπίας της μετάπτωσης, ΔΗ, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα τουλάχιστον τριών επαναλήψεων της θερμικής αποδιάταξης της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της [91].

ΑποΕ3	Tm (°C)	n (συντελεστής συνεργιστικότητας)	φαινόμενη ΔΗ (kcal/mol)
wт	53,6± 0,2	7,7± 0,2	27,9± 0,1
R145C	53,4± 0,3	6,9± 0,4***	21,3± 1,4****
K146E	55,7± 0,1*	7,9± 0,2	27,3± 1,1
R136S	51,9±0,4**	7,6± 0,6	27,4± 0,8

\*p=0,002, \*\*p=0,004, \*\*\*\*p=0,015, \*\*\*\*p=0,007

Η αποΕ3 Κ146Ε αποδιατάχθηκε θερμικά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη κατά ~2°C συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου, ενώ η Ε3 R136S είχε θερμοκρασία μετάπτωσης μικρότερη κατά ~2°C από την αποΕ3 αγρίου τύπου. Αν και οι παρατηρούμενες αλλαγές είναι σχετικά μικρές, ωστόσο είναι στατιστικά σημαντικές (p=0,002 και p=0,004, αντίστοιχα) και υποδηλώνουν μία μικρή διαφοροποίηση στην κατανομή των διαμορφώσεων μεταξύ των μεταλλάξεων. Η αποΕ3 R145C παρουσίασε τις μεγαλύτερες αποκλίσεις σε σχέση με το προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ3 αγρίου τύπου. Αν και η θερμοκρασία μετάπτωσης της Ε3 R145C ήταν η ίδια με αυτή της μη μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, η μετάπτωση ήταν λιγότερο απότομη, όπως προκύπτει από τη μεταβολή στο συντελεστή συνεργιστικότητας (σχήμα 8 και πίνακας 11). Η μειωμένη συνεργιστικότητα κατά την αποδιάταξη της αποΕ3 R145C σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου αντικατοπρίζεται επίσης στη μείωση κατά ~7kcal/mol της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας της συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου και τις άλλες δύο μεταλλάξεις. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ της Ε3 R145C υποδηλώνουν πως αυτή η σημειακή μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη θερμική σταθερότητα της αποΕ3.

Γνωρίζοντας πως η αποΕ3 αγρίου τύπου αποδιατάσσεται μερικώς αντιστρεπτά λόγω της βραδείας συσσωμάτωσής της [93], θελήσαμε να μελετήσουμε αν οι τρεις μεταλλάξεις παρουσιάζουν αντίστοιχη συμπεριφορά. Προκειμένου να μελετηθεί η αντιστρεπτότητα της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου, έλαβε χώρα παρακολούθηση της % ελικότητας στα 222nm των δειγμάτων αποΕ κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 20 στους 80°C (κόκκινη πορεία), ακολουθούμενη από «επανα-διάταξη» από τους 80 στους 20°C (μπλε πορεία), και τέλος από δεύτερη θερμική αποδιάταξη από τους 80°C (πράσινη πορεία) (σχήμα 9).





Η αποΕ3 αγρίου τύπου αποδιατάκτηκε μη αντιστρεπτά, καθώς ανάκτησε μόλις το 60% της ελικότητάς της όταν επανήλθε σε θερμοκρασία 20°C μετά από την πρώτη αποδιάταξή της. Ωστόσο κατά τη δεύτερη αποδιάταξη της αποΕ3 αγρίου τύπου, το ποσοστό της αποδιατεταγμένης κατάστασης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία παρουσίασε αντίστοιχη σιγμοειδή μορφή και θερμοκρασία μετάπτωσης με την πρώτη θερμική αποδιάταξη, γεγονός που υποδηλώνει πως μέρος των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης μπορούσε να υποστεί αντιστρεπτή μεταβολή. Η Ε3 R145C παρουσίασε αντίστοιχη συμπεριφορά με την αποΕ3 αγρίου τύπου, με μικρές διαφορές ως προς το ποσοστό ανάκτησης της % ελικότητάς της έπειτα από επανα-διάταξη σε θερμοκρασία 20°C. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις Ε3 K146E και Ε3 R136S υπέστηκαν κατά κύριο λόγο μία αντιστρεπτή μετάπτωση, ανακτώντας περίπου 95-99% της αρχικής ελικότητάς τους κατά την επανα-διάταξή τους στους 20°C. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως οι παραπάνω μεταλλάξεις μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική κινητική μεταξύ επαγαδιάταξης και θερμικά επαγώμενης συσσωμάτωσης, αλλαγών που δηλώνουν πως έχει επηρεαστεί η δομική πλαστικότητα της αποΕ λόγω της εισαγωγής των μεταλλάξεων K146E και R136S στο μόριό της.

# 7.1.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των E3R145C, E3K146E και E3R136S σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου.

Μελετήσαμε το προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων E3 R145C, E3 K146E και E3 R136S συγκριτικά με αυτό της αποE3 αγρίου τύπου προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω διαφορές στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου λόγω της εισαγωγής των μεταλλάξεων. Στο σχήμα 10 παρουσιάζεται το ποσοστό της αποE3 που βρίσκεται σε διατεταγμένη κατάσταση σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης.



Σχήμα 10. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων Ε3 R145C, Ε3 K146E και Ε3 R136S σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου [91].

Οι τρεις μεταλλάξεις, όπως και η αποΕ3 αγρίου τύπου, παρουσιάζουν καμπύλες αποδιάταξης που περιλαμβάνουν ένα χαρακτηριστικό αβαθές «plateau» κοντά στη συγκέντρωση αποδιατάκτη που αντιστοιχεί στο 50% αποδιάταξης της αποΕ3. Το «plateau» αντιστοιχεί στην ενδιάμεση κατάσταση από την οποία περιέρχεται η αποΕ όταν αποδιατάσσεται χημικά [96].

Έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης τριών καταστάσεων, υπολογίσαμε τη φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για κάθε μετάπτωση και τις παραμέτρους m<sub>ni</sub>, m<sub>iu</sub>, x<sub>ni</sub>, x<sub>iu</sub> (βλ. παρ. 6.17.1), όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 12.

ΑποΕ3	φαιν. ΔG1 (kcal/ mol)	φαιν. ΔG2 (kcal/ mol)	φαιν. ΔGtot (kcal/ mol)	mni (kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	miu (kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	xni (M)	xiu (M)
wт	1,0±0,2	3,4±0,1	4,4±0,2	2,6±0,2	1,6±0,1	0,39±0,02	2,09±0,03
R145C	0,9±0,2	3,6±0,2	4,6±0,2	2,5±0,2	1,6±0,2	0,36±0,08	2,33±0,04 <sup>*4</sup>
K146E	1,0± 0,2	4,9±0,3 <sup>*1</sup>	6,0±0,3 <sup>*2</sup>	2,7±0,2	2,1±0,3 <sup>*3</sup>	0,39±0,03	2,32±0,03 <sup>*5</sup>
R136S	1,2±0,2	3,7±0,1	4,8±0,2	2,7±0,2	1,7±0,1	0,44±0,03	2,09±0,03

Πίνακας 12. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειράματα χημικής αποδιάταξης [91].

\*<sup>1</sup>p=0,07, \*<sup>2</sup>p=0,08, \*<sup>3</sup>p=0,08, \*<sup>4</sup>p=0,024, \*<sup>5</sup>p=0,06

Οι E3 R145C και E3 R136S παρουσίασαν μεταβολή ενθαλπίας 4,6± 0,2 kcal/mol και 4,8± 0,2 kcal/mol, αντίστοιχα, τιμές που δεν διαφέρουν στατιστικά από τη μεταβολή ενθαλπίας της αποE3 αγρίου τύπου (4,4± 0,2 kcal/mol). Ωστόσο, η E3 K146E εμφάνισε μεταβολή ενθαλπίας 6.0±0.3 kcal/mol, μία τιμή που υπερβαίνει την αντίστοιχη της αποE3 αγρίου τύπου κατά 1,6kcal/mol (p=0,08) και υποδηλώνει σταθεροποίηση της μετάλλαξης E3 K146E έναντι της αποE3 αγρίου τύπου. Η σταθεροποίηση της μεταλλαγμένης αποE αποτελεί συνέπεια σταθεροποίησης της δεύτερης μετάπτωσης, όπως διαφαίνεται από την αυξημένη φαινόμενη ΔG2 (σχήμα 10). Η δεύτερη μετάπτωση αντιστοιχεί στην αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ, όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη K146E [47, 92, 102].

# 7.1.5 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των E3R145C, E3K1463, E3R136S και της αποE3 αγρίου τύπου στο διαλύτη.

Στη συνέχεια μετρήσαμε το φθορισμό του ιχνηθέτη ANS παρουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της με στόχο να διερευνήσουμε αν οι προς μελέτη μεταλλάξεις επηρεάζουν την έκθεση υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στο διαλύτη.



#### Σχήμα 11. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία αποΕ3 αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της [91].

Η πρόσδεση του ANS στην αποΕ3 οδήγησε σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού καθώς και σε μετατόπιση του μεγίστου του εκπεμπόμενου φθορισμού σε μικρότερα μήκη

κύματος (blue shift) (σχήμα 11). Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδηλώνουν πρόσδεση του ANS σε υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης.

Οι μεταλλάξεις E3 R136S και E3 K146E δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή στον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 13. Ωστόσο η E3 R145C παρουσίασε αύξηση του φθορισμού του ANS σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου, μία παρατήρηση που συμφωνεί με τη φύση του μεταλλαγμένου αμινοξέος, καθώς η αργινίνη, που είναι υδρόφιλη, υποκαθίσταται από ένα πιο υδρόφοβο αμινοξύ, την κυστεΐνη. Είναι αξιοσημείωτο πως ακόμη και μία σημειακή μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει στην έκθεση υδρόφοβης περιοχής της αποE3 στο διαλύτη.

Πίνακας 13. Αύξηση σήματος φθορισμού του ANS παρουσία μεταλλαγμένης ή μη αποΕ3 ως προς το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης [91].

ΑποΕ	Σήμα φθορισμού ANS παρουσία αποΕ/σήμα φθορισμού απουσία αποΕ
WT	3,6± 0,5
R145C	4,2± 0,4 <sup>*6</sup>
K146E	3,9± 0,4
R136S	3,9± 0,5

\*<sup>6</sup>p=0,03

### 7.1.6 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις E3R145C, E3K146E, E3R136S και την αποE3 αγρίου τύπου.

Η αποΕ αλληλεπιδρά με τα λιπίδια με έναν πολύπλοκο μηχανισμό και υφίσταται σημαντικές αλλαγές διαμόρφωσης (βλ. παρ. 3.5-3.5.1). Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων αποΕ3 R145C, E3 K146E και E3 R136S στην κινητική αναμόρφωσης DMPC κυστιδίων σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Στο σχήμα 12 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της κινητικής μελέτης που πραγματοποιήσαμε.



Σχήμα 12. Γραφική παράσταση της κινητικής διαύγασης αιωρήματος DMPC κυστιδίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με την αποΕ3 αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της [91].

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται οι κινητικές παράμετροι που προέκυψαν έπειτα από προσαρμορή των πειραματικών δεδομένων που συλλέξαμε σε μοντέλο εκθετικής μείωσης δύο φάσεων.

Πίνακας 14. Κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν από το πείραμα διαύγασης αιωρήματος DMPC από την αποΕ3 αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένες μορφές της [91].

ΑποΕ	t <sub>1/2 fast</sub> (sec)	t <sub>1/2 slow</sub> (sec)	% plateau
νт	176± 92	1039± 143	17± 13
R145C	133± 41	1416± 69*	24± 3
K146E	145± 62	1247± 303	14± 2
R136S	165± 85	1378± 178**	15± 4

\*p=0,012, \*\*p=0,004

Οι τρεις μεταλλαγμένες μορφές της αποΕ3 διαύγασαν το αιώρημα DMPC κυστιδίων με σχετικά αργή κινητική, αντίστοιχα με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην ημιζωή της βραδείας φάσης των μεταλλάξεων Ε3 R145C και R136S μπορεί να σχετίζονται με διαφορετική κινητική κατά τη μερική αποδιάταξη του δεματιού τεσσάρων ελίκων της αποΕ καθώς αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια.

### 7.1.7 Μελέτη της υδροδυναμικής διαμέτρου των αποΕ3 R145C, K146E και R136S συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).

Η αποΕ3 συσσωματώνεται σε διάλυμα σχηματίζοντας μία ποικιλία ολιγομερών, από διμερή μέχρι και οκταμερή, με πιο επικρατή τη μορφή των τετραμερών. Ο ολιγομερισμός της αποΕ είναι συνέπεια αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των καρβοξυ-τελικών περιοχών των μορίων της αποΕ [53, 93, 177, 178]. Προσδιορίσαμε την υδροδυναμική διάμετρο κάθε μετάλλαξης στο διάλυμα σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου στη συγκέντρωση 0,1mg/mL αποΕ3. Η διασπορά μεγέθους των μορίων της αποΕ παρουσιάζεται στο σχήμα 13.



Σχήμα 13. Κατανομή πληθυσμών της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της συναρτήσει της υδροδυναμικής διαμέτρου των μορίων πρωτεΐνης [91].

Παρατηρήθηκε πως ποσοστό μεγαλύτερο από το 99% της μάζας των αποΕ3 που σκεδάζει την ακτινοβολία προέρχεται από μόρια διαμέτρου 10-20nm, ενώ λιγότερο από 1% της μάζας τους αντιστοιχεί σε συσσωματώματα υψηλότερης τάξης ολιγομερισμού. Τόσο η αποΕ3 αγρίου τύπου, καθώς και η αποΕ3 K146E παρουσίασαν αντίστοιχη διασπορά πληθυσμών με κυρίαρχη διάμετρο μορίων 10,4±1,7nm και 10,1±1,7nm αντίστοιχα (πίνακας 15). Η αποΕ3 R145C παρουσίασε αντίστοιχη υδροδυναμική διάμετρο αλλά με σχετικά μεγαλύτερη διασπορά, υποδηλώνοντας τάση προς συσσωμάτωση. Ενδιαφέρον αποτελεί πως η μετάλλαξη R136S παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερη υδροδυναμική διάμετρο στο διάλυμα (16,9±2,1nm) υποδεικνύοντας πως βρίσκεται σε υψηλότερη κατάσταση ολιγομερισμού συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Πίνακας 15. Παράμετροι υπολογισμένες από τα πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τις μεταλλάξεις αποΕ3 R145C, K146E, R136S και την αποΕ3 αγρίου τύπου [91].

ΑποΕ	Διάμετρος (Ι)* (Κορυφή 1)	Διάμετρος (Ι)* (Κορυφή 2)	Διάμετρος (V)**
wт	10,9± 1,4	68± 7	10,4± 1,7
R145C	13,7± 3,6	137± 67	11,3± 3,1
K146E	10,6± 1,4	58± 6	10,1± 1,7
R136S	17,1± 1,2	μη ανιχνεύσιμο	16,9± 2,1

(Ι)\*: διάμετρος υπολογισμένη βάσει της διασποράς της έντασης σκέδασης

(V)\*\*: διάμετρος υπολογισμένη έπειτα από κανονικοποίηση της διασποράς σκέδασης βάσει του όγκου των μορίων

# 7.2 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας μεταλλαγμέων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΛΠΣ σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Οι φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις R145P (Sendai), R147P (Chicago) και R158P (Osaka ή Kurashiki) στο μόριο της αποE3 έχουν συσχετιστεί με τη νόσο λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (ΛΠΣ) [173]. Οι ασθενείς που φέρουν τις μεταλλαγμένες αποE3 εμφανίζουν λιποπρωτεϊνικούς θρόμβους στο σπείραμα των νεφρών τους και αυξημένη συγκέντρωση αποE3 στο πλάσμα. Η μεταμόσχευση νεφρών δεν αποτελεί θεραπευτική λύση έναντι της ΛΠΣ, καθώς η νόσος επανεμφανίζεται, γεγονός που υποδηλώνει πως οι αλλοιώσεις που εντοπίζονται στα νεφρά των ασθενών δεν σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου αλλά μάλλον αποτελούν συνέπεια αυτής. Επιπρόσθετα, η γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών της αποΕ R145P σε ποντίκια που δεν εκφράζουν ενδογενώς την αποΕ οδήγησε στην εναπόθεση λιποπρωτεϊνών που περιλαμβάνουν αποΕ στο σπείραμα των ποντικών. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως η μετάλλαξη αποΕ R145P αποτελεί αιτία εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, αν και η ΛΠΣ συνδέεται άμεσα με τις μεταλλάξεις στο μόριο της αποΕ δεν έχει διασαφηνιστεί ο μηχανισμός που οδηγεί στο σχηματισμό λιποπρωτεϊνικών εναποθέσεων στο σπείραμα των κασθενών [173]. Στην παρούσα μελέτη έγινε η υπόθεση πως τα κλινικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη νόσο

απολιποπρωτεϊνών (τόσο σε λιπιδιωμένη, όσο και μη λιπιδιωμένη μορφή), η οποία με τη σειρά της μπορεί να είναι απόρροια αλλαγών στη δομή και τη θερμοδυναμική σταθερότητα των μεταλλαγμένων αποΕ3 σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Οι τρεις μεταλλάξεις της αποΕ3- R145P, R147P και R158P- εντοπίζονται στην έλικα 4 του δεματιού τεσσάρων ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 40. Και στις τρεις μεταλλάξεις, ένα κατάλοιπο αργινίνης αντικαθίσταται από προλίνη, ένα αμινοξύ που χαρακτηρίζεται από δομική ακαμψία και θεωρείται γενικά ασύμβατο με τη δομή α έλικας των πρωτεϊνών.



Εικόνα 40. Οι θέσεις που εντοπίζονται τα τρία μεταλλαγμένα κατάλοιπα αργινίνης στην έλικα 4 της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ, όπως χαρτογραφούνται στην κρυσταλλική δομή της αποΕ με κωδικό pdb: 1LPE [173].

Οι R145P και R147P βρίσκονται εντός της περιοχής πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα, ενώ η μετάλλαξη R158P βρίσκεται στη θέση πολυμορφισμού της αποΕ που διαφοροποιεί την αποΕ2 (Cys158) από τις αποΕ3 και αποΕ4 ισομορφές (Arg158).

# 7.2.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων E3R145P, R147P και R158P σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων.

Στο εργαστήριό μας παρασκευάσαμε τις ανασυνδυασμένες απολιποπρωτείνες E3R145P, E3R147P, E3R158P καθώς και την αποE3 αγρίου τύπου σε σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα. Χρησιμοποιήσαμε το πλασμίδιο pET32a-<u>E4wt</u>-3C ως φορέα και εισάγαμε σε επίπεδο DNA τη μετάλλαξη που κωδικοποιεί την E4R112C (E3wt) προς παραγωγή του πλασμιδίου pET32a-<u>E3wt</u>-3C [173]. Η εισαγωγή της μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του τυποποιημένου συστήματος Quikchange II XL Mutagenesis (Stratagene). Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται η ανάλυση του πλασμιδίου pET32a-<u>E3wt</u>-3C (λωρίδα «E3wt»), έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την εισαγωγή των μεταλλάξεων που κωδικοποιούν την έκφραση των E3R145P, E3R147P και E3R158P, με τη χρήση του ίδιου συστήματος μεταλλαξιγένεσης (βλ. παράγραφο 6.2.3). Τα πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση κάθε μετάλλαξης αναλύθηκαν επίσης στην πηκτή του σχήματος 14.



#### Σχήμα 14. Ανάλυση του πλασμιδιακού DNA «pET32a-E3wt-3C» και των «pET32a-E3R145P-3C», «pET32a-E3R147P-3C» και «pET32a-E3R158P-3C» σε πηκτή αγαρόζης 0,1%w/v.

Πιο συγκεκριμένα, στην πηκτή αγαρόζης αναλύθηκε το DNA που περιέχεται στο διάλυμα της κάθε αντίδρασης μεταλλαξιγένεσης, πριν και μετά τη διεξαγωγή της. Στο διάλυμα των προϊόντων των αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης, δεν είχε ακόμη προστεθεί το ένζυμο Dpn I, που πέπτει το μητρικό DNA. Το μεταλλαγμένο πλασμιδιακό DNA, καθώς και το υπόστρωμα, περιλαμβάνουν ~6800 ζεύγη βάσεων. Η διαφορά στο ύψος των ζωνών του pET32a-<u>E3wt</u>-3C και των προϊόντων των αντιδράσεων οφείλεται στο γεγονός πως το αρχικό πλασμίδιο είναι υπερελικωμένο κυκλικό DNA και παρουσιάζει μεγαλύτερη ηλεκτροφοριτική κινητικότητα (λόγω μικρότερης υδροδυναμικής διαμέτρου), ενώ στο διάλυμα των προϊόντων περιλαμβάνεται «ανοιχτό» κυκλικό DNA (nicked)- που είναι το επιθυμητό μεταλλαγμένο προϊόν- καθώς και μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA, που απομακρύνονται στη συνέχεια, έπειτα από πέψη με το ένζυμο Dpn I.

Η επιτυχία εισαγωγής των παραπάνω μεταλλάξεων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση των μεταλλαγμένων πλασμιδίων με τεχνικές αυτοματοποιημένης φθορισμογενούς αλληλούχισης (Macrogen). Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 Gold DE3 με το κατάλληλο πλασμιδιακό DNA προς έκφραση των αποE3 αγρίου τύπου, E3R145P, E3R147P και E3R158P, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.9.1.

Οι τροποποιημένοι φορείς pET32a-apoE-3C, οδηγούν σε έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την αποΕ καθώς και περιοχή αναγνώρισης και πέψης από την 3C-πρωτεάση, μία ετικέτα έξι ιστιδινών και την αμινοξική αλληλουχία της θειορεδοξίνης 1 (Trx), όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 15.



Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση της αμινοξικής αλληλουχίας των αποΕ πριν και μετά τα τρία στάδια καθαρισμού τους.

Μετά την έκφραση των αποΕ ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός τους (βλ. παράγραφο 6.9.2). Το πρώτο στάδιο καθαρισμού των αποΕ περιελάμβανε τη χρήση στήλης συγγενείας Ni-NTA (1ο στάδιο, σχήμα 15).

Κατά το δεύτερο στάδιο καθαρισμού, οι Trx-αποΕ (52 kDa) υπέστησαν πέψη με 3C-πρωτεάση (σχήμα 15). Η 3C-πρωτεάση υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης της περιοχής LGVLFQGP, προς αποκοπή της αμινοξικής αλληλουχίας που προηγείται της αποΕ. Η απομάκρυνση της συντηγμένης με την αποΕ αμινοξικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με διαχωρισμό των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης μέσω στήλης συγγενείας Ni-NTA (3ο στάδιο, σχήμα 15). Κατά τη διέλευση του διαλύματος που περιελάμβανε τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης από τη στήλη συγγενείας, η ανασυνδυσμένη 3C-πρωτεάση και η αλληλουχία που αποκόπηκε από την αποΕ παρέμειναν προσδεδεμένες στο πληρωτικό υλικό Ni-NTA, καθώς περιελάμβαναν στην αλληλουχία τους ετικέτα 6 ιστιδινών. Αντίθετα, η αποΕ (34kDa) (απουσία συντηγμένης αλληλουχίας) διήλθε από τη στήλη και συνελέγη καθαρή.

Στο σχήμα 16, παρουσιάζεται η ανάλυση δειγμάτων της αποΕ3 αγρίου τύπου έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες, σε διαφορετικά στάδια κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό της. Η αποΕ3 αγρίου τύπου και οι μεταλλάξεις της μετά τον καθαρισμό, υπέστησαν εκτεταμένη διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος όξινου ανθρακικού αμμωνίου 5mM και ακολούθως λυοφιλιώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.



Σχήμα 16. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου από διαφορετικά στάδια απομόνωσης και καθαρισμού της.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (σχήμα 17), οι αποΕ που απομονώθηκαν προς χρήση σε βιοφυσικά πειράματα ήταν περισσότερο από 98% καθαρές.



Σχήμα 17. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου και των σημειακών μεταλλάξεων E3R145P, E3R147P και E3R158P μετά τον καθαρισμό τους [173].

7.2.2 Μελέτη της ελικότητας των E3R145P, E3R147P και E3R158P σε αντιπαραβολή με την E3 αγρίου τύπου με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού.

Καθώς οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην έλικα 4 της αμινο-τελικής περιοχής και σε κάθε περίπτωση ένα κατάλοιπο αργινίνης αντικαθίσταται από το άκαμπτο αμινοξύ, προλίνη, υποθέσαμε πως οι παραπάνω μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάζουν τη τοπική δευτεροταγή δομή της αποΕ3. Για να μελετηθεί τυχόν αλλοίωση της δευτεροταγούς δομής της αποΕ3 λόγω της εισαγωγής των μεταλλάξεων, λήφθηκαν τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της, στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190-260nm) (παρ. 6.16.1). Στο σχήμα 18 παρουσιάζονται τα φάσματα των παραπάνω πρωτεϊνών, καθένα από τα οποία αποτελεί μέσο όρο των φασμάτων που λήφθηκαν από την επανάληψη του πειράματος τρεις φορές. Τα φάσματα και των τριών μεταλλάξεων της αποΕ3 αγρίου τύπου, με τη διαφορά πως το φάσμα της Ε3R158P διαφοροποιείται κάπως ως προς το κοινό μοτίβο που ακολουθούν οι υπόλοιπες αποΕ, μεταλλαγμένες και μη.



Σχήμα 18. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού μεταλλάξεων της αποΕ που σχετίζονται με ΛΠΣ και της αποΕ3 αγρίου τύπου [173].

Υπολογίστηκε το εκατοστιαίο ποσοστό α-έλικας των αποΕ στα 222nm με τη χρήση της εξίσωσης (4) (παράγραφος 3.2). Στον πίνακα 16 παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της % ελικότητας των αποΕ3, μεταλλαγμένων και μη, από τα δεδομένα των τριών επαναλήψεων του πειράματος. Επίσης, παρουσιάζεται στατιστική ανάλυση της διαφοροποίησης της ελικότητας κάθε μετάλλαξης σε σχέση με την ελικότητα της αποΕ3 αγρίου τύπου με τη δοκιμασία student (paired student t-test).

Πίνακας 16. Πειραματικά αποτελέσματα του εκατοστιαίου ποσοστού α-έλικας στα 222nm που παρουσιάζουν η αποΕ3 αγρίου τύπου και οι μεταλλάξεις της (E3R145P, E3R147P και E3R158P).

% α-έλικα στα 222nm	E3WT	R145P	R147P	R158P
Μέσος όρος	63,0	54,1	60,4	57,4
Τυπική απόκλιση	0,3	1,0	1,6	1,3
Δοκιμασία student		8,30E-11	0,002	1,65E-07

Από τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού γίνεται φανερό πως η ελικότητα των τριών μεταλλάξεων είναι μειωμένη έναντι της ελικότητας της αποΕ3 αγρίου τύπου, σε διαφορετικό βαθμό για κάθε

μετάλλαξη. Τη μεγαλύτερη μείωση στο εκατοστιαίο ποσοστό α-έλικας παρουσιάζει η E3R145P, η οποία παρουσιάζει ~13% μικρότερη ελικότητα συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου. Μία τέτοια μείωση στο περιεχόμενο α-έλικας της E3R145P δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο σε τοπική διαταραχή της δομής α-έλικας της αποE3 λόγω της παρουσίας της προλίνης, αλλά υποδηλώνει εκτεταμένες διαταραχές στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης [173]. Το ραβδόγραμμα στο σχήμα 19 απεικονίζει γραφικά τα αποτελέσματα του πίνακα 16.



Σχήμα 19. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την απώλεια ελικότητας που προκαλεί στην αποΕ3 αγρίου τύπου η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P KAI R158P.

#### 7.2.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων της αποΕ3 που σχετίζονται με ΛΠΣ σε αντιπαραβολή με την αποΕ αγρίου τύπου.

Η θερμοδυναμική αστάθεια και η περιορισμένη συνεργιστικότητα που χαρακτηρίζουν τη δομή της αποΕ κατά την αποδιάταξή της, την καθιστούν ικανή να υφίσταται εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωσή της κατά τη φυσιολογική της λειτουργία. Η διαταραγμένη δευτεροταγής δομή των μεταλλαγμένων αποΕ3 έναντι της αποΕ3 αγρίου τύπου, μας ώθησε να μελετήσουμε την επίδραση των μεταλλάξεων στη θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΕ3. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε τη θερμική αποδιάταξη των μεταλλαγμένων αποΕ3 σε σχέση με την αποδιάταξη της αποΕ3 αγρίου τύπου, καταγράφοντας το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 222nm καθώς η θερμοκρασία των δειγμάτων αυξανόταν από τους 20 μέχρι και τους 80°C, με ρυθμό μεταβολής 1°C/min. Στο σχήμα 20 παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης καθεμίας μετάλλαξης σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Σε κάθε γράφημα παρουσιάζεται το δεκαδικό κλάσμα αποδιάταξης της αποΕ (άξονας y) συναρτήσει της θερμοκρασίας σε °C (άξονας x).



Σχήμα 20. Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων αποΕ3 έναντι της αποΕ3 αγρίου τύπου. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν, ενώ οι καμπύλες προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε απλή μετάπτωση Boltzman μεταξύ δύο καταστάσεων. Οι γκρι γραμμές παρουσιάζουν το κλάσμα της αποΕ που βρίσκεται σε αποδιατεταγμένη κατάσταση στους 37°C [173].

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι μεταλλαγμένες αποΕ3 αποδιατάχθηκαν σε σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία και παρουσίασαν πολύ μικρή συνεργιστικότητα κατά την αποδιάταξή τους σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας πως έχουν θερμοδυναμικά αποσταθεροποιηθεί. Όπως υποδηλώνουν οι γκρι γραμμές σε καθένα από τα γραφήματα του σχήματος 20, οι μεταλλαγμένες αποΕ3 είναι σε σημαντικό ποσοστό αποδιατεταγμένες ακόμα και στη φυσιολογική θερμοκρασία του οργανισμού, 37°C [173].

Αν και η μετάπτωση που υφίσταται η αποΕ κατά τη θερμική της αποδιάταξη δεν αποτελεί ιδανικό μοντέλο αντιστρεπτής μετάπτωσης μεταξύ δύο καταστάσεων, μπορεί ωστόσο να υπολογιστεί η φαινόμενη μεταβολή στην ενθαλπία ΔΗ, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.16.2. Η φαινόμενη μεταβολή ενθαλπίας (ΔΗ) κατά τη θερμική αποδιάταξη που παρουσίασαν οι τρεις μεταλλάξεις ήταν κατά 8-15 kcal/mol μικρότερη σε σχέση με τη μεταβολή ενθαλπίας της αποΕ3 αγρίου τύπου. Η παρατηρούμενη μείωση στη μεταβολή ενθαλπίας (σχήμα 21) δηλώνει σημαντική θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση των μεταλλάξεων συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.



Σχήμα 21. Φαινόμενη μεταβολή της ενθαλπίας που παρουσίασε η αποΕ3 αγρίου τύπου και οι μεταλλάξεις της κατά την θερμική τους αποδιάταξη. (<sup>\*</sup>p=0.0006, <sup>\*\*</sup>p=0.0003, <sup>\*\*\*</sup>p=0.0058)

# 7.2.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των E3R145P, E3R147P και E3R158P σε αντιπαραβολή με την αποE3 αγρίου τύπου.

Η θερμοδυναμική σταθερότητα των μεταλλαγμένων αποΕ3 έναντι της αποΕ3 αγρίου τύπου διερευνήθηκε περαιτέρω με τη μελέτη της πορείας αποδιάταξης που ακολουθεί κάθε πρωτεΐνη κατά την τιτλοδότηση του διαλύματός της με διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8,0Μ. Στο σχήμα 22 παρουσιάζονται οι καμπύλες χημικής αποδιάταξης κάθε μετάλλαξης συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.





Στον άξονα y των γραφημάτων παρουσιάζεται το κλάσμα της αποΕ που βρίσκεται σε διατεταγμένη κατάσταση, ενώ στον άξονα των x, καταγράφεται η συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης, σε M. Σε κάθε γράφημα χημικής αποδιάταξης, τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν, ενώ οι καμπύλες προέκυψαν από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης τριών καταστάσεων.

Υπολογίστηκε η φαινόμενη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.17.1. Η μετάλλαξη E3R145P παρουσίασε παρόμοιο προφίλ αποδιάταξης με την αποE3 αγρίου τύπου, καθώς περιελάμβανε σαφώς καθορισμένη ενδιάμεση κατάσταση

όπως και η μη μεταλλαγμένη αποΕ3, σε αντίθεση με τις E3R147P καιE3R158P. Ωστόσο, η δεύτερη μετάπτωση κατά τη χημική αποδιάταξη της E3R145P ήταν λιγότερο συνεργιστική σε σχέση με αυτή της αποΕ3 αγρίου τύπου και παρουσίαζε ΔG ίσο με 5,63kcal/mol έναντι 9,38kcal/mol που παρουσίαζε η αποΕ3 αγρίου τύπου κατά τη δεύτερη μετάπτωση της αποδιάταξής της. Η μετάπτωση της E3R147P ήταν ακόμη λιγότερο συνεργιστική και ο σχηματισμός ενδιαμέσου ήταν πολύ ασθενής. Τέλος, η μετάπτωση της E3R158P ήταν μη συνεργιστική και δεν εμφάνιζε ενδιάμεσο αποδιάταξης. Η δεύτερη μετάπτωση κατά τη χημική αποδιάταξη της αποΕ έχει προταθεί πως αντιστοιχεί στην αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής της. Πιθανώς λοιπόν, η αποσταθεροποίηση ή η πλήρης απουσία της δεύτερης μετάπτωσης υποδηλώνει πως οι αμινο-τελικές περιοχές των μεταλλαγμένων αποΕ, όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις R145P, R147P και R158P, είναι τουλάχιστον μερικώς αποδιατεταγμένες [173].

# 7.2.5 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των E3R145P, E3R147P, E3R158P και της αποE3 αγρίου τύπου στο διαλύτη.

Η αποΕ περιλαμβάνει αμφιπαθητικές έλικες που συμμετέχουν στην πρόσδεση λιπιδίων και είναι προστατευμένες από την έκθεση στο πολικό περιβάλλον του διαλύτη, όταν η αποΕ βρίσκεται στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της. Ωστόσο, πολλές υδρόφοβες περιοχές της αποΕ παραμένουν εκτεθειμένες στο διαλύτη και συμμετέχουν στη διεξαγωγή των πρώτων αλληλεπιδράσεων της αποΕ με τα λιπίδια. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε αν η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριο της αποΕ3 επηρεάζει το ποσοστό των υδρόφοβων περιοχών που είναι φυσιολογικά εκτεθημένες στο διαλύτη, με τη χρήση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS. Λήφθηκαν τα φάσματα φθορισμού του ANS παρουσία ή απουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της (σχήμα 23).



Σχήμα 23. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεων E3R145P, E3R147P και E3R158P [173].

Η πρόσδεση του ANS σε καθεμία από τις μεταλλάξεις της αποΕ3 οδήγησε σε σημαντική αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε σχέση με την πρόσδεση του ANS στην αποΕ3 αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στα σχήματα 23 και 24Α. Παράλληλα παρατηρήθηκε μετατόπιση του μήκους κύματος που αντιστοιχεί στο μέγιστο του εκπεμπόμενου φθορισμού σε μικρότερα μήκη κύματος (σχήματα 23 και 24Β).



Σχήμα 24. Α. Λόγος του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS παρουσία της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS απουσία πρωτεΐνης (<sup>\*</sup>p<0.003, <sup>\*\*</sup>p<10<sup>-6</sup>, <sup>\*\*\*</sup>p<10<sup>-6</sup>). Β. Μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού του ANS προσδεδεμένου στις μεταλλαγμένες αποΕ3 και την αποΕ3 αγρίου τύπου σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift).

Η αύξηση του φθορισμού που παρουσιάζει η αποΕ3 μετά την εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P, υποδεικνύει πως οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μεγαλύτερη επιφάνεια υδρόφοβων περιοχών εκτεθημένη στο διαλύτη σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Πιο συγκεκριμένα, η σημαντική αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού που παρατηρήθηκε κατά την πρόσδεση του ANS στις μεταλλάξεις R147P και R158P, συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου, υποδηλώνει την εκτεταμένη έκθεση αμινοξέων του υδρόφοβου πυρήνα της αποΕ στο πολικό περιβάλλον του διαλύτη. Η παρατήρηση αυτή συνηγορεί με το συμπέρασμα που προέκυψε από τη μελέτη της χημικής αποδιάταξης των R147P και R158P, πως η αμινο-τελική περιοχή των δύο αυτών μεταλλάξεων είναι μερικώς αποδιατεταγμένη υπό φυσιολογικές συνθήκες [173].

# 7.2.6 Μελέτη της κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των E3R145P, E3R147P, E3R158P και της αποE3 αγρίου τύπου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).

Η αποΕ είναι επιρρεπής σε συσσωμάτωση και ολιγομερισμό σε συγκεντρώσεις της τάξης των μΜ, ενώ διαχωρίζεται σε διμερή και μονομερή σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε αν η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριο της αποΕ επηρεάζει την κινητική συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήσαμε δυναμική σκέδαση φωτός για την καταγραφή της υδροδυναμικής διαμέτρου των

ανασυνδυασμένων αποΕ3, μεταλλαγμένων και μη, αμέσως μετά από την επαναδιάταξή τους ή έπειτα από επώαση στους 37°C για 4 ή 24h, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 25.



Σχήμα 25. Κανονικοποιημένη κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της κατ' όγκο δείγματος, έπειτα από επώαση 4 ή 24h στους 37°C, ή απουσία επώασης [173].

Απουσία επώασης στους 37°C, η αποΕ3 αγρίου τύπου, η E3R145P και η E3R147P εμφάνιζαν μέση υδροδυναμική διάμετρο ~12nm, ενώ η E3R158P περιελάμβανε μέση διάμετρο 14,3nm με εύρος κατανομής 2,3nm. Ωστόσο, έπειτα από επώαση στους 37°C, και οι τρεις μεταλλάξεις παρουσίαζαν μεγαλύτερες υδροδυναμικές διαμέτρους, περιλαμβάνοντας πληθυσμούς με υδροδυναμική διάμετρο που έφτανε τα 100nm, σε αντίθεση με την αποΕ3 αγρίου τύπου που η υδροδυναμική της διάμετρος παρέμενε σταθερή (σχήμα 26). Συμπερασματικά, η εισαγωγή των παραπάνω μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ3 επηρεάζει τις ιδιότητες ολιγομερισμού της και καθιστά τις μεταλλαγμένες αποΕ3 επιρρεπείς σε συσσωμάτωση στη φυσιολογική για τον οργανισμό θερμοκρασία των 37°C [173].



Σχήμα 26. Μεταβολή της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της, έπειτα από επώαση 4 ή 24h στους 37°C, ή απουσία επώασης.

# 7.2.7 Μελέτη της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση των E3R145P, E3R147P, E3R158P σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου

Δεδομένης της δομικής και θερμοδυναμικής αποσταθεροποίησης που προκαλεί η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριο της αποΕ3, υποθέσαμε πως οι μεταλλαγμένες αποΕ3 μπορεί να είναι περισσότερο επιρρεπείς σε πρωτεόλυση συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Η αυξημένη ευαισθησία σε πρωτεόλυση αποτελεί ένδειξη δομικής αποσταθεροποίησης μιας πρωτεΐνης. Επιπλέον μπορεί να συσχετίζεται με βιολογικές διεργασίες καθώς σε περιοχές όπου εντοπίζεται φλεγμονή υπάρχει συχνά αυξημένη πρωτεολυτική δράση κυρίως λίγων πρωτεασών που δρουν στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία για να διευκολύνουν τη μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [179, 180]. Η ισομορφή αποΕ4 έχει βρεθεί πως είναι περισσότερο ευαίσθητη σε πρωτεόλυση in vitro και in *vivo* συγκριτικά με την αποΕ3. Η αυξημένη ευαισθησία της αποΕ4 σε πρωτεόλυση έχει προταθεί πως είναι σημαντική για την εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων [181]. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την ευαισθησία των E3R145P, E3R147P και E3R158P και της αποΕ3 αγρίου τύπου σε πρωτεόλυση από την ελαστάση, θρυψίνη και χυμοθρυψίνη. Αμέσως μετά την επαναδιάταξή τους, οι αποΕ3 (μεταλλαγμένες και μη), επωάστηκαν απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των παραπάνω πρωτεασών για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η διεξαγωγή των ενζυμικών αντιδράσεων σταμάτησε με την προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 1,7mM. Στη συνέχεια, λήφθηκε δείγμα από κάθε αντίδραση (control ή παρουσία πρωτεάσης) και αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12%w/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 27.

×



Σχήμα 27. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12% w/v) των δειγμάτων αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της έπειτα από επώασή τους απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ελαστάσης, θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης για 1h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα βέλη δείχνουν τη ζώνη που αντιστοιχεί στη χρησιμοποιούμενη κάθε φορά πρωτεάση (που είναι ορατή μόνο στο διάλυμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση πρωτεάσης). Τα ορθογώνια πλαίσια περικλείουν τις ζώνες που αντιστοιχούν στα θραύσματα της αποΕ3 αγρίου τύπου που είναι ανθεκτικά στην πρωτεόλυση [173].

Οι τρεις πρωτεάσες που χρησιμοποιήθηκαν, ελάσταση, θρυψίνη και χυμοθρυψίνη, περικλείουν τις πιο κοινές ειδικότητες πρωτεασών, καθώς υδρολύουν τον πεπτιδικό δεσμό αμέσως μετά από υδρόφοβα, θετικά φορτισμένα και αρωματικά αμινοξέα αντίστοιχα. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεασών, αποικοδομήθηκε μεν η αποΕ3 αγρίου τύπου, αλλά συσσωρεύτηκαν κάποια ανθεκτικά σε πρωτεόλυση θραύσματά της, που έχουν σημειωθεί με ορθογώνιο περίγραμμα. Οι τρεις μεταλλαγμένες αποΕ3 βρέθηκε πως ήταν περισσότερο επιρρεπείς σε πρωτεόλυση σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου, ανεξάρτητα από την πρωτεάση που χρησιμοποιήθηκε. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα ανθεκτικά σε πρωτεόλυση θραύσματα της αποΕ3 απουσίαζαν από τα διαλύματα των αντιδράσεων πέψης των E3R145P, E3R147P και E3R158P και παρατηρήθηκαν νέα προϊόντα πρωτεόλυσης, (κυρίως στην περίπτωση πέψης με χυμοθρυψίνη). Η παρουσία νέων προϊόντων πέψης στην περίπτωση των μεταλλαγμένων αποΕ3 υποδεικνύει πως η εισαγωγή των παραπάνω μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ3 προκαλεί τέτοιες δομικές ανακατατάξεις ώστε νέες, διαφορετικές περιοχές της αποΕ3 να γίνονται προσβάσιμες από τις πρωτεάσες και να πρωτεολύονται. Καμία από τις πρωτεάσες που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζει ειδικότητα υδρόλυσης του πεπτιδικού δεσμού μετά από προλίνη, συνεπώς οι διαφορές στα προϊόντα πρωτεόλυσης που συσσωρεύτηκαν υποδηλώνουν πως η δομή των μεταλλαγμένων αποΕ3 είναι τοπικά αποδιατεταγμένη και επιτρέπει την έκθεση νέων περιοχών πρωτεόλυσης στο διαλύτη. Η εισαγωγή των μεταλλάξεων οδήγησε σε αυξημένη ευαισθησία της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ3 στην πρωτεόλυση, μία ιδιότητα που μπορεί να σχετίζεται φυσιολογικά με περιοχές που εντοπίζεται φλεγμονή, όπου η δράση πρωτεασών είναι αυξημένη.

### 7.2.8 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις E3R145P, E3R147P, E3R158P και την αποE3 αγρίου τύπου.

Διερευνήσαμε αν η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριο της αποE3 επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με τα λιπίδια. Η κινητική αναμόρφωσης DMPC κυστιδίων απο την αποE3 περιλαμβάνει δύο φάσεις, μία αρχική «απότομη» φάση (ταχεία) και μία κύρια βραδεία μετάπτωση. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μοντέλο εκθετικής μείωσης δύο φάσεων και προσδιορίστηκαν οι φαινόμενες σταθερές ταχύτητας των φάσεων αυτών. Αν και όλες οι μεταλλαγμένες αποE3 αναμόρφωσαν αποτελεσματικά το αιώρημα των DMPC κυστιδίων (σχήμα 28A), η δεύτερη, βραδεία φάση της καμπύλης αναμόρφωσης ήταν σημαντικά ταχύτερη σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας ταχύτερη πρόσδεση της μεταλλαγμένης αποΕ στα λιπίδια (σχήμα 28B). Η βραδεία φάση της κινητικής έχει προταθεί πως σχετίζεται με την αποδιάταξη της αμινο-τελικής περιοχής της αποE3 [80, 81]. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμβατά με την ιδέα ότι η εισαγωγή των μεταλλάξεων στο μόριο της αποE3 επηρεάζει την κινητική αποδιάταξης της αμινο-τελικής περιοχής της.



Σχήμα 28. Α. Κινητική αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από την αποΕ3 αγρίου τύπου και τις μεταλλάξεις της. Β. Ραβδόγραμμα των σταθερών ταχύτητας της βραδείας φάσης της κινητικής αναμόρφωσης [173].

# 7.2.9 Παρασκευή ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν αποΕ3 αγρίου τύπου ή καθεμία από τις μεταλλάξεις της (E3R145P, E3R147P και E3R158P).

Οι δομικές και θερμοδυναμικές διαφορές μεταξύ της αποΕ3 αγρίου τύπου και των τριών μεταλλάξεών της, καθώς και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη λειτουργική δοκιμασία αναμόρφωσης λιπιδίων, μας ώθησαν να διερευνήσουμε αν η παρουσία των μεταλλάξεων E3R145P, E3R147P και E3R158P επηρεάζουν το σχηματισμό, το μέγεθος ή τη μορφολογία ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιλαμβάνουν τις παραπάνω μεταλλάξεις. Για το λόγο αυτό, παρασκευάσαμε ανασυγκροτημένα σωματίδια που προσομοιάζουν σε HDL και περιείχαν την αποΕ3 αγρίου τύπου (rHDL-E3wt) ή καθεμιά από τις μεταλλάξεις της (rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P, rHDL-E3R158P). Οι μοριακές αναλογίες POPC: χοληστερόλη: αποΕ3 που προσδιορίστηκαν πειραματικά (βλ. παρ. 6.5.3-6.5.5) στις ανασυγκροτημένες λιποπρωτεΐνες περιελάμβαναν αντίστοιχη αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΕ3 που προσδιορίστηκαν αυτίστοιχη αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΕ3 που παρασκευάσαμε παρουσιάζονται στον πίνακα 17. Όλες οι ανασυγκροτημένες λιποπρωτεΐνες περιελάμβαναν αντίστοιχη αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΕ3 που προσδιορίστηκαν πειραματικά (βλ. παρ. 6.5.3-6.5.5) στις ανασυγκροτημένες λιποπρωτεΐνες περιελάμβαναν αντίστοιχη αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΕ3.

Ανασινγκοοτριένες λιποποιντεϊνες	Μοριακή αναλογία ΡΟΡC: χοληστερόλη: αποΕ3				
Ανασυγκροπιμένες λιποπρωτείνες	POPC	Χοληστερόλη	ΑποΕ3		
rHDL με Ε3 αγρίου τύπου	95	10	1		
rHDL με E3R145P	94	10	1		
rHDL με E3R147P	99	11	1		
rHDL με E3R158P	99	11	1		

Πίνακας 17. Μοριακή αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΕ3 που προσδιορίστηκε πειραματικά στις ανασυγκροτημένες λιποπρωτέΐνες με αποΕ3 αγρίου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της.

# 7.2.9.1 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας των αποΕ ως συστατικών λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων

Μελετήθηκε αν οι μεταλλάξεις R145P, R147P και R158P επηρεάζουν τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της προσδεδεμένης με λιπίδια αποE3. Για το λόγο αυτό, λήφθηκαν τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες ανασυγκροτημένων σωματιδίων «τύπου HDL» που περιελάμβαναν την αποE3 αγρίου τύπου ή καθεμία από τις μεταλλάξεις της και παρατηρήθηκε πως οι μεταλλαγμένες αποE3 παρουσιάζουν σαφώς μειωμένο ποσοστό α-έλικας ακόμη κι όταν βρίσκονται εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (σχήμα 29).



Σχήμα 29. Α. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιέχουν αποΕ3 αγρίου τύπου ή μεταλλάξεις της. Β. Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό ελικότητας στα 222nm που περιλαμβάνουν οι μεταλλαγμένες και μη αποΕ3 εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (\*p=0,007, \*\*p=0,0002, \*\*\*p<0,0001) [173].

Επίσης, έλαβε χώρα θερμική αποδιάταξη των μεταλλαγμένων αποΕ3 εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Οι μεταλλαγμένες αποΕ3 παρουσίασαν θερμοκρασία μετάπτωσης 8-9°C μικρότερη από την αντίστοιχη της αποΕ3 αγρίου τύπου (σχήμα 30). Οι μεταλλαγμένες αποΕ3 εντός λιποπρωτεϊνών παρουσίασαν απώλεια της περιεχόμενης ελικότητάς τους σε χαμηλότερες θερμοκρασίες συγκριτικά με την περιεχόμενη σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αποΕ3 αγρίου τύπου.



Σχήμα 30. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων και μη αποΕ3 που αποτελούν τα πρωτεϊνικά συστατικά ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL». Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό αποδιάταξης των αποΕ3 σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας από 20 μέχρι και 95°C [173].

#### 7.2.9.2 Μελέτη της ευαισθησίας σε πρωτεόλυση των E3R145P, E3R147P, E3R158P εντός λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» σε σχέση με την αποE3 αγρίου τύπου.

Μελετήθηκε η ευαισθησία των μεταλλαγμένων ή αγρίου τύπου αποΕ3 που αποτελούν συστατικά των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» έναντι πρωτεόλυσης από τις πρωτεάσες θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστάση. Τα πειράματα ανθεκτικότητας των αποΕ3 σε πρωτεόλυση από τη θρυψίνη (βλ. παρ. 6.13) έδειξαν πως οι εντός λιποπρωτεϊνών μεταλλαγμένες αποΕ3 είναι ελαφρώς πιο ευαίσθητες σε πρωτεόλυση συγκριτικά με την αντίστοιχη αποΕ3 αγρίου τύπου. Κάτι τέτοιο διαφαίνεται από το γεγονός πως συγκεκριμένα ανθεκτικά σε πρωτεόλυση θραύσματα της αποΕ3 δεν παρατηρούνται στις μεταλλαγμένες μορφές (σχήμα 31).



Σχήμα 31. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των θραυσμάτων της αποΕ που προκύπτουν έπειτα από πρωτεόλυση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL-E» από τη θρυψίνη (σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, 0,01, 0,1, 1 και 10μg/mL). Τα τετράγωνα

#### πλαισιώνουν τις ζώνες των θραυσμάτων της αποΕ3 που συσσωρεύονται στην αποΕ3 αγρίου τύπου, αλλά καταβολίζονται στις μεταλλαγμένες αποΕ3 [173].

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η εισαγωγή των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριο της αποΕ3 επάγει δομική και θερμοδυναμική αστάθεια όχι μόνο στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της, αλλά και όταν βρίσκεται εντός δισκοειδών ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνών «τύπου HDL».

#### 7.2.9.3 Μελέτη της κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P σε αντιπαραβολή με τα σωματίδια rHDL-E3wt, με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός.

Στα πλαίσια διερεύνησης της δομικής ακεραιότητας των λιποπρωτεϊνών με τις μεταλλαγμένες αποΕ, έλαβε χώρα προσδιορισμός της κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων rHDL με δυναμική σκέδαση φωτός. Τα σωματίδια rHDL που περιείχαν αποΕ3 αγρίου τύπου (rHDL-E3wt) είχαν μέση υδροδυναμική διάμετρο 11,9nm και εύρος κατανομής 2,5nm, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 32. Τα σωματίδια rHDL που περιείχαν E3R158P (rHDL-E3R158P) παρουσίαζαν παρόμοια κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου με τα rHDL-E3wt. Ωστόσο, τα rHDL-E3R145P και rHDL-E3R147P είχαν λίγο μεγαλύτερη μέση υδροδυναμική διάμετρο (13,4 και 13,9nm, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας πιθανές δομικές τροποποιήσεις στα ανασυγκροτημένα σωματίδια.



Σχήμα 32. Κανονικοποιημένη κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου των rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P κατ' όγκο δείγματος [173].

7.2.9.4 Μελέτη της μορφολογίας και του μεγέθους των rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P σε αντιπαραβολή με τα σωματίδια rHDL-E3wt, με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Για να διερευνήσουμε τη δομική βάση των αλλάγών στο μέγεθος και τη μορφολογία μεταξύ των rHDL που περιέχουν μεταλλαγμένες αποΕ3 και των rHDLπου περιέχουν αποΕ3 αγρίου τύπου, έλαβε χώρα ανάλυση των rHDL που παρασκευάσαμε με ηλεκτρονική μικροσκοπία από τον Dr.

Donald Gantz (Τμήμα Φυσιολογίας και Βιοφυσικής, Πανεπιστήμιο της Βοστώνης). Στις εικόνες που λήφθηκαν, παρατηρήθηκε πως όλες οι λιποπρωτεΐνες ανεξάρτητα αν περιείχαν, μεταλλαγμένη αποΕ ή όχι, σχημάτιζαν μικρούς κυλίνδρους, ενδεικτικούς των δισκοειδών rHDL σωματιδίων, που έτειναν να προσκολλώνται μεταξύ τους κατά τη διαδικασία αρνητικής χρώσης, διευκολύνοντας έτσι τη μέτρηση των διαμέτρων τους (σχήμα 33). Αυτό το φαινόμενο είναι καλά χαρακτηρισμένο στη βιβλιογραφία [128].



Σχήμα 33. Χαρακτηριστικά μικρογραφήματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που παρουσιάζουν τα δισκοειδή σωματίδια rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P.

Μετρήσαμε τη διάμετρο 100 σωματιδίων από τα μικρογραφήματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 33 και υπολογίσαμε τη συχνότητα κατανομής της διαμέτρου των σωματιδίων (σχήμα 34).



Σχήμα 34. Κατανομή του μεγέθους των δισκοειδών rHDL σωματιδίων που περιείχαν αποΕ3 αγρίου τύπου ή μεταλλάξεις τους, όπως προοέκυψε από ανάλυσή τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στη διάμεσο κάθε κατανομής. Τα ένθετα A-C παρουσιάζουν χαρακτηριστικές δομές των σωματιδίων rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P [173].

Η διάμεσος κάθε κατανομής που προέκυψε από την ανάλυση των rHDL με ηλεκτρονική μικροσκοπία ταιριάζει με τη μέση υδροδυναμική διάμετρο που υπολογίστηκε από τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός. Ωστόσο, προσεκτική μελέτη των μικρογραφημάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (σχήματα 33-34) αποκαλύπτει πως αν και τα περισσότερα από τα σωματίδια που περιέχουν αποΕ3 αγρίου τύπου, ή κάποια από τις μεταλλάξεις της, είναι παρόμοια μεταξύ τους, υπάρχουν αρκετά σωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου που επηρεάζουν την υπολογισθείσα μέση διάμετρο. Πιο συγκεκριμένα, οι E3R145P και E3R147P τείνουν να σχηματίσουν ένα υποσύνολο δισκοειδών σωματιδίων μεγαλύτερης διαμέτρου (μέχρι και διπλάσιας διαμέτρου σε σχέση με τη μέση διάμετρο των rHDL-E3wt), που μπορεί να έχουν προκύψει από σύντηξη δίσκων κανονικού μεγέθους (ένθετο Α, Β, C του σχήματος 34). Αντίθετα, η E3R158P δεν σχηματίζει μεγαλύτερα δισκοειδή σωματίδια, αλλά αρκετά ασαφή συσσωματώματα (συστάδες) «κακο-σχηματισμένων» σωματιδίων (ένθετο D του σχήματος 34). Κάποια μικρά συσσωματώματα συστωματιδια του σε σχήματος 34).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης των rHDL-E3wt, rHDL-E3R145P, rHDL-E3R147P και rHDL-E3R158P με ηλεκτρονική μικροσκοπία συμφωνούν με τα αποτελέσματα της ανάλυσής τους με δυναμική σκέδαση φωτός και υποδεικνύουν πως και οι τρεις μεταλλάξεις τείνουν να σχηματίσουν λιποπρωτεϊνικά σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους και κακής μορφολογίας συγκριτικά με αυτά που περιέχουν αποΕ3 αγρίου τύπου [173]. Η αυξημένη τάση συσσωμάτωσης των rHDL που περιέχουν μεταλλαγμένες αποΕ3 μπορεί να σχετίζεται με την ιδιότητα των μη λιπιδιωμένων E3R145P, E3R147P και E3R158P να συσσωματώνονται.

Κατά τη λιπιδίωση των επιρρεπών σε ολιγομερισμό μεταλλαγμένων αποΕ3 μπορεί να σχηματίζονται συσσωματώματα αποΕ3 ή λιποπρωτεϊνών που εναποτίθενται στα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος. Τα μεγαλύτερα και «αλλοιωμένης μορφολογίας» λιποπρωτεϊνικά σωματίδια μπορεί επίσης να προκύπτουν από σύντηξη φυσιολογικών δισκοειδών σωματιδίων λόγω της δομικής αστάθειας που τους προσδίδουν οι μεταλλαγμένες αποΕ3. Η εναπόθεση λιποπρωτεϊνών στα σπειραματικά τριχοειδή μπορεί να οδηγήσει σε τοπική φλεγμονή και έκκριση πρωτεασών που αναμορφώνουν το εξωκυττάριο υλικό της μήτρας. Οι πρωτεάσες αυτές πιθανά να πρωτεολύουν τις μεταλλαγμένες αποΕ3, προκαλώντας περαιτέρω συσσώρευση και κατακρήμνισή τους και επιδεινώνοντας την εξέλιξη της νόσου [173].

#### 7.2.9.5 Μελέτη της συσσωμάτωσης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιέχουν μεταλλαγμένη ή μη αποΕ3 έπειτα από επώαση με φωσφολιπάση Α2 σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A2 εντοπίζεται στο αρτηριακό τοίχωμα και τις αλλοιωμένες LDL και επάγει συσσωμάτωση των λιποπρωτεϊνών [112]. Χρησιμοποιήσαμε φωσφολιπάση A2 προκειμένου να μελετήσουμε αν η εισαγωγή των μεταλλάξεων στο μόριο της αποΕ επάγει συσσωμάτωση των δισκοειδών «τύπου HDL» λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και να αξιολογήσουμε αν η παρουσία των μεταλλάξεων μπορεί να επηρεάσει την κινητική της συσσωμάτωσης (σχήμα 35). Έπειτα από επώαση 24h με 100ng/ml φωσφολιπάση A2 (βλ. παρ. 6.21) παρατηρήθηκε μερική συσσωμάτωση των σωματιδίων που περιελάμβαναν αποΕ3 αγρίου τύπου. Αντίθετα, τα σωματίδια που περιείχαν μεταλλαγμένες αποΕ3 συσσωματώνονταν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Συγκεκριμένα, τα σωματίδια που περιελάμβαναν αποΕ3 R145P και R147P είχαν πλήρως συσσωματωθεί έπειτα από την επώαση 24h.



Σχήμα 35. Κανονικοποιημένη κατανομή της υδροδυναμικής διαμέτρου των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» που περιλαμβάνουν την αποΕ3 αγρίου τύπου ή τις μεταλλάξεις της έπειτα από επώασή τους στους 37°C για 24h παρουσία 100ng/mL φωσφολιπάση A<sub>2</sub> [173].

Τα αποτελέσματα της μελέτης συσσωμάτωσης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων «τύπου HDL» με αποΕ3 υποδεικνύουν πως τα σωματίδια με τις μεταλλαγμένες αποΕ3 έχουν αποσταθεροποιηθεί θερμοδυναμικά και συσσωματώνονται. Το γεγονός πως η φωσφολιπάση Α2 εντοπίζεται τόσο σε κανονικά όσο και αποφραγμένα νεφρά, καθώς και στο αρτηριακό ενδοθήλιο, και έχει ενοχοποιηθεί για συνεισφορά στην αθηρογένεση και τη φλεγμονή, οδηγεί στη σκέψη πως η συσσωμάτωση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν τις μεταλλαγμένες αποΕ μπορεί να σχετίζεται φυσιολογικά με την παθογένεση της ΛΠΣ [173].

#### 7.3 Μελέτη της σχέσης δομής- λειτουργίας των μεταλλάξεων που σχετίζονται με θεραπευτική δράση έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας σε αποΑ-Ι<sup>-/-</sup> και αποΕ<sup>-/-</sup> ποντίκια.

Τα αμινοξέα Leu261, Trp264 και Phe265 της αποΕ παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή υπετριγλυκεριδαιμίας, τη συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης στα σωματίδια VLDL και HDL καθώς και το σχηματισμό δισκοειδών HDL [129]. Η υποκατάσταση των τριών αυτών αμινοξέων με Ala σε υπόβαθρο αποΕ2 και αποΕ4 έχει βρεθεί πως βελτιώνει τις λειτουργίες της αποΕ συντελώντας στην καταπολέμηση της υπερτριγλυκεριδαιμίας και επάγοντας το σχηματισμό σφαιρικών HDL που περιλαμβάνουν αποΕ [129]. Αν και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της αποΕ παρουσιάζουν αντίστοιχη λειτουργική συμπεριφορά έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας, ωστόσο διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς την κατανομή χοληστερόλης στα κλάσματα IDL/LDL

καθώς και την κατανομή της αποΕ στα κλάσματα HDL2 και HDL3 των αποΑ-Ι-<sup>--</sup> και αποΕ-<sup>--</sup> ποντικιών, στα οποία χορηγούνται. Η διαφοροποίηση αυτή μεταξύ των αποΕ4 [Leu261Ala/Trp264Ala/Phe265Ala] (αποΕ4mutC) και αποΕ2 [Leu261Ala/Trp264Ala/Phe265Ala] (αποΕ2mutC) υποδηλώνει πως η κοινή τριπλή μετάλλαξη [Leu261Ala/Trp264Ala/Phe265Ala] , πιθανώς επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία τις αποΕ ανάλογα με την ισομορφή της αποΕ στην οποία εισάγεται.

Προκειμένου να προσεγγίσουμε τη δομική βάση στην οποία στηρίζονται οι ιδιαίτερες λειτουργικές ιδιότητες των αποΕ4mutC και αποΕ2mutC, αναλύσαμε τα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά τους σε αντιπαραβολή με την αποΕ4 και αποΕ2 αγρίου τύπου αντίστοιχα. Για να το επιτύχουμε αυτό, εκφράσαμε τις αποΕ αγρίου τύπου και τις μεταλλαγένες μορφές τους- τόσο σε υπόβαθρο αποΕ2 και αποΕ4- κατόπιν επιμόλυνσης HTB-13 κυττάρων με αδενοϊούς [118]. Ακολούθως καθαρίσαμε τις αποΕ με τη χρήση ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (FPLC) μέσω στήλης εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης και μελετήσαμε τη δομή τους με τη χρήση βιοφυσικών τεχνικών.

Τα αμινοξέα που μεταλλάσσονται στις θέσεις 261, 264 και 265 εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο μίας εκτεταμένης α-έλικας που ανήκει στην καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΕ. Η παραπάνω α-έλικα καλύπτει το αμινο-τελικό δεμάτι τεσσάρων ελίκων της αποΕ και σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση μεταξύ αμινο- και καρβοξυ-τελικής περιοχής. Στην εικόνα 41 παρουσιάζεται η δομή της περιοχής- που λύθηκε με τη χρήση NMR- και περιλαμβάνει τα αμινοξέα που όταν υποκατασταθούν από αλανίνη δρουν θεραπευτικά έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας. Στη δομή αυτή (PDB: 2L7B), η θρυπτοφάνη- που φυσιολογικά εντοπίζεται στη θέση 264 της αποΕ αγρίου τύπου- έχει υποκατασταθεί από αργινίνη.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 41, η Leu 261 και η Phe 265 εκτίθενται στο διαλύτη, αποτελώντας υποψήφια αμινοξέα προς αλληλεπίδραση με λιπίδια, ενώ η αργινίνη (που υποκαθιστά τη θρυπτοφάνη) εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ της αμινο- και της καρβοξυτελικής περιοχής.



Εικόνα 41. Δομή NMR της αποΕ3 (PDB: 2L7B) που περιλαμβάνει τη διευθέτηση των αμινοξέων που εντοπίζονται στις θέσεις 261, 264 και 265 στο χώρο [118].

Είναι ενδιαφέρον πως ο χώρος που διατίθεται μεταξύ των δύο περιοχών δεν είναι επαρκής να φιλοξενήσει τη φυσικά απαντώμενη στη θέση 264 θρυπτοφάνη, υποδηλώνοντας πως η NMR δομή δεν ανταποκρίνεται απόλυτα στη δομή της αποΕ σε διάλυμα. Κατά συνέπεια, για να ικανοποιείται ο εντοπισμός της θρυπτοφάνης στη μεσεπιφάνεια μεταξύ αμινο- και καρβοξυτελικής περιοχής, θα πρέπει η περιοχή 261-265 να είναι πιο χαλαρά πακεταρισμένη έναντι του δεματιού τεσσάρων ελίκων στη δομή της αποΕ αγρίου τύπου σε διάλυμα. Η υποκατάσταση της θρυπτοφάνης από την αλανίνη- όπως στις μεταλλάξεις που διερευνούμε στην παρούσα μελέτηαναμένεται να διευκολύνει το πακετάρισμα αυτό, συντελώντας σε τροποποιημένες θερμοδυναμικές ιδιότητες και λειτουργία.

### 7.3.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός των αποΕ4mutC, αποΕ2mutC και των αποΕ4 και αποΕ2 αγρίου τύπου σε σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων, HTB-13.

Έπειτα από επιμόλυνση HTB-13 κυττάρων με τους κατάλληλους αδενοϊούς προς έκφραση των αποE4mutC, αποE2mutC, αποE4 και αποE2 αγρίου τύπου, λήφθηκε το μέσο με την εκφρασμένη πρωτεΐνη και υπέστη καθαρισμό μέσω στήλης εποξυ-ενεργοποιημένης σεφαρόζης (βλ. παρ. 6.11.2- 6.11.3). Τα καθαρά κλάσματα της αποΕ αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (σχήμα 36A). Επίσης υπέστησαν μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση western (βλ. παρ 6.7), όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 36B.



Σχήμα 36. Α. Ανάλυση των αποΕ2mutC, αποΕ4mutC, αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Β. Ανοσοαποτύπωση των ζωνών των παρπάνω πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. 1ο αντίσωμα: 6C5 μυός (1:1000), 2ο αντίσωμα: αίγας έναντι μυός (1:5000) [118].
Αν και οι ζώνες των αποΕ, μεταλλαγμένων και μη, αντιστοιχούν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~35kDa), παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στο ύψος των ζωνών. Οι διαφορές αυτές μας οδήγησαν να διερευνήσουμε αν η αιτία που τις προκαλεί σχετίζεται με κάποια ιδιότητα που χαρακτηρίζει τις μεταλλαγμένες μορφές. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη που διαφοροποιείται περισσότερο είναι η αποΕ2mutC, η οποία αντιστοιχεί σε μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με την αποΕ2 αγρίου τύπου. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου που περιελάμβανε SDS σε συγκέντρωση μικρότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων δεν οδήγησε σε αλλαγή της σχετικής θέσης των ζωνών της αποΕ, υποδηλώνοντας πως οι διαφορές στην ανάλυση των ζωνών στην πηκτή δεν οφείλονται σε διαφορετικές μορφές αποΕ προσδεδεμένες σε μικύλλια SDS (σχήμα 37).



Σχήμα 37. Η ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες- με συγκέντρωση SDS μικρότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση μυκιλλίων- δεν επηρέασε τη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των αποΕ.

Η επώαση των γλυκοπρωτεϊνών αποΕ με τη νευραμινιδάση Clostridium Perfringens για 4h στους 37°C (βλ. παρ 6.12), προς απομάκρυνση των σιαλικών ομάδων τους, ελαχιστοποίησε τις αποστάσεις μεταξύ των ζωνών των αποΕ (σχήμα 38). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως κύρια αιτία της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των μεταλλαγμένων έναντι των φυσιολογικών μορφών της αποΕ είναι μεταβολές στη γλυκοζυλίωση. Η αποΕ είναι μερικώς γλυκοζυλιωμένη στο ανθρώπινο πλάσμα (~20%) στη θρεονίνη 194 και όπως προέκυψε και από τη μελέτη των μεταλλαγμένων και μη αποΕ3 στην παρούσα διατριβή (βλ. παρ. 7.1.1), η αποΕ που εκφράζεται σε κύτταρα αστροκυτώματος HTB-13, μιμείται το πρότυπο γλυκοζυλίωσης της αποΕ του πλάσματος.



Σχήμα 38. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες των μεταλλαγμένων και μη μορφών της αποΕ έπειτα από επώασή τους στους 37°C για 4h, απουσία (-) ή παρουσία (+) της νευραμινιδάσης [118].

# 7.3.2 Μελέτη της επίδρασης της τριπλής μετάλλαξης [Leu261Ala/Trp264Ala/Phe265Ala] στη δευτεροταγή δομή των αποΕ2 και αποΕ4.

Λάβαμε τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού των μεταλλάξεων αποΕ4mutC και αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με τα φάσματα των αντίστοιχων ισομορφών της αποΕ αγρίου τύπου για να διερευνήσουμε αν οι μεταλλάξεις στην περιοχή 261-265 επηρεάζουν τη δομή της αποΕ. Τα φάσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στο σχήμα 39.



Σχήμα 39. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ4 αγρίου τύπου (Β) [118].

Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 39, η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης μείωσε σημαντικά την ελικότητα στο μόριο της αποΕ ανεξαρτήτως ισομορφής. Στον πίνακα 17 καταγράφονται τα εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας στα 208 και 222nm τόσο για τις αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές τους, όπως υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις (3) και (4) (παρ. 3.2.) Κατά μέσο όρο, η αποΕ έχασε περίπου 18% του περιεχομένου ποσοστού α-έλικας στα 222nm από την εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στο μόριό της. Επίσης, η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στα 208nm- 26% και 29%- στις ισομορφές αποΕ2 και αποΕ4 αντίστοιχα.

Πίνακας 18. Εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας στα 208 και 222nm στο μόριο των αποΕ2 και αποΕ4, μεταλλαγμένων και μη [118].

ΑποΕ	% α-ελικότητα στα 208nm	% α-ελικότητα στα 222nm
ΑποΕ2 αγρίου τύπου	47,9± 1,25	52,4± 0,8
AπoE2 mutC	35,5± 1,8 <sup>*1</sup>	43,0± 0,4 <sup>*2</sup>
ΑποΕ4 αγρίου τύπου	45,8± 1,3	50,7±0,3
AπoE4 mutC	32,7±1,7 <sup>*3</sup>	41,5± 1,1 <sup>*4</sup>

\*<sup>1</sup> p=0,0015, \*<sup>2</sup> p=0,0027, \*<sup>3</sup> p=0,0086, \*<sup>4</sup> p=0,0021

Η σημαντική αλλαγή στο περιεχόμενο ποσοστό α-έλικας των αποΕ υποδηλώνει πως η δομική αποσταθεροποίηση που επάγεται στο μόριο της αποΕ από την εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης δεν εντοπίζεται μόνο στην περιοχή της μετάλλαξης, αλλά επεκτείνεται και σε άλλες περιοχές του μορίου, προκαλώντας γενικευμένη δομική αποσταθεροποίηση [118].

7.3.3 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των αποΕ2mutC και αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου.

Η σημαντική απώλεια ελικότητας στο μόριο της αποΕ λόγω της εισαγωγής των τριπλών μεταλλάξεων μάς ώθησε να διερευνήσουμε την επίδραση των μεταλλάξεων στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου. Παρακολουθήσαμε το προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της, καταγράφοντας το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 222nm ενώ παράλληλα η θερμοκρασία του δείγματος αυξανόταν από τους 20 μέχρι τους 80°C, με ρυθμό 1°C/min. Στο σχήμα 40 παρουσιάζεται η αύξηση του κλάσματος της αποδιατεταγμένης αποΕ σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας.



Σχήμα 40. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με αυτό της αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC συγκριτικά με αυτό της αποΕ4 αγρίου τύπου (Β) [118].

Οι αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου παρουσίασαν μία μετάπτωση χαμηλής συνεργιστικότητας. Έγινε προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων αποδιάταξης για τις αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου σε εξίσωση Boltzmann και οι θερμοκρασίες μετάπτωσης που υπολογίστηκαν ήταν 52,8 και 43,6°C.

Πίνακας 19. Θερμοκρασίες αποδιάταξης και συντελεστές συνεργιστικότητας των αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών τους [118].

ΑποΕ	Tm (°C)	n (συντελεστής συνεργιστικότητας)
ΑποΕ2 αγρίου τύπου	52,8± 1,2	6,1± 0,7
AπoE2 mutC	32± 5	7.9± 0.5
	65,5± 0,4	16.9± 1.4
ΑποΕ4 αγρίου τύπου	43,6± 0,7	5,3± 0,3
AπoE4 mutC	44,6± 2,9	5,0± 0,1

Τόσο η αποΕ2 και η αποΕ4 αγρίου τύπου αποδιατάχθηκαν θερμικά με χαρακτηριστική για το μόριο της αποΕ, περιορισμένη συνεργιστικότητα [96]. Η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στο μόριο της αποΕ4 (αποΕ4mutC) είχε μικρή επίδραση στη θερμοκρασία μετάπτωσης και τη συνεργιστικότητα της αποΕ4, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 40 και τον πίνακα 18.

Ωστόσο, η αποΕ2mutC υπέστη θερμική μετάπτωση τριών καταστάσεων (δύο σταδίων) και περιελάμβανε ενδιάμεση κατάσταση στο εύρος θερμοκρασιών 40-60°C (σχήμα 40A). Το δεύτερο στάδιο της αποδιάταξης παρουσίασε σημαντικά αυξημένη θερμοκρασία μετάπτωσης, 65,5°C, και αυξημένο συντελεστή συνεργιστικότητας, υποδηλώνοντας πως η μετάπτωση αυτή ήταν σαφώς πιο συνεργιστική συγκριτικά με την αγρίου τύπου (πίνακας 19). Το «ξεχωριστό» προφίλ αποδιάταξης της αποΕ2mutC δεν αποτελεί συνέπεια της υπερ-γλυκοζυλίωσης που τη χαρακτηρίζει, καθώς η απογλυκοζυλίωση του μορίου δεν επηρέασε το προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC (σχήμα 41).



Σχήμα 41. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC απογλυκοζυλιωμένης (κόκκινη γραμμή) και μη (μαύρη γραμμή). Στο ένθετο σχήμα παρουσιάζονται οι ζώνες της απογλυκοζυλιωμένης και μη αποΕ2mutC, έπειτα από ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες [118].

Η σημαντική διαφορά στην επίδραση της εισαγωγής της ίδιας τριπλής μετάλλαξης στην αποΕ2 σε σχέση με την αποΕ4 μπορεί να σχετίζεται με τις δομικές διαφορές που χαρακτηρίζουν τις δύο ισομορφές [73].

# 7.3.4 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποΕ2mutC και αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου.

Καταγράψαμε το προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου μορφών των αποΕ2 και αποΕ4, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 42.



Σχήμα 42. Προφίλ χημικής αποδιάταξης της αποΕ2mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ2 αγρίου τύπου (Α) και της αποΕ4mutC σε αντιπαραβολή με την αποΕ4 αγρίου τύπου (Β) [118].

Η αποΕ αγρίου τύπου χαρακτηρίζεται από μετάπτωση δύο σταδίων και περιλαμβάνει μία ενδιάμεση κατάσταση που εμφανίζεται όταν το δείγμα περιλαμβάνει υδροχλωρική γουανιδίνη σε συγκέντρωση μεταξύ 1 και 2M [96]. Οι αποΕ2 και αποΕ4 αγρίου τύπου υπέστηκαν μετάπτωση δύο σταδίων, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ενώ παρατηρήθηκε πως η εισαγωγή των τριπλών μεταλλάξεων οδήγησε σε μικρή μετατόπιση της μετάπτωσης σε υψηλότερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης και συνεπώς μικρή σταθεροποίηση των αποΕ2mutC και αποΕ4mutC έναντι των αντίστοιχων αγρίου τύπου μορφών τους.

## 7.3.5 Ιχνηθέτηση των υδρόφοβων επιφανειών των μεταλλαγμένων και μη αποΕ2 και αποΕ4 με ANS.

Καταγράψαμε τη μεταβολή στον εκπεμπόμενο φθορισμό από τον ιχνηθέτη ANS έπειτα από την πρόσδεσή του στις αποE2mutC, αποE4mutC και τις αγρίου τύπου μορφές τους, προς μελέτη των υδρόφοβων περιοχών που εκτίθενται στο διαλύτη σε κάθε δείγμα αποΕ. Στο σχήμα 43 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του ANS προσδεδεμένου ή μη, στην αγρίου τύπου αποΕ2 ή αποE2mutC (A) και την αγρίου τύπου αποΕ4 ή αποE4mutC (B).





Η αλληλεπίδραση του ANS με την αποΕ2mutC οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού συγκριτικά με την αλληλεπίδρασή του με την αποΕ2 αγρίου τύπου (σχήμα 43 A και πίνακας 20). Αντίθετα, η αλληλεπίδραση του ANS με την αποΕ4mutC, όπως και με την αποΕ4 αγρίου τύπου, οδήγησαν σε αντίστοιχη αύξηση φθορισμού (σχήμα 43 B και πίνακας 19). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στην ισομορφή αποΕ2 οδηγεί σε έκθεση πιο εκτεταμένης υδρόφοβης περιοχής στο διαλύτη σε αντίθεση με την εισαγωγή της μετάλλαξης στην ισομορφή αποΕ4. Πίνακας 20. Αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού του ιχνηθέτη ANS έπειτα από την πρόσδεσή του σε μεταλλαγμένη ή αγρίου τύπου αποΕ συγκριτικά με τον φθορισμό του απουσία αποΕ [118].

ΑποΕ	Σήμα φθορισμού ANS παρουσία αποΕ/σήμα φθορισμού απουσία αποΕ
ΑποΕ2 αγρίου τύπου	3,2± 0,23
AπoE2 mutC	3,86± 0,46 <sup>*5</sup>
ΑποΕ4 αγρίου τύπου	3,16± 0,11
AπoE4 mutC	3,14± 0,37

\*<sup>5</sup> p=0,035

## 7.3.6 Μελέτη της κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις αποE2mutC και αποE4mutC σε αντιπαραβολή με τις αποE2 και αποE4 αγρίου τύπου αντίστοιχα.

Μελετήσαμε την κινητική αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC από τις μεταλλαγμένες αποE2mutC και αποE4mutC προκειμένου να διερευνήσουμε αν η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στο μόριο των αποE2 και αποE4 αντίστοιχα, επηρεάζει τη βασική λειτουργική ιδιότητά τους να προσδένουν λιπίδια [80, 182]. Η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης τόσο στην αποE2, όσο και στην αποE4, δεν βρέθηκε να επηρεάζει την κινητική αναμόρφωσης των κυστιδίων DMPC συγκριτικά με τις αντίστοιχες μορφές αγρίου τύπου (σχήμα 44). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως οι δομικές μεταβολές που επάγονται από την εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στις αποE2 και αποE4 δεν προκαλούν διαφοροποίηση στην ταχύτητα αλληλεπίδρασης της αποΕ με τα φωσφολιπίδια.



Σχήμα 44. Κινητική αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC απουσία αποΕ (μαύροι κύκλοι), παρουσία αποΕ2mutC και αποΕ2 αγρίου τύπου (Α), καθώς και παρουσία αποΕ4mutC και αποΕ4 αγρίου τύπου (Β) [118].

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

#### ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομήςλειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με τη νόσο ΥΛΠΙΙΙ συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Στη δομή της μεταλλαγμένης αποΕ3 (PDB: 2L7B, εικόνα 9, παρ. 2.4), που λύθηκε με τη χρήση NMR, καθώς και στη δομή της αμινο-τελικής περιοχής της αποΕ (PDB:1LPE, εικόνα 39, παρ.7.1) που λύθηκε με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, τα αμινοξέα R136, R145 and K146 εντοπίζονται σε αντίστοιχες διαμορφώσεις. Στη δομή της μεταλλαγμένης αποΕ3, η καρβοξυ-τελική περιοχή αναδιπλώνεται γύρω από την περιοχή πρόσδεσης στον LDLυποδοχέα, «προστατεύοντάς» την από την επαφή με μόρια του διαλύτη (εικόνα 9Γ, παρ. 2.4). Η παρουσία των υδρόφιλων/ θετικά φορτισμένων αμινοξέων της περιοχής 136-150 σε περιβάλλον απομακρυσμένο από τα πολικά μόρια του διαλύτη επιτυγχάνεται με τη σταθεροποίησή τους μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα εντός της αμινο- ή της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 42, η R136 και η K146 αλληλεπιδρούν με αμινοξέα της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ, ενώ η R145 αλληλεπιδρά με τη Q41 που εντοπίζεται στην αμινο-τελική περιοχή της αποΕ, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου.



Εικόνα 42. Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων R136, R145 και K146 με την αμινο- ή καρβοξυ-τελική πειροχή της αποΕ3 σύμφωνα με τη δομή NMR (PDB: 2L7B). Έλικες αμινο-τελικής περιοχής (μπλε χρώμα), έλικες καρβοξυ-τελικής περιοχής (κόκκινο χρώμα), περιοχή άρθρωσης (πράσινο χρώμα) [91].

Οι παραπάνω διαμοριακές αλληλεπιδράσεις παρεμποδίζονται/ καταργούνται στην περίπτωση εισαγωγής των R136S, R145C και K146E, κάτι που μπορεί να εξηγεί τις επιπτώσεις τους στη δομική σταθερότητα του μορίου [91].

Οι Hatters et al. και Mahley et al. έκαναν την υπόθεση πως αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών περιοχών της αποΕ σχετίζονται με σημαντικές αλλαγές στις διαμόρφωσεις που λαμβάνει η αποΕ· αλλαγές που με τη σειρά τους επηρεάζουν τη λειτουργία της [8, 47]. Αν και είναι δύσκολο να εξηγηθούν τα αποτελέσματα της βιοφυσικής μελέτης χωρίς να είναι γνωστά τα μονοπάτια διάταξης και αποδιάταξης της αποΕ, ωστόσο μπορούν να τεθούν κάποιες συσχετίσεις υπό συζήτηση.

Η ικανότητα των μεταλλάξεων R136S και K146E να ανακτούν τη δευτεροταγή δομή τους έπειτα από θερμική αποδιάταξη, σε αντιπαραβολή με την αποΕ3 αγρίου τύπου και την R145C, μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός πως οι δύο πρώτες μεταλλάξεις αντιστοιχούν σε θέσεις όπου παρατηρείται διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της αμινο- και καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ, ενώ η R145C βρίσκεται σε θέση όπου λαμβάνει χώρα διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ αμινοξέων εντός της αμινο-τελικής περιοχής.

Η R136S βρέθηκε πως είναι επιρρεπής σε ολιγομερισμό μεγαλύτερης τάξης συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου και τις άλλες μεταλλάξεις. Η παραπάνω παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με το γεγονός πως η R136 συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με το E231 (εικόνα 42), ένα αμινοξύ που εμπλέκεται στον ολιγομερισμό της αποE3, όπως διαπίστωσε η ερευνητική ομάδα του Gross ML [53, 183].

Η υποκατάσταση της R145 από κυστεΐνη εκθέτει μεγαλύτερη έκταση υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη, όπως προέκυψε από το πείραμα πρόσδεσης του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS στην αποE3 R145C συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου (και τις άλλες μεταλλάξεις). Η αυξημένη έκθεση υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη αποτελεί συνέπεια της αποσταθεροποίησης της μεταλλαγμένης R145C. Όταν η μικρότερη σε μήκος κυστεΐνη υποκαθιστά την αργινίνη, η αλληλεπίδραση μεταξύ έλικας 1 (Q41) και έλικας 4 (C145) δεν είναι τόσο αποτελεσματική και έχει ως αποτέλεσμα να μην «προστατεύεται» στερεοχημικά το εσωτερικό του πυρήνα της έλικας 4 (εικόνα 43). Η μετάλλαξη R145C οδηγεί επίσης σε αλλαγή του ηλεκτροστατικού δυναμικού της περιοχής της έλικας 4, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 44.



Εικόνα 43. Αλλαγές στο χώρο και το ηλεκτροστατικό δυναμικό όπως παρουσιάζονται στο χωροπληρωτικό μοντέλο της δομής της αποΕ3, έπειτα από υποκατάσταση της R145 από κυστεΐνη.

Τέλος, η θερμοδυναμική σταθεροποίηση της αποΕ έπειτα από την εισαγωγή της μετάλλαξης K146E μπορεί να σχετίζεται με την αλλαγή στο ηλεκτροστατικό δυναμικό της περιοχής (εικόνα 44). Στην περιοχή πρόσδεσης στον LDL υποδοχέα περιλαμβάνονται τουλάχιστον πέντε γειτονικά, θετικά φορτισμένα αμινοξέα, τα οποία αν και αλληλεπιδρούν με αμινοξέα της καρβοξυ-τελικής περιοχής δεν παύουν να βρίσκονται σε ένα έντονα θετικά φορτισμένο περιβάλλον. Η υποκατάσταση ενός από αυτά με γλουταμινικό οξύ (K146E) μπορεί να συντελεί στην εξισορρόπηση του συνολικού ηλεκτροστατικού δυναμικού της περιοχής, προσδίδοντας δομική σταθερότητα στο μόριο.



Εικόνα 44. Αλλαγές στο χώρο και το ηλεκτροστατικό δυναμικό όπως παρουσιάζονται στο χωροπληρωτικό μοντέλο της δομής της αποΕ3, έπειτα από υποκατάσταση της K146 από γλουταμινικό οξύ.

Το γεγονός ότι και οι τρεις μελετηθείσες μεταλλάξεις βρίσκονται σε ένα περιβάλλον οριοθετημένο και προστατευμένο από την καρβοξυ-τελική περιοχή μπορεί να σχετίζεται με το μικρό μέγεθος των παρατηρούμενων αποκλίσεων στις βιοφυσικές παραμέτρους μεταξύ των μεταλλάξεων και της αποΕ3 αγρίου τύπου. Οι μικρές, αλλά στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις

στις θερμοδυναμικές παραμέτρους που παρατηρήθηκαν, υποδηλώνουν πως η κάθε μετάλλαξη επιδρά με διαφορετικό τρόπο στη συνολική θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης, οδηγώντας είτε σε σταθεροποίηση αυτής (E3 K146E), ή σε αποσταθεροποίηση (R136S και R145C) συγκριτικά με την αποE3 αγρίου τύπου. Ανεξάρτητα από την αύξηση ή μείωση στη σταθερότητα των μεταλλαγμένων μορφών, καθώς και το μικρό μέγεθος της μεταβολής, η εισαγωγή μιας μετάλλαξης στο μόριο της απολιποπρωτεΐνης Ε που διαταράσει τη δομική πλαστικότητα του μορίου είναι καθοριστική για τη φυσιολογική λειτουργία της. Ωστόσο, το μέγεθος και το μοτίβο των αλλαγών, που δεν ακολουθεί μία κοινή κατεύθυνση και για τις τρεις μεταλλάξεις, υποδεικνύουν ότι οι βιοφυσικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν μπορεί να μην αποτελούν τον πλέον καθοριστικό παράγοντα που οδηγεί στην εμφάνιση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ.

#### 8.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομήςλειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 που σχετίζονται με τη νόσο ΛΠΣ συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Αν και οι μεταλλάξεις αποΕ Sendai (R145P), Chicago (R147P) και Osaka (R158P) σχετίζονται με την ανάπτυξη ΛΠΣ, ωστόσο δεν έχει διαπιστωθεί πώς ακριβώς οι μεταλλαγμένες αποΕ σχετίζονται με την εναπόθεση λιποπρωτεϊνών στο σπείραμα.

Σε θερμοκρασία 37°C, οι τρεις μεταλλάξεις ήταν μερικώς αποδιπλωμένες συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου, όπως προέκυψε από τη μελέτη της θερμικής τους αποδιάταξης. Αποσταθεροποίηση της αμινο-τελικής περιοχής, αλλά και της ευρύτερης δομής των μεταλλαγμένων μορφών σε σχέση με την αποΕ3 αγρίου τύπου παρατηρήθηκε επίσης από τη μελέτη της χημικής αποδιάταξης των μορφών της αποΕ3. Η αλλοίωση στη δομή της αποΕ3 σαν συνέπεια της εισαγωγής των μεταλλάξεων R145P, R147P και R158P στο μόριό της διαφαίνεται επίσης από τη σημαντικά μειωμένη ελικότητα των μεταλλαγμένων μορφών της συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου. Τα πειράματα πρόσδεσης του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS στις υδρόφοβες περιοχές της αποΕ3 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της, υπέδειξαν πως οι μεταλλαγμένες αποΕ3 εκθέτουν στο διαλύτη μεγαλύτερη επιφάνεια του υδρόφοβου πυρήνα τους συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου, γεγονός που συνηγορεί με την παρατήρηση πως η αμινο-τελική περιοχή των μεταλλάξεων (και ιδιαίτερα των R147P και R158P) είναι μερικώς αποδιατεταγμένη υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η αυξημένη τάση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ3 για συσσωμάτωση, τόσο σε ελεύθερη λιπιδίων (σχήμα 25), όσο και εντός λιποπρωτεϊνών κατάσταση (έπειτα από επώαση με τη φωσφολιπάση Α2, σχήμα 35) μπορεί να σχετίζεται με το σχηματισμό και εναπόθεση λιποπρωτεϊνικών θρόμβων στο σπείραμα των ασθενών που φέρουν τις μεταλλάξεις αυτές στο μόριο της αποΕ3.

Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις προσδίδουν στην αποΕ3 δομή που προσομοιάζει με «molten globule» και πιθανά συντελούν στη διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας της. Η δομή «molten globule» των μεταλλάξεων της αποΕ3 μπορεί να μοιάζει με τη δομή του ενδιαμέσου της αποΕ4 (παρ. 2.5.2), όπου η δομή της αμινο-τελικής περιοχής είναι λίγο πιο ανοιχτή και ο υδρόφοβος πυρήνας της εκτίθεται στο διαλύτη. Η σαφής επίδραση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με ΛΠΣ στη δομή της αποΕ3 αντιδιαστέλλονται προς τις μικρές διαταραχές που προκαλούν στη δομή της αποΕ3 οι μεταλλάξεις- R145C, K146E και R136Sπου επίσης εδράζονται στην έλικα 4 της αμινο-τελικής περιοχής της και σχετίζονται με την ΥΛΠ III (παρ. 7.1-7.1.9).

Είναι ενδιαφέρον πως η μερική αποδίπλωση της αμινο-τελικής περιοχής ενισχύει την κινητική των αλληλεπιδράσεων της αποΕ3 με τα φωσφολιπιδικά κυστίδια, γεγονός που υποδεικνύει την αναγκαιότητα αποδιάταξης της αμινο-τελικής περιοχής κατά το σχηματισμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Μία τέτοια αλλαγή μπορεί να είναι καθοριστική για τη λειτουργία της αποΕ, καθώς μειώνει μόνο ένα κινητικό συστατικό του πολύπλοκου μοριακού συμπλέγματος των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, πιθανά παρόμοιων με αυτά που παρουσιάζονται στο σχήμα 34. Στην παράγραφο 2.5.2 περιγράφεται αντίστοιχη παρατήρηση επιτάχυνσης της κινητικής αναμόρφωσης λιπιδίων έπειτα από την εισαγωγή μεταλλάξεων που αποσταθεροποιούν το μόριο της απολιποφορίνης III, ενός μορίου με δομή αντίστοιχη αυτής της αποΕ, που επίσης περιέρχεται από κατάσταση «molten globule».

Οι νεφρικές νόσοι χαρακτηρίζονται συνήθως από την παρουσία φλεγμονής στους νεφρούς. Στις φλεγμαίνουσες περιοχές παρατηρείται αυξημένη δραστικότητα πεπτιδασών. Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα με το γεγονός πως στη ΛΠΣ λαμβάνει χώρα συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών θρόμβων στο νεφρικό σπείραμα, μελετήσαμε κατά πόσο η αγρίου τύπου αποΕ3 και οι μεταλλαγμένες μορφές της είναι επιρρεπείς σε πρωτεόλυση. Οι μεταλλαγμένες αποΕ3 βρέθηκαν περισσότερο επιρρεπείς σε πρωτεόλυση, τόσο σε ελεύθερη λιπιδίων όσο και εντός λιποπρωτεϊνών κατάσταση, συγκριτικά με την αποΕ3 αγρίου τύπου.

Από τις τρεις μεταλλάξεις που μελετήθηκαν, η E3 R158P αξίζει ιδιαίτερης προσοχής καθώς εδράζεται στη θέση εκείνη που διαφοροποιεί την αποE3 από την αποE2 ισομορφή (που αντιστοιχεί στην E3 R158C). Η αποE2 προκύπτει από την έκφραση του κοινού στον ανθρώπινο πληθυσμό αλληλόμορφου ε2 και αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για τη νόσο ΥΛΠΙΙΙ (παρ. 4.1.3). Το γεγονός πως και οι δύο μεταλλάξεις, R158P και R158C, μπορεί να είναι παθογενείς στους ανθρώπους υπογραμμίζει τη σημασία της θέσης αυτής για τη λειτουργία της αποΕ. Ωστόσο, η ύπαρξη του κοινού πολυμορφισμού της αποΕ2 υποδηλώνει πως σε κάποιες περιπτώσεις, η αντικατάσταση του αμινοξέος στη θέση 158 μπορεί να ευνοεί τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Συνολικά, αναλύσαμε την επίδραση τριών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την παθογένεση της ΛΠΣ, στη δομή και θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου της αποΕ3. Ανακαλύψαμε πως οι μεταλλάξεις επάγουν σημαντικές αλλοιώσεις στο προφίλ αναδίπλωσης της αποΕ3 και πιθανά εκτείνονται σε όλη την αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης συντελώντας στο σχηματισμό μίας δομής που προσομοιάζει σε «molten globule». Οι δομικές και θερμοδυναμικές μεταβολές οδηγούν σε ανωμαλίες στην πρόσδεση λιπιδίων καθώς και σε αυξημένη συσσωμάτωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελαττωματικών λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.

### 8.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομήςλειτουργίας μεταλλαγμένων μορφών της αποΕ που σχετίζονται με θεραπευτική δράση έναντι της υπερτριγλυκεριδαιμίας συγκριτικά με την αντίστοιχη αποΕ αγρίου τύπου.

Μελετήσαμε αν οι βελτιωμένες βιολογικές λειτουργίες που παρουσιάζει η αποΕ έπειτα από την εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης L261A/W264A/F265A μπορούν να επηρεάσουν τα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά του μορίου. Η δραστική μείωση της περιεχόμενης ελικότητας στις μεταλλαγμένες αποΕ2 και αποΕ4, σε συνδυασμό με αλλαγές στο προφίλ χημικής αποδιάταξης, υποδεικνύουν πως οι μεταλλάξεις πράγματι διαταράσσουν τη δομή και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της αποΕ με τέτοιο τρόπο που επηρεάζεται η συνολική δομή του μορίου και όχι μόνο η περιοχή όπου εισήχθη η τριπλή μετάλλαξη. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως αντίστοιχες αλλαγές στο ποσοστό α-έλικας και στο προφίλ χημικής αποδιάταξης έχουν περιγραφεί από τους Chroni et al. που μελέτησαν τη δομή της αποΕ4, στην οποία υπολειπόταν η περιοχή 260-299. Η παρατήρηση αντίστοιχων θερμοδυναμικών αλλαγών στις δύο παραπάνω περιπτώσεις μπορεί να υποδηλώνει πως η απουσία των αμινοξέων 261-265 (τα οποία περιλαμβάνονται στην ευρύτερη περιοχή 260-299 που αποκόπηκε από την αποΕ) είναι εκείνη που έστω και εν μέρει συντελεί στη μείωση της ελικότητας των μορίων και τα σταθεροποιεί μερικώς έναντι χημικής αποδιάταξης [96].

Η αποΕ4 διαφέρει από την αποΕ3 τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Οι διαφορές που χαρακτηρίζουν τα δύο μόρια είναι συνέπεια των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της αμινο- και της καρβοξυ-τελικής περιοχής των μορίων· αλληλεπιδράσεων πολύ σημαντικών για τη φυσιολογική λειτουργία της αποΕ [8]. Το γεγονός πως κάποιες επιδράσεις της τριπλής μετάλλαξης L261A/W264A/F265A στο μόριο της αποΕ εξαρτώνται από την ισομορφή του μορίου (Ε2 έναντι Ε4) υποδηλώνουν πως η περιοχή 261-265 μπορεί να επηρεάσει τη θερμοδυναμική της αλληλεπίδρασης των δύο περιοχών πιθανά λόγω της άμεσης συμμετοχής των αμινοξέων 261-265 σε ατομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αμινοκαι καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΕ (εικόνα 41, παρ. 7.3).

Συνολικά, η σημασία της διαμόρφωσης των αμινοξέων 261-265 για την αλληλεπίδραση των δύο περιοχών της αποΕ, καθώς και η αναγκαιότητα μετάλλαξης της θρυπτοφάνης στη θέση 264 προς σταθεροποίηση της δομής της αποΕ υποδεικνύουν πως η εισαγωγή της τριπλής μετάλλαξης στις θέσεις 261, 264 και 265 επηρεάζει σημαντικά την οργάνωση της συνολικής δομής και την πλαστικότητα του μορίου της αποΕ.

### 8.4 Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της σχέσης δομήςλειτουργίας μεταλλάξεων της αποΕ που σχετίζονται με δυσλιπιδαιμίες και εξαγωγή συμπερασμάτων.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήσαμε να προσεγγίσουμε τη μοναδική σχέση δομής-λειτουργίας του μορίου της αποΕ. Η αποΕ συγκεντρώνει ιδιαίτερες θερμοδυναμικές ιδιότητες και δομική πλαστικότητα, χαρακτηριστικά που της προσδίδουν την απαραίτητη ευελιξία να περιέρχεται από πλήθος διαμορφώσεων κατά τη μετάβασή της από την «ελεύθερη λιπιδίων» στην «εντός λιποπρωτεϊνών» μορφή και κατά συνέπεια, την ικανότητα να αλληλεπιδρά με υποδοχείς και ένζυμα. Εφ' όσον το μόριο της αποΕ συγκεντρώνει τα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά που αποτελούν αναγκαία συνθήκη για την υιοθέτηση «λειτουργικής» δομής στο χώρο και την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια, μπορεί πλέον να επιτύχει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στον οργανισμό, δηλαδή τη συμμετοχή της στη ρύθμιση και διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης και των λιπιδίων στον οργανισμό.

Αποκλίσεις, έστω και μικρές, από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της αποΕ μπορεί να οδηγήσουν σε «κλείδωμα» της δομής της σε διαμορφώσεις «μη λειτουργικές» ή και να επάγουν τη μετάβαση της αποΕ σε διαμόρφωση όχι μόνο λειτουργική, αλλά και «βελτιωμένη έναντι της φυσιολογικής». Οι αποκλίσεις στα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά της αποΕ- που προσομοιάζουν σε αυτά της δομής «molten globule»- μπορεί να είναι συνέπεια της εισαγωγής κάποιας μετάλλαξης στο μόριό της, ακόμη και σημειακής. Είναι μάλιστα χαρακτηριστική η διαφοροποίηση στη λειτουργία κάθε ισομορφής της αποΕ και η συσχέτισή της με διαφορετικές παθογενείς καταστάσεις, σαν συνέπεια αλλαγής ενός μόνο αμινοξέος που διαφοροποιεί την Ε2 ισομορφή από την Ε3, και την Ε3 από την Ε4.

Στην παρούσα διατριβή κάναμε την υπόθεση πως η αλλοιωμένη ή βελτιωμένη λειτουργικότητα της αποΕ είναι συνέπεια των δομικών και θερμοδυναμικών αλλαγών που επιφέρουν στο μόριό της μεταλλάξεις που σχετίζονται με την παθογένεια ή θεραπεία δυσλιπιδαιμιών, αντίστοιχα. Μελετήσαμε την επίδραση της εισαγωγής των μεταλλάξεων στη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα της αποΕ και προσπαθήσαμε να προσεγγίσουμε, όπου ήταν δυνατόν, κάποιο κοινό μηχανισμό που να διέπει την επίδραση ομάδας μεταλλάξεων στη δομή και συνεπώς στη λειτουργία της αποΕ. Από τις τρεις επιμέρους μελέτες που πραγματοποιήσαμε, όπου διερευνήθηκε η σχέση δομής-λειτουργίας της αποΕ έπειτα από την εισαγωγή μεταλλάξεων που σχετίζονται i) με ΥΛΠ ΙΙΙ, ii) με ΛΠΣ και iii) με θεραπευτική δράση έναντι υπερτριγλυκεριδαιμίας, καταλήξαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η εισαγωγή μετάλλαξης στο μόριο της αποΕ, ακόμη και σημειακής, μπορεί να επάγει δραματικές αλλαγές στη θερμοδυναμική σταθερότητα, στη δομική ακεραιότητα και πλαστικότητα του μορίου.
- Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στο μόριο της αποΕ μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την κατάσταση ολιγομερισμού της και κατά συνέπεια τη λειτουργία της.

- Το μέγεθος της επίδρασης μίας σημειακής μετάλλαξης στη δομική και λειτουργική οντότητα της αποΕ εξαρτάται από τη θέση στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη, καθώς και από το είδος της μετάλλαξης.
- Η εισαγωγή μίας μετάλλαξης, ακόμη και σημειακής, μπορεί να συντελέσει στην αποσταθεροποίηση της δομής όχι μόνο της περιοχής όπου εισήχθη η μετάλλαξη, αλλά και της ευρύτερης περιοχής του μορίου.
- Η θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της αποΕ που επάγεται από μερική αποδιάταξη της δομής της (δομή που προσομοιάζει σε «molten globule») σχετίζεται με ταχύτερη διαύγαση αιωρήματος λιπιδίων καθώς και με ευαισθησία σε πρωτεόλυση.
- Αλλαγές στη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα της «ελεύθερης λιπιδίων» μορφής της αποΕ οδηγούν στο σχηματισμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων με αλλοιωμένη δομή και χαρακτηριστικά.
- Ακόμη και μικρές μεταβολές στη θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΕ μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα του μορίου και συνδυαζόμενες με άλλους βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες να συντελέσουν στη συσχέτιση της μεταλλαγμένης αποΕ με παθολογικές καταστάσεις ή με βελτιωμένη λειτουργία της.

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 21: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος	
Alzheimer's Disease	Νόσος του Alzheimer	
ATP-binding cassette transporter A	Μεταφορέας με κασέτα δέσμευσης ΑΤΡ Α1	
ATP-binding cassette transporter G1	Μεταφορέας με κασέτα δέσμευσης ΑΤΡ G1	
Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού βοός	
Chylomicrons	Χυλομικρά	
Dipalmitoyl-phosphatidylcholine	Δι-παλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη	
Heat-shock	Θερμικό σοκ	
High Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας	
Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση της ραπανίδας	
Type III- Hyperlipoproteinemia	Υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ	
Hypertriglyceridemia	Υπερτριγλυκεριδαιμία	
Knock-out	Γενετικά απενεργοποιημένο	
LDL receptor	Υποδοχέας των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας	
LDLr Protein	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον LDL υποδοχέα	
Lipoprotein Glomerulopathy	Λιποπρωττεϊνική Σπειραματοπάθεια	
Molten globule state	Κατάσταση «χαλαρής» (μερικώς αποδιατεταγμένης) σφαίρας	
Phosphate buffered Saline	Διάλυμα φωσφορικών αλάτων	
Polyacrylamide gel electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου	
Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης	
Primers	Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές	
Scavenger Receptor class B type I	Υποδοχέας Εκκαθαριστής Τάξης Β, Τύπου Ι	
Separating gel	Πηκτή διαχωρισμού	
Serum free	Απουσία ορού	
SPR	Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων	
Stacking gel	Πηκτή επιστοίβασης	
Very Low Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας	
Western blot	Ανοσοαποτύπωση	

### ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 22: Πίνακας με συντμήσεις, αρκτικόλεξα και ακρωνύμια στα ελληνικά και στα αγγλικά.

Συντμήσεις στα ελληνικά		
ΑποΕ	Απολιποπρωτεΐνη Ε	
ΥΛΠ III	Υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ	
ΛΠΣ	Λιποπρωτεϊνική Σπειραματοπάθεια	
	Συντμήσεις, αρκτικόλεξα και ακρωνύμια στα αγγλικά	
A, Ala	Alanine	
C, Cys	Cysteine	
D, Asp	Aspartic acid	
E, Glu	Glutamic acid	
F, Phe	Phenylalanine	
G, Gly	Glycine	
H, His	Histidine	
I, Ile	Isoleucine	
K, Lys	Lysine	
L, Leu	Leucine	
M, Met	Methionine	
N, Asn	Asparagine	
P, Pro	Proline	
Q, Gln	Glutamine	
R, Arg	Arginine	
S, Ser	Serine	
T, Thr	Threonine	
V, Val	Valine	
W, Trp	Tryptophan	
Y, Tyr	Tyrosine	
ANS	1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid	
APP	Amyloid Precursor Protein	
APS	ammonium perosulfate	
BPB	Bromophenol blue	
CD	Circular Dichroism	

DLS	Dynamic Light Scattering
DMPC	Dimyristoyl-L-!-phosphatidylcholine
DMSO	Dimethylsulphoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EM	Electron Microscopy
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HLP III	Type III Hyperlipoproteinemia
HMWCK	High Molecular Weight Calibration Kit
HRP	HorseRadish Peroxidase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LCAT	Lecithin- Cholesterol Acylotransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPG	Lipoprotein Glomerulopathy
MTP	Microsomal Triglyceride Protein
MW	Molecular Weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRMSD	Normalized Root- Mean- Square Deviation
POPC	1-palmitoyl-2- oleoyl-L-phosphatidylcholine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Trx	Thioredoxine
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
wt	wild-type

### ΑΝΑΦΟΡΕΣ:

- 1. David L. Nelson, M.M.C., *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition.*
- 2. Zannis V.I. et al., *Lipoproteins and atherogenesis: Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*, ed. J.L. ed. 2004: Taylor & Francis. 111-174.
- 3. Wasan, K.M., et al., *Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery.* Nature reviews. Drug discovery, 2008. **7**(1): p. 84-99.
- 4. Fielding, C.J., V.G. Shore, and P.E. Fielding, *A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase*. Biochemical and biophysical research communications, 1972. **46**(4): p. 1493-8.
- 5. Chen, C.H. and J.J. Albers, *Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma.* Biochimica et biophysica acta, 1985. **836**(3): p. 279-85.
- 6. Krauss RM, H.P., Levy RI et al., *Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins.* Circ Res, 1973. **33**: p. 403-411.
- 7. Allan, C.M., et al., *Identification and characterization of a new human gene* (*APOC4*) *in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus.* Genomics, 1995. **28**(2): p. 291-300.
- 8. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, *Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS.* Journal of lipid research, 2009. **50 Suppl**: p. S183-8.
- 9. Zannis, V.I., D. Kardassis, and E.E. Zanni, *Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes.* Advances in human genetics, 1993. **21**: p. 145-319.
- 10. Zannis, V.I., et al., *Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E.* The Journal of biological chemistry, 1984. **259**(9): p. 5495-9.
- 11. Wernette-Hammond, M.E., et al., *Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194.* The Journal of biological chemistry, 1989. **264**(15): p. 9094-101.
- 12. Greenow, K., N.J. Pearce, and D.P. Ramji, *The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis.* Journal of molecular medicine, 2005. **83**(5): p. 329-42.
- 13. Elshourbagy, N.A., et al., *Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(1): p. 203-7.
- 14. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein.* Annual review of genomics and human genetics, 2000. **1**: p. 507-37.

- 15. Mensenkamp, A.R., et al., *Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver.* The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(50): p. 35711-8.
- 16. Heeren, J., W. Weber, and U. Beisiegel, *Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation.* Journal of cell science, 1999. **112 ( Pt 3)**: p. 349-59.
- Heeren, J., et al., Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. The Journal of biological chemistry, 2001. 276(45): p. 42333-8.
- 18. Duan, H., D. Gu, and T. Mazzone, Sterols and inhibitors of sterol transport modulate the degradation and secretion of macrophage ApoE: requirement for the C-terminal domain. Biochimica et biophysica acta, 2000. **1484**(2-3): p. 142-50.
- 19. Fazio, S., M.F. Linton, and L.L. Swift, *The cell biology and physiologic relevance of ApoE recycling.* Trends in cardiovascular medicine, 2000. **10**(1): p. 23-30.
- Swift, L.L., et al., A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. The Journal of biological chemistry, 2001. 276(25): p. 22965-70.
- 21. Farkas, M.H., et al., *The recycling of apolipoprotein E and its amino-terminal 22 kDa fragment: evidence for multiple redundant pathways.* Journal of lipid research, 2004. **45**(8): p. 1546-54.
- 22. Lund-Katz, S. and M.C. Phillips, *High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport.* Sub-cellular biochemistry, 2010. **51**: p. 183-227.
- 23. Ladu, M.J., et al., *Lipoproteins in the central nervous system.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **903**: p. 167-75.
- 24. Hirsch-Reinshagen, V. and C.L. Wellington, *Cholesterol metabolism, apolipoprotein E, adenosine triphosphate-binding cassette transporters, and Alzheimer's disease.* Current opinion in lipidology, 2007. **18**(3): p. 325-32.
- 25. Kim, W.S., et al., *Role of ABCG1 and ABCA1 in regulation of neuronal cholesterol efflux to apolipoprotein E discs and suppression of amyloid-beta peptide generation.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(5): p. 2851-61.
- 26. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond.* Current opinion in lipidology, 1999. **10**(3): p. 207-17.
- 27. Slezak, M. and F.W. Pfrieger, *New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis.* Trends in neurosciences, 2003. **26**(10): p. 531-5.
- 28. Jiang, Q., et al., *ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta.* Neuron, 2008. **58**(5): p. 681-93.

- 29. Mahley, R.W., Y. Huang, and K.H. Weisgraber, *Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport.* The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(5): p. 1226-9.
- 30. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.* Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
- Heeren, J., U. Beisiegel, and T. Grewal, *Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006. 26(3): p. 442-8.
- 32. Hasty, A.H., et al., *The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I.* Journal of lipid research, 2005. **46**(7): p. 1433-9.
- 33. Kockx, M., et al., *Apolipoprotein A-I-stimulated apolipoprotein E secretion from human macrophages is independent of cholesterol efflux.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(25): p. 25966-77.
- 34. Braun, N.A., et al., *Intracellular trafficking of recycling apolipoprotein E in Chinese hamster ovary cells.* Journal of lipid research, 2006. **47**(6): p. 1176-86.
- 35. Huang, Z.H., M.L. Fitzgerald, and T. Mazzone, *Distinct cellular loci for the ABCA1-dependent and ABCA1-independent lipid efflux mediated by endogenous apolipoprotein E expression.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006. **26**(1): p. 157-62.
- 36. Kockx, M., W. Jessup, and L. Kritharides, *Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008. **28**(6): p. 1060-7.
- 37. Kypreos, K.E. and V.I. Zannis, *Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT.* The Biochemical journal, 2007. **403**(2): p. 359-67.
- 38. Zannis, V.I., et al., *Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models.* Annals of medicine, 2008. **40 Suppl 1**: p. 14-28.
- 39. Rader, D.J., *High-density lipoproteins and atherosclerosis.* The American journal of cardiology, 2002. **90**(8A): p. 62i-70i.
- 40. Li, X., et al., *Domains of apoE required for binding to apoE receptor 2 and to phospholipids: implications for the functions of apoE in the brain.* Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10406-17.
- 41. Shimano, H., et al., *Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. Accelerated clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B.* The Journal of clinical investigation, 1992. **90**(5): p. 2084-91.
- 42. Plump, A.S., et al., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein *E*-deficient mice created by homologous recombination in *ES* cells. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.

- 43. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E.* Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
- 44. Nikoulin, I.R. and L.K. Curtiss, *An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo.* The Journal of clinical investigation, 1998. **101**(1): p. 223-34.
- 45. Boisvert, W.A., J. Spangenberg, and L.K. Curtiss, *Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation.* The Journal of clinical investigation, 1995. **96**(2): p. 1118-24.
- 46. Raffai, R.L., S.M. Loeb, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005. **25**(2): p. 436-41.
- 47. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function.* Trends in biochemical sciences, 2006. **31**(8): p. 445-54.
- 48. Wetterau, J.R., et al., *Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains.* J Biol Chem, 1988. **263**(13): p. 6240-8.
- Aggerbeck, L.P., et al., Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. J Biol Chem, 1988.
   263(13): p. 6249-58.
- 50. Wilson, C., et al., *Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E.* Science, 1991. **252**(5014): p. 1817-22.
- 51. Weisgraber, K.H., *Apolipoprotein E: structure-function relationships.* Advances in protein chemistry, 1994. **45**: p. 249-302.
- 52. Morrow, J.A., et al., *Effect of arginine 172 on the binding of apolipoprotein E to the low density lipoprotein receptor.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(4): p. 2576-80.
- 53. Huang, R.Y., et al., *Hydrogen/deuterium exchange and electron-transfer dissociation mass spectrometry determine the interface and dynamics of apolipoprotein E oligomerization.* Biochemistry, 2011. **50**(43): p. 9273-82.
- 54. Fan, D., et al., *A monomeric human apolipoprotein E carboxyl-terminal domain.* Biochemistry, 2004. **43**(17): p. 5055-64.
- 55. Chen, J., Q. Li, and J. Wang, *Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(36): p. 14813-8.
- 56. Sivashanmugam, A. and J. Wang, A unified scheme for initiation and conformational adaptation of human apolipoprotein *E N*-terminal domain upon lipoprotein binding and for receptor binding activity. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(21): p. 14657-66.

- 57. Fisher, C.A., V. Narayanaswami, and R.O. Ryan, *The lipid-associated conformation of the low density lipoprotein receptor binding domain of human apolipoprotein E.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(43): p. 33601-6.
- 58. Newhouse, Y., C. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apolipoprotein E-containing lipoprotein particles.* Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2005. **61**(Pt 11): p. 981-4.
- Peters-Libeu, C.A., et al., *Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine*. The Journal of biological chemistry, 2006. 281(2): p. 1073-9.
- 60. Nguyen, D., et al., *Molecular mechanism of apolipoprotein E binding to lipoprotein particles.* Biochemistry, 2009. **48**(13): p. 3025-32.
- 61. Hatters, D.M., et al., *Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms.* The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(40): p. 34288-95.
- 62. Narayanaswami, V., et al., *Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein e in discoidal high density lipoprotein particles.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(14): p. 14273-9.
- 63. Drury, J. and V. Narayanaswami, *Examination of lipid-bound conformation of apolipoprotein E4 by pyrene excimer fluorescence.* The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(15): p. 14605-10.
- 64. Ptitsyn, O.B., *Molten globule and protein folding.* Advances in protein chemistry, 1995. **47**: p. 83-229.
- 65. Morrow, J.A., et al., *Apolipoprotein E4 forms a molten globule. A potential basis for its association with disease.* The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(52): p. 50380-5.
- Segrest, J.P., et al., *The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function.* Journal of lipid research, 1992.
   33(2): p. 141-66.
- Wang, J., B.D. Sykes, and R.O. Ryan, *Structural basis for the conformational adaptability of apolipophorin III, a helix-bundle exchangeable apolipoprotein.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(3): p. 1188-93.
- Weers, P.M., et al., Role of buried polar residues in helix bundle stability and lipid binding of apolipophorin III: destabilization by threonine 31. Biochemistry, 2005. 44(24): p. 8810-6.
- 69. Dong, L.M., et al., *Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia.* Nature structural biology, 1996. **3**(8): p. 718-22.

- Weisgraber, K.H., Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. Journal of lipid research, 1990. 31(8): p. 1503-11.
- 71. Dong, L.M., et al., *Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms.* The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(35): p. 22358-65.
- 72. Weisgraber, K.H. and R.W. Mahley, *Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1996. **10**(13): p. 1485-94.
- 73. Dong, L.M. and K.H. Weisgraber, *Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins.* The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(32): p. 19053-7.
- Raffai, R.L., et al., Introduction of human apolipoprotein E4 "domain interaction" into mouse apolipoprotein E. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(20): p. 11587-91.
- 75. Ajees, A.A., et al., *Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(7): p. 2126-31.
- Borhani, D.W., J.A. Engler, and C.G. Brouillette, Human apolipoprotein A-I: structure determination and analysis of unusual diffraction characteristics. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1999. 55(Pt 12): p. 2013-21.
- 77. Gursky, O., Crystal structure of Delta(185-243)ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil. Journal of molecular biology, 2013. **425**(1): p. 1-16.
- 78. Acharya, P., et al., *Comparison of the stabilities and unfolding pathways of human apolipoprotein E isoforms by differential scanning calorimetry and circular dichroism.* Biochimica et biophysica acta, 2002. **1584**(1): p. 9-19.
- 79. Garai, K., et al., *Structural differences between apolipoprotein E3 and E4 as measured by (19)F NMR.* Protein science : a publication of the Protein Society, 2010. **19**(1): p. 66-74.
- 80. Chou, C.Y., et al., *Structural and functional variations in human apolipoprotein E3 and E4.* The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(19): p. 13333-44.
- Segall, M.L., et al., *Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization.* Journal of lipid research, 2002.
  43(10): p. 1688-700.
- 82. Zhang, Y., et al., *A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E.* Biochemistry, 2007. **46**(37): p. 10722-32.

- 83. Ji, Z.S., et al., *Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide: lysosomal stability and neurodegeneration.* The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(5): p. 2683-92.
- Whitmore, L. and B.A. Wallace, *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases.* Biopolymers, 2008. **89**(5): p. 392-400.
- 85. Holzwarth, G. and P. Doty, *The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides.* Journal of the American Chemical Society, 1965. **87**: p. 218-28.
- Adler, A.J., N.J. Greenfield, and G.D. Fasman, *Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides.* Methods in enzymology, 1973.
  27: p. 675-735.
- Sreerama, N. and R.W. Woody, *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set.* Analytical biochemistry, 2000. 287(2): p. 252-60.
- 88. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data.* Nucleic acids research, 2004. **32**(Web Server issue): p. W668-73.
- 89. Chen, Y.H., J.T. Yang, and H.M. Martinez, *Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion.* Biochemistry, 1972. **11**(22): p. 4120-31.
- 90. Greenfield, N. and G.D. Fasman, *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation.* Biochemistry, 1969. **8**(10): p. 4108-16.
- 91. Georgiadou, D., et al., *Biophysical analysis of apolipoprotein E3 variants linked with development of type III hyperlipoproteinemia.* PloS one, 2011. **6**(11): p. e27037.
- 92. Morrow, J.A., et al., *Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain.* Biochemistry, 2000. **39**(38): p. 11657-66.
- 93. Clement-Collin, V., et al., *The structure of human apolipoprotein E2, E3 and E4 in solution. 2. Multidomain organization correlates with the stability of apoE structure.* Biophysical chemistry, 2006. **119**(2): p. 170-85.
- 94. John, D.M. and K.M. Weeks, *van't Hoff enthalpies without baselines*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2000. **9**(7): p. 1416-9.
- 95. Tanaka, M., et al., *Effect of carboxyl-terminal truncation on structure and lipid interaction of human apolipoprotein E4.* Biochemistry, 2006. **45**(13): p. 4240-7.
- 96. Chroni, A., et al., *Biophysical analysis of progressive C-terminal truncations of human apolipoprotein E4: insights into secondary structure and unfolding properties.* Biochemistry, 2008. **47**(35): p. 9071-80.

- 97. Eftink, M.R., *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins.* Biophysical Journal, 1994. **66**(2 Pt 1): p. 482-501.
- 98. Jonas, A., A. Steinmetz, and L. Churgay, *The number of amphipathic alphahelical segments of apolipoproteins A-I, E, and A-IV determines the size and functional properties of their reconstituted lipoprotein particles.* The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(3): p. 1596-602.
- 99. Shirley, B.A., *Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves.* Methods in molecular biology, 1995. **40**: p. 177-90.
- Liu, H. and J.H. Naismith, An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. BMC biotechnology, 2008.
  8: p. 91.
- Fisher, C.A. and R.O. Ryan, *Lipid binding-induced conformational changes in the N-terminal domain of human apolipoprotein E.* Journal of lipid research, 1999.
   **40**(1): p. 93-9.
- 102. Wetterau, J.R., et al., *Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains.* The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(13): p. 6240-8.
- 103. Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition ed. 2006: Springer.
- 104. Saito, H., et al., *Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E.* The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(42): p. 40723-9.
- 105. Narayanaswami, V., S.S. Szeto, and R.O. Ryan, *Lipid association-induced N-and C-terminal domain reorganization in human apolipoprotein E3.* The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(41): p. 37853-60.
- 106. Chou, C.Y., et al., *Structural variation in human apolipoprotein E3 and E4: secondary structure, tertiary structure, and size distribution.* Biophysical journal, 2005. **88**(1): p. 455-66.
- 107. Sakamoto, T., et al., *Contributions of the carboxyl-terminal helical segment to the self-association and lipoprotein preferences of human apolipoprotein E3 and E4 isoforms.* Biochemistry, 2008. **47**(9): p. 2968-77.
- 108. Tscharnuter W., *Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers, Editor. 2000, John Wiley & Sons Ltd: Chichester. p. 5469-5485.
- 109. Malvern Instruments Ltd., *Zetasizer µV User Manual*. 2010.
- 110. Innerarity, T.L., R.E. Pitas, and R.W. Mahley, *Binding of arginine-rich (E)* apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. The Journal of biological chemistry, 1979. **254**(10): p. 4186-90.

- 111. Lu, B., J.A. Morrow, and K.H. Weisgraber, *Conformational reorganization of the four-helix bundle of human apolipoprotein E in binding to phospholipid.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(27): p. 20775-81.
- 112. Oorni, K., et al., Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(44): p. 29127-34.
- 113. Eichner, J.E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review.* American journal of epidemiology, 2002. **155**(6): p. 487-95.
- 114. Kolovou, G., D. Daskalova, and D.P. Mikhailidis, *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis.* Angiology, 2003. **54**(1): p. 59-71.
- 115. Lahiri, D.K., K. Sambamurti, and D.A. Bennett, Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. Neurobiology of aging, 2004. 25(5): p. 651-60.
- 116. Raber, J., Y. Huang, and J.W. Ashford, *ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology.* Neurobiology of aging, 2004. **25**(5): p. 641-50.
- 117. Song, Y., M.J. Stampfer, and S. Liu, *Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease.* Annals of internal medicine, 2004. **141**(2): p. 137-47.
- 118. Georgiadou, D., et al., *Allele-dependent thermodynamic and structural perturbations in ApoE variants associated with the correction of dyslipidemia and formation of spherical ApoE-containing HDL particles.* Atherosclerosis, 2012.
- 119. Stengard, J.H., K.M. Weiss, and C.F. Sing, An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. Human genetics, 1998. **103**(2): p. 234-41.
- 120. Humphries, S.E., et al., *Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study.* Lancet, 2001. **358**(9276): p. 115-9.
- 121. Karvonen, J., et al., *Apolipoprotein E polymorphism affects carotid artery atherosclerosis in smoking hypertensive men.* Journal of hypertension, 2002. **20**(12): p. 2371-8.
- 122. Talmud, P.J., et al., *No APOEepsilon4 effect on coronary heart disease risk in a cohort with low smoking prevalence: the Whitehall II study.* Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 105-12.
- 123. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall.* Journal of lipid research, 2009. **50 Suppl**: p. S156-61.

- 124. Kypreos, K.E., et al., Generation of a recombinant apolipoprotein E variant with improved biological functions: hydrophobic residues (LEU-261, TRP-264, PHE-265, LEU-268, VAL-269) of apoE can account for the apoE-induced hypertriglyceridemia. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(8): p. 6276-84.
- 125. Havel, R.J., et al., *Radioimmunoassay of human arginine-rich apolipoprotein, apoprotein E. Concentration in blood plasma and lipoproteins as affected by apoprotein E-3 deficiency.* The Journal of clinical investigation, 1980. **66**(6): p. 1351-62.
- 126. Kypreos, K.E. and V.I. Zannis, *LDL receptor deficiency or apoE mutations prevent remnant clearance and induce hypertriglyceridemia in mice.* Journal of lipid research, 2006. **47**(3): p. 521-9.
- 127. Kypreos, K.E., et al., Domains of apolipoprotein E contributing to triglyceride and cholesterol homeostasis in vivo. Carboxyl-terminal region 203-299 promotes hepatic very low density lipoprotein-triglyceride secretion. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(23): p. 19778-86.
- 128. Gorshkova, I.N., et al., *Biophysical properties of apolipoprotein E4 variants: implications in molecular mechanisms of correction of hypertriglyceridemia.* Biochemistry, 2008. **47**(47): p. 12644-54.
- 129. Drosatos, K., K.E. Kypreos, and V.I. Zannis, *Residues Leu261, Trp264, and Phe265 account for apolipoprotein E-induced dyslipidemia and affect the formation of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein.* Biochemistry, 2007. **46**(33): p. 9645-53.
- 130. Mahley, R.W., Y. Huang, and S.C. Rall, Jr., *Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes.* Journal of lipid research, 1999. **40**(11): p. 1933-49.
- Breslow, J.L., et al., Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2. Journal of lipid research, 1982. 23(8): p. 1224-35.
- 132. Sharma, D. and S. Thirkannad, *Palmar xanthoma-an indicator of a more sinister problem.* Hand, 2010. **5**(2): p. 210-2.
- 133. Manchanda, Y. and V.K. Sharma, *Intertriginous xanthomas: a marker of homozygous type IIa hyperlipoproteinemia.* International journal of dermatology, 2004. **43**(9): p. 676-7.
- 134. Mahley R, W.R.C.J., *Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism*. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, eds. New York: McGraw-Hill. ed. 2001.
- 135. Wardell, M.R., et al., *Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg----Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia.* The Journal of clinical investigation, 1987. **80**(2): p. 483-90.

- 136. Lalazar, A., et al., *Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions.* The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(8): p. 3542-5.
- 137. Pocovi, M., et al., *Incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia is associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136-->Ser) variant in multigenerational pedigree studies.* Atherosclerosis, 1996. **122**(1): p. 33-46.
- Rall, S.C., Jr., et al., Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. 79(15): p. 4696-700.
- 139. de Villiers, W.J., et al., *The apolipoprotein E2 (Arg145Cys) mutation causes autosomal dominant type III hyperlipoproteinemia with incomplete penetrance.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1997. **17**(5): p. 865-72.
- 140. Libeu, C.P., et al., *New insights into the heparan sulfate proteoglycan-binding activity of apolipoprotein E.* The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(42): p. 39138-44.
- 141. Mann, W.A., et al., *Apolipoprotein E-1Harrisburg: a new variant of apolipoprotein E dominantly associated with type III hyperlipoproteinemia.* Biochimica et biophysica acta, 1989. **1005**(3): p. 239-44.
- 142. Moriyama, K., et al., *Apolipoprotein E1 Lys-146----Glu with type III hyperlipoproteinemia.* Biochimica et biophysica acta, 1992. **1128**(1): p. 58-64.
- 143. Mann, W.A., et al., Dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. Pathophysiological insights derived from the structural and kinetic characteristics of ApoE-1 (Lys146-->Glu). The Journal of clinical investigation, 1995. **96**(2): p. 1100-7.
- 144. Rall, S.C., Jr. and R.W. Mahley, *The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders*. Journal of internal medicine, 1992. **231**(6): p. 653-9.
- 145. Chappell, D.A., *High receptor binding affinity of lipoproteins in atypical dysbetalipoproteinemia (type III hyperlipoproteinemia).* The Journal of clinical investigation, 1989. **84**(6): p. 1906-15.
- 146. Ji, Z.S., S. Fazio, and R.W. Mahley, Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. The Journal of biological chemistry, 1994. 269(18): p. 13421-8.
- 147. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
- 148. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(15): p. 5644-51.

- Holtzman, D.M., et al., Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(6): p. 2892-7.
- 150. Esteban, J.A., *Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide.* Trends in neurosciences, 2004. **27**(1): p. 1-3.
- 151. Nelson, P.T., et al., *Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity.* Journal of neuropathology and experimental neurology, 2007. **66**(12): p. 1136-46.
- 152. Zhong, N. and K.H. Weisgraber, *Understanding the basis for the association of apoE4 with Alzheimer's disease: opening the door for therapeutic approaches.* Current Alzheimer research, 2009. **6**(5): p. 415-8.
- 153. Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen, *ER stress and neurodegenerative diseases*. Cell death and differentiation, 2006. **13**(3): p. 385-92.
- 154. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, *Alzheimer's disease*. The New England journal of medicine, 2010. **362**(4): p. 329-44.
- 155. Tesseur, I., et al., *Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice.* The American journal of pathology, 2000. **156**(3): p. 951-64.
- 156. Brecht, W.J., et al., Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2004. 24(10): p. 2527-34.
- 157. Huang, Y., et al., Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(15): p. 8838-43.
- 158. Saito, T., et al., *Etiological significance of apolipoprotein E mutations in lipoprotein glomerulopathy.* Trends in cardiovascular medicine, 2002. **12**(2): p. 67-70.
- 159. Oikawa, S., et al., *Abnormal lipoprotein and apolipoprotein pattern in lipoprotein glomerulopathy*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 1991. **18**(5): p. 553-8.
- 160. Saito T, S.H., Oikawa S, *Lipoprotein glomerulopathy: a new aspect of lipid induced glomerular injury.* Nephrology 1995. **1**: p. 17-24.
- 161. Saito, T., et al., *Lipoprotein glomerulopathy: renal lipidosis induced by novel apolipoprotein E variants.* Nephron, 1999a. **83**(3): p. 193-201.
- 162. Tsimihodimos, V. and M. Elisaf, *Lipoprotein glomerulopathy.* Current opinion in lipidology, 2011. **22**(4): p. 262-9.

- Karet, F.E. and R.P. Lifton, *Lipoprotein glomerulopathy: a new role for apolipoprotein E?* Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 1997.
  8(5): p. 840-2.
- 164. Oikawa, S., et al., Apolipoprotein E Sendai (arginine 145-->proline): a new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 1997. 8(5): p. 820-3.
- 165. Saito, T., et al., *Lipoprotein glomerulopathy: significance of lipoprotein and ultrastructural features.* Kidney international. Supplement, 1999b. **71**: p. S37-41.
- 166. Saito, T., et al., *Lipoprotein glomerulopathy. Report of a normolipidemic case and review of the literature.* American journal of nephrology, 1993. **13**(1): p. 64-8.
- 167. Djamali, A., et al., [Lipoprotein glomerulopathy: a new French case with recurrence on the transplant]. Presse medicale, 1996. **25**(17): p. 798-802.
- 168. Mitani, A., et al., *A novel apolipoprotein E mutation, ApoE Osaka (Arg158 Pro), in a dyslipidemic patient with lipoprotein glomerulopathy.* Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2011. **18**(6): p. 531-5.
- 169. Tokura, T., et al., *A novel mutation ApoE2 Kurashiki (R158P) in a patient with lipoprotein glomerulopathy.* Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2011. **18**(6): p. 536-41.
- 170. Sam, R., et al., *Lipoprotein glomerulopathy: a new apolipoprotein E mutation with enhanced glomerular binding.* American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2006. **47**(3): p. 539-48.
- 171. Ishigaki, Y., et al., *Virus-mediated transduction of apolipoprotein E (ApoE)-sendai develops lipoprotein glomerulopathy in ApoE-deficient mice.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(40): p. 31269-73.
- Pham, T., A. Kodvawala, and D.Y. Hui, *The receptor binding domain of apolipoprotein E is responsible for its antioxidant activity.* Biochemistry, 2005. 44(20): p. 7577-82.
- 173. Georgiadou, D., et al., *Thermodynamic and structural destabilization of apolipoprotein E3 by hereditary mutations associated with the development of Lipoprotein Glomerulopathy.* Journal of lipid research, 2012.
- 174. Argyri, L., et al., *A simple approach for human recombinant apolipoprotein E4 expression and purification.* Protein expression and purification, 2011. **79**(2): p. 251-7.
- 175. Gorshkova, I.N., et al., *Probing the lipid-free structure and stability of apolipoprotein A-I by mutation.* Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 15910-9.
- 176. Ekblad, C.M., et al., *Characterisation of the BRCT domains of the breast cancer susceptibility gene product BRCA1.* Journal of molecular biology, 2002. **320**(3): p. 431-42.

- 177. Aggerbeck, L.P., et al., *Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains.* The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(13): p. 6249-58.
- 178. Perugini, M.A., P. Schuck, and G.J. Howlett, *Self-association of human apolipoprotein E3 and E4 in the presence and absence of phospholipid.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(47): p. 36758-65.
- 179. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation.* Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(10): p. 712-23.
- 180. Jovin, I.S. and G. Muller-Berghaus, *Interrelationships between the fibrinolytic system and lipoproteins in the pathogenesis of coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2004. **174**(2): p. 225-33.
- Harris, F.M., et al., Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100(19): p. 10966-71.
- 182. Saito, H., et al., *Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles.* The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(44): p. 40949-54.
- Gau, B., et al., Mass spectrometry-based protein footprinting characterizes the structures of oligomeric apolipoprotein E2, E3, and E4. Biochemistry, 2011.
  50(38): p. 8117-26.