

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΚΑΡΒΟΞΥ-ΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Α-Ι ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΓΚΟΛΦΙΝΟΠΟΥΛΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ

> ΑΘΗΝΑ ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΚΑΡΒΟΞΥ-ΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Α-Ι ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΓΚΟΛΦΙΝΟΠΟΥΛΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ

> ΑΘΗΝΑ ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη του ρόλου υδρόφοβων αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο της απολιποπρωτεΐνης Α-Ι στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΓΚΟΛΦΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.: 61105

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ
- Ν. Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ
- Α. Χρόνη, Ερευνήτρια Β΄, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

23/01/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I) είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση, την ωρίμανση και τις λειτουργίες της HDL. Η βιογένεση της HDL λαμβάνει χώρα εξωκυτταρικά, κυρίως στο ήπαρ και σε λιγότερη έκταση σε περιφερειακούς ιστούς, μέσω αλληλεπιδράσεων της αποA-I με το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 και το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης LCAT. Ο κρίσιμος ρόλος της αποA-I, του ABCA1 και της LCAT για τη βιογένεση της HDL έχει εδραιωθεί από λειτουργικά πειράματα, πειράματα σε πειραματόζωα και από φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις αυτών των πρωτεϊνών σε άτομα με χαμηλά επίπεδα HDL.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΑ-Ι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για τη διαμόρφωση και για τις λειτουργίες της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, έχει προταθεί ότι η περιοχή 220-231 του καρβοξυ-τελικού άκρου της αποΑ-Ι συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 και στη βιογένεση φυσιολογικών σωματιδίων HDL, αλλά δεν έχει προσδιοριστεί ποια συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων εμπλέκονται.

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να εξετάσουμε πως επηρεάζεται η δομή, σταθερότητα και λειτουργία της αποΑ-Ι από την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, εισήχθησαν τρία σετ μεταλλάξεων στην καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΑ-Ι. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε το ρόλο οχτώ υδρόφοβων (L218, L219, V221, L222), (F225, V227, F229, L230) και δύο φορτισμένων (Ε223, Κ226) αμινοξέων που βρίσκονται εντός ή πλησίον της περιοχής 220-231 της αποΑ-Ι. Η βιοφυσική ανάλυση έδειξε ότι και οι τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τη δομική ακεραιότητα και πλαστικότητα της αποΑ-Ι, οι οποίες είναι αναγκαίες για τις φυσιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης. Τα λειτουργικά πειράματα έδειξαν ότι η ικανότητα των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A], σε σχέση με την αγρίου τύπου αποΑ-Ι, να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 και να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT είναι 20-23% και 65-66% αντίστοιχα. Για την αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] βρέθηκε ότι η ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 είναι ελαφρά αυξημένη, ενώ η ικανότητά της να ενεργοποιεί την LCAT είναι 66%, συγκρινόμενη με την αγρίου τύπου αποΑ-Ι. Τα παραπάνω αποτελέσματα των λειτουργικών πειραμάτων εξηγούν in vivo αποτελέσματα που έδειξαν ότι η έκφραση των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-

5

I[F225A/V227A/F229A/L230A] σε αποΑ-Ι^{-/-} ή αποΑ-Ι^{-/-} x αποΕ^{-/-} ποντίκια εμποδίζει τη βιογένεση της ώριμης HDL, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της αποΑ-Ι και της HDL στο πλάσμα να είναι χαμηλά, ενώ η έκφραση της αποΑ-Ι[E223A/K226A] επιφέρει μόνο μικρές αλλαγές στη βιογένεση της HDL.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα οκτώ υδρόφοβα αμινοξέα της περιοχής 218-230 του καρβοξυ-τελικού άκρου της αποΑ-Ι είναι απαραίτητα για τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού βιογένεσης της HDL, καθώς και στην ικανότητα της να σχηματίζει HDL. Πλήρης κατανόηση των πρωτεΐνικών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στη βιογένεση της HDL μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων τρόπων για τη διάγνωση, πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία των χαμηλών επιπέδων HDL και της αθηροσκλήρωσης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: μεταλλάξεις της αποΑ-Ι, βιογένεση της HDL, ABCA1, LCAT, εκροή χοληστερόλης

ABSTRACT

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the major protein component of high-density lipoprotein (HDL) and plays an essential role in the biogenesis, maturation, and the functions of HDL. The biogenesis of HDL occurs extracellularly, predominantly in the liver and, to a lesser extent, in peripheral tissues, and requires the interaction of apoA-I with the cholesterol transporter ABCA1 and the cholesterol esterifying enzyme LCAT. The crucial role of apoA-I, ABCA1, and LCAT for the biogenesis of HDL has been established by functional cellular and in vitro studies, animal studies and naturally occurring mutations in these proteins in humans with low HDL levels.

Previous studies showed the importance of the C-terminal region for the structure and functions of apoA-I. More specifically, it has been proposed that the 220-231 region of the C-terminal site of apoA-I is important for the apoA-I/ABCA1 interactions and the biogenesis of normal HDL particles, but the specific apoA-I residues involved have not been identified.

The aim of the current study is to examine how structure, stability and functions of apoA-I are affected by point mutations in the C-terminal region of the protein. For this purpose three sets of mutations were introduced in the C-terminal region of apoA-I. Specifically, we investigated the role of eight hydrophobic (L218, L219, V221, L222), (F225, V227, F229, L230) and two charged (E223, K226) residues located within or in the vicinity of the 220-231 region. The biophysical analysis revealed that the three mutated proteins affect in a distinct matter the structural integrity and plasticity of apoA-I which is necessary for the physiological functions of the protein. The functional experiments demonstrated that the ability of apoA-I[L218A/L219A/V221A/L222A] and apoA-I[F225A/V227A/F229A/L230A] to promote ABCA1-mediated cholesterol efflux and to activate LCAT is 20-23% and 65-66% respectively, compared with wild type apoA-I. ApoA-I[E223A/K226A] was found to have slightly increased ability to promote ABCA1mediated cholesterol efflux, while its ability to activate LCAT is 66%, compared with wild type apoA-I. These results are in accordance with in vivo experiments that showed apoA-I[L218A/L219A/V221A/L222A] expression of and that apoA-I[F225A/V227A/F229A/L230A] in apoA-I^{-/-} or apoA^{-I-} x apoE^{-/-} mice prevents the biogenesis of mature HDL, resulting in low levels of plasma apoA-I and HDL, while the expression of apoA-I[E223A/K226A] caused only mild changes in HDL biogenesis.

In conclusion, our results shows the significance of the eight hydrophobic amino acids present in the C-terminal 218-230 region of apoA-I for the structure and interactions of apoA-I with other proteins participating in the pathway of HDL biogenesis, as well as for its ability to form HDL. An improved understanding of protein interactions involved in the biogenesis of HDL will help us identify new targets for diagnosis, prognosis, therapy and prevention of low HDL cholesterol and atherosclerosis.

SUBJECT AREA: Biochemistry

KEYWORDS: apoA-I mutations, biogenesis of HDL, ABCA1, LCAT, cholesterol efflux

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	23
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1 Λιποπρωτεΐνες	23
1.2 Το μονοπάτι βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL	24
1.3 Απολιποπρωτεΐνη Α-Ι (αποΑ-Ι)	26
1.3.1 ΑποΑ-Ι, η κύρια πρωτεΐνη της HDL	26
1.3.2 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι	28
1.4 Ο Μεταφορέας ΑΒCA1	41
1.4.1 Η δομή του ABCA1	41
1.4.2 Ο ΑΒCΑ1 και η εκροή χοληστερόλης	42
1.5 LCAT	43
1.5.1 Η δομή της LCAT	43
1.5.2 Ο ρόλος της LCAT στο μεταβολισμό της HDL	45
1.6 Αθηροσκλήρωση	46
1.6.1 Η δομή της αρτηρίας	46
1.6.2 Ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης	47
1.7 Οι αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL	50
1.7.1 Η HDL και οι αθηροπροστατευτικές της ιδιότητες	50
1.7.1.1 HDL και το μονοπάτι ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης	52
1.7.1.2 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL	53
1.7.1.3 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL	54
1.7.1.4 Οι ενδοθηλιοπροστατευτικές ιδιότητες της HDL	54
1.7.1.5 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	57

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	59
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
3.1 Διαπίδυση διαλύματος πρωτεϊνών	59
3.1.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	59
3.1.2 Αρχή της μεθόδου	59
3.1.3 Πειραματική πορεία	59
3.2 Καθαρισμός της αγρίου τύπου απολιποπρωτεΐνης Α-Ι (WT αποΑ-Ι) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	60
3.2.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	60
3.2.2 Αρχή της μεθόδου	61
3.2.3 Πειραματική πορεία	62
3.3 Καθαρισμός της αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α] με χρωματογραφ ιονανταλλαγής	ρία 63
3.3.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	63
3.3.2 Αρχή της μεθόδου	63
3.3.3 Πειραματική πορεία	64
3.4 Καθαρισμός της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με χρωματογραφ	φία
ιονανταλλαγής	65
3.4.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	65
3.4.2 Αρχή της μεθόδου	65
3.4.3 Πειραματική πορεία	65
3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιαται συνθήκες (SDS-PAGE)	κτικές 65
3.5.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	65
3.5.2 Αρχή της Μεθόδου	67
3.5.3 Πειραματική πορεία	67
3.6 Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-Ι	68

3.6.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	68
3.6.2 Αρχή της μεθόδου	68
3.6.3 Πειραματική πορεία	69
3.7 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού	70
3.7.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	70
3.7.2 Αρχή της μεθόδου	70
3.7.3 Πειραματική πορεία	72
3.8 Θερμική Αποδιάταξη	73
3.8.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	73
3.8.2 Αρχή της μεθόδου	73
3.8.3 Πειραματική πορεία	73
3.9 Χημική Αποδιάταξη	74
3.9.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	74
3.9.2 Αρχή της μεθόδου	75
3.9.3 Πειραματική πορεία	75
3.10 Μέτρηση φθορισμού του ANS	76
3.10.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	76
3.10.2 Αρχή της μεθόδου	76
3.10.3 Πειραματική πορεία	77
3.11 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς μακροφάγων ποντικού J774	77
3.11.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	77
3.11.2 Παρασκευή διαλυμάτων	78
3.11.3 Ανάπτυξη των καλλιεργειών μακροφάγων J774	78
3.13 Εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1	78
3.13.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	78
3.13.2 Παρασκευή διαλυμάτων	80
3.13.3 Αρχή της μεθόδου	81
3.13.4 Πειραματική πορεία	81
	11

3.14 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών	82
3.14.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	82
3.14.2 Αρχή της μεθόδου	82
3.14.3 Πειραματική διαδικασία	83
3.15 Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry	83
3.15.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	83
3.15.2 Αρχή της Μεθόδου	83
3.15.3 Πειραματική πορεία	84
3.16 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)	84
3.16.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	84
3.16.2 Αρχή της μεθόδου	85
3.16.3 Πειραματική διαδικασία	85
3.17 Προσδιορισμός Χοληστερόλης	86
3.17.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	86
3.17.2 Αρχή της μεθόδου	86
3.17.3 Πειραματική διαδικασία	87
3.18 Προσδιορισμός Φωσφολιπιδίων	87
3.18.1 Αντιδραστήρια, όργανα	87
3.18.2 Αρχή Μεθόδου	88
3.18.3 Πειραματική πορεία	88
3.19 Προσδιορισμός δραστικότητας του ενζύμου LCAT	89
3.19.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα	89
3.19.2 Αρχή της μεθόδου	91
3.19.3 Πειραματική πορεία	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	93
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	93

4.1 Καθαρισμός της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ- Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] και αποΑ-
Ι[Ε223Α/Κ226Α] με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής93
4.2. Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-Ι97
4.3 Μελέτη της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ- Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α] και αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] με βιοφυσικές τεχνικές και λειτουργικές δοκιμασίες
 4.3.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας των αποΑ- I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ- Ι αγρίου τύπου μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού
4.3.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου
4.3.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των αποΑ- Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α], αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] και αποΑ-Ι αγρίου τύπου στο διαλύτη
4.3.5 Μελέτη της ικανότητας των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ- Ι[E223A/K226A] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου
4.3.6 Προσδιορισμός της ικανότητας των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου
4.4 Μελέτη της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ- Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με βιοφυσικές τεχνικές και λειτουργικές δοκιμασίες.112
4.4.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας της αποΑ- Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού113
4.4.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου114
4.4.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου116 13

4.4.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών της αποΑ- Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] και της αποΑ-Ι αγρίου τύπου στο διαλύτη118
4.4.5 Μελέτη της ικανότητας της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου
4.4.6 Προσδιορισμός της ικανότητας της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου
КЕФАЛАЮ 5
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 12
5.1 Αιτιολόγηση της επιλογής για μελέτη των μεταλλάξεων αποΑ- Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[E223A/K226A] και αποΑ- Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]
5.1.1 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α], αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] και αποΑ-Ι[F225Α/V227Α/F229Α/L230Α] επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΑ-Ι
5.1.2 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α], αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] και αποΑ-Ι[F225Α/V227Α/F229Α/L230Α] επηρεάζουν τις λειτουργικές ιδιότητες της αποΑ-Ι
5.1.3 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α], αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] και αποΑ-Ι[F225Α/V227Α/F229Α/L230Α] σχετίζονται με ανωμαλίες στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL
5.1.4 Κλινικές εφαρμογές13
КЕФАЛАЮ 6 133
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 13
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού μεταβολισμού της HDL......25

Εικόνα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-Ι

Εικόνα	1.13.	Σχηματική	απεικόνιση	της	δομής	TOU	ABCA1
μεταφορέα	a						41
Εικόνα 1.΄	Ι4. Η κεντρ	οική περιοχή το	ου ενζύμου LCA	Т			44
Εικόνα 1.΄	Ι5. Ο ρόλο	ς της LCAT στ	ο μεταβολισμό τ	ης HDL.			46
Εικόνα 1.΄	l6. Η δομή	μιας μεγάλης	φυσιολογικής αι	οτηρίας			47
Εικόνα 1.	17. Σχηματ	τική αναπαράσ	ταση του καταρ	ράκτη γ	εγονότων τ	του προά	άγουν την
έναρξη αθ	έναρξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων και το σχηματισμό λιπωδών ραβδώσεων και						
σύνθετων	αλλοιώσει	ων					50
Εικόνα 1.΄	18. H HDL	και οι αθηροπι	οοστατευτικές ιδ	ιότητές τ	ιης		51
Εικόνα 3.	1: Χαρακτ	ηριστικές δομι	ές φάσματος κι	ικλικού	διχρωϊσμοι	ύ πρωτεί	ινών που
περιέχουν	τα δομικ	κά χαρακτηρια	στικά, α-έλικα,	β-φύλλα	ο, τυχαίο	σπείραμα	α, και β -
στροφή							72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας πλάσμα	; 1.1. πος	Ιδιότητες	και	σύσταση	των	κυριότερων	λιποπρωτεϊνών	′ то∪ 24
Πίνακας ΗΡ	; 3.1: Πρ	οόγραμμα (έκλουσ	ης WT απ	οΑ-Ι απ	ό στήλη ανιο	νανταλλαγής ΗίΤ	⁻ rap Q 62
Πίνακας ανιοναν	; 3.2: Π ταλλαγή	ρόγραμμα ς HiTrap Q	έκλου ΗΡ	σης αποΑ	-I[L218	A/L219A/V22	1A/L222A] από	στήλη 65
Πίνακας κατασκε χοληστε	; 3.3. Όν :υή πρα :ρόλης…	γκοι (μL) τ ότυπης κα	ου βαθ αμπύλη	θμονομητή ς για τον	και του / προσ	ι SB που χρι σδιορισμό τη	ισιμοποιούνται γ ς συγκέντρωση	νια την ς της 87
Πίνακας για τι φωσφο <i>ί</i>	; 3.4. Όγ ην κα \ιπιδίων.	γκοι (μL) τι τασκευή	ου προ πρότι	οτύπου δια υπης κα	λύματοα μπύλης	ς και του SB για τον	που χρησιμοποι υπολογισμό	ούνται των 89
Πίνακας των Ι[Ε223Α	; 4.1. Εκ μεταλλ /K226A]	ατοστιαία · λάξεων,	περιεχα απα	όμενα ποσα οΑ-Ι[L218Α	οστά α- /L219Α/	έλικας της ατ /V221A/L222 <i>F</i>	roA-I αγρίου τύπ \] και	ου και αποΑ- 100
Πίνακας θερμική της	; 4.2. Γ ς απο	Ιαράμετροι διάταξης	που της	υπολογίστ αποΑ-Ι (ηκαν α αγρίου	ιπό τα πειρα τύπου και	αματικά δεδομέν ι των μεταλλ	α της άξεών …102
Πίνακας αποδιάτ	; 4.3. Πα αξης της	ράμετροι π ς αποΑ-Ι αν	του υπα γρίου τι	ολογίστηκα ύπου και τι	ν από τ υν μετα	α πειραματικά λλάξεών της	α δεδομένα της χι	ημικής 105
Πίνακας αγρίου πρωτεΐν	; 4.4. Ν τύπου ⁄ης	Ιεταβολή α αποΑ-Ι	σήματο ως ι	ς φθορισμ τρος το	ού του σήμα	ANS παροι φθορισμού	υσία μεταλλαγμέ του ANS ατ	τουσία 107
Πίνακας παρουσ Ι[Ε223Α	; 4.5. Εξ ία 1μΜ /K226A]	αρτώμενη αποΑ-Ι αγ	από c γρίου τι	pt-cAMP ε ύπου, απο	κροή χ Α-Ι[L21	οληστερόλης 8Α/L219Α/V2	από μακροφάγα 21Α/L222Α] και	α J774 αποΑ- …109

Πίνακας 4.6. Μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι σωματιδίων

Πίνακας 4.7. Δραστικότητα του ενζύμου LCAT......111

Πίνακας 4.8. Εκατοστιαία περιεχόμενα ποσοστά α-έλικας της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μετάλλαξης αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]......114

Πίνακας 4.10. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μετάλλαξης αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]......117

Πίνακας 4.12. Εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 παρουσία 1μM αποΑ-Ι αγρίου τύπου και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]......121

Πίνακας 6.2. /	Ακρωνύμια και	ανάπτυξή τους		135
----------------	---------------	---------------	--	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 4.1. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-Ι αγρίου τύπου από τα κλάσματα 10-34 (πηκτή Α) και 36-50 (πηκτή Β) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό......94

Σχήμα 4.2. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A]......95

Σχήμα 4.3. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] από τα κλάσματα 2-28 (πηκτή Α) και 30-46 (πηκτή Β) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό......96

Σχήμα 4.4. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] από τα κλάσματα 2-28 (πηκτή Α) και 30-50 (πηκτή Β) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό.......97

Σχήμα 4.5. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες των αποΑ-Ι, μεταλλαγμένων και μη......98

Σχήμα 4.9. Φάσματα φθορισμού του ελεύθερου ANS και του ANS παρουσία αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της......106

Σχήμα 4.10. Εξαρτώμενη (μέσω ABCA1) και μη εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 κατόπιν επώασης για 4h με 1μM αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A]......108

Σχήμα 4.11. Δραστικότητα της LCAT (Vmaxapp/Kmapp) παρουσία rHDL που περιέχουν

την αποΑ-Ι αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A]......111

Σχήμα 4.12. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]......113

Σχήμα 4.13. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου......115

Σχήμα 4.17. Δραστικότητα της LCAT (Vmax_{app}/Km_{app}) παρουσία rHDL που περιέχουν την αποΑ-Ι αγρίου τύπου και την αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]......123

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2011-2014 στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Αγγελικής Χρόνη και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Μαίρης Μαυρή-Βαβαγιάννη.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα μου Δρ. Αγγελική Χρόνη, γιατί με επέλεξε να εργαστώ στο εργαστήριό της στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», με καθοδήγησε στο ερευνητικό μου έργο και με εφοδίασε με πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις, δείχνοντας παράλληλα αμέριστο ενδιαφέρον απέναντί μου. Παράλληλα τη ευχαριστώ, γιατί συνετέλεσε σε μεγάλο βαθμό στην επιμέλεια και διαμόρφωση αυτής της εργασίας.

Είμαι επίσης ευγνώμων στη Δρ. Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, γιατί με δέχτηκε ως μεταπτυχιακή φοιτήτριά της. Την ευχαριστώ, γιατί ήταν ιδιαίτερα συνεργάσιμη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας, ήταν πάντα πρόθυμη στον έλεγχο της προόδου και ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και συνέβαλλε με τις χρήσιμες συμβουλές της στη βελτίωση αυτής της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τη Δρ. Ντία Γαλανοπούλου γιατί με τις διορθώσεις και τις παρατηρήσεις της συνέβαλλε στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Φυσικά, δε θα πρέπει να παραλείψω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, Δρ Γεώργιο Δανιήλ, Δρ. Ιωάννη Δάφνη, Λέττα Αργύρη. Η συμβολή τους ήταν ανεκτίμητη εντός και εκτός εργαστηρίου. Κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα ευχάριστο και εποικοδομητικό εργασιακό κλίμα, ιδανικό για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν, είτε να ανταλλάξουμε άμεσα απόψεις, είτε να συνεργαστούμε με επαγγελματισμό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την κατανόηση και τη διαρκή ηθική συμπαράσταση και υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειάς μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λιποπρωτεΐνες

Η μεταφορά ελεύθερης χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων, καθώς και άλλων λιπιδίων μέσω της κυκλοφορίας επιτυγχάνεται με το πακετάρισμά τους σε μακρομοριακά, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα, τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι κυρίως σφαιρικά σωματίδια που αποτελούνται από έναν μη πολικό, πυρήνα ουδέτερων λιπιδίων, ο οποίος περιέχει εστέρες χοληστερόλης (CE: Cholesterol Esters) και τριγλυκερίδια (TG: Triglycerides,), και περιβάλλονται από περισσότερο πολικά λιπίδια, όπως φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και από αμφιπαθείς πρωτεΐνες τις απολιποπρωτεΐνες^[1].

Οι λιποπρωτεΐνες κατατάσσονται παραδοσιακά σε πέντε μεγάλες τάξεις βασιζόμενες στο διαχωρισμό τους κατά την υπερφυγοκέντρηση που εξαρτάται από την πυκνότητα τους. Οι πέντε κύριες τάξεις είναι οι εξής: χυλομικρά (chylomicrons), λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL: Very Low Density Lipoprotein), λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL: Intermediate-Density Lipoprotein), λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL: Low-Density Lipoprotein) και λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL: High-Density Lipoprotein) (πίνακας 1.1)^[2].

Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται μέσω τριών ξεχωριστών αλλά αλληλεπιδρώντων μονοπατιών: το μονοπάτι των χυλομικρών, το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL και το μονοπάτι της HDL. Ο σχηματισμός των χυλομικρών και της VLDL γίνεται ενδοκυτταρικά, ενώ της HDL γίνεται εξωκυτταρικά. Αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των απολιποπρωτεΐνών, ενζύμων του πλάσματος, πρωτεΐνών μεταφοράς λιπιδίων, υποδοχέων λιποπρωτεϊνών και μεταφορέων λιπιδίων, συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια και συμβάλλουν στην ομοιόσταση των λιπιδίων^[3-5]. Στη συνέχεια, θα γίνει αναφορά μόνο στο μονοπάτι της HDL.

Ιδιότητες και Συστατικά	Χυλομικρά	VLDL	LDL	HDL
Πηγή	έντερο	ήπαρ	VLDL	ήπαρ και έντερο
Μέγεθος (Å)	750-12.000	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)	~400.000	10-80.000	2.300	175-360
Τριγλυκερίδια	80-95	45-65	4-8	2-7
Φωσφολιπίδια	3-6	15-20	18-24	26-32
Ελεύθερη Χοληστερόλη	1-3	4-8	6-8	3-5
Εστεροποιημένη Χοληστερόλη	2-4	16-22	45-50	15-20
Πρωτεΐνες	1-2	6-10	18-22	45-55
Κύριες απολιποπρωτεΐνες	A-I, A-IV, B- 48, CI, CIII, E	B-100, E, CI, CII, CIII	B-100	A-I, A-II
Δευτερεύουσες απολιποπρωτεΐνες	A-II, CII	A-I, A-II, A-IV, CIV, A-V	CI, CII, CIII, E	CI, CII, CIII, D, E, J, AV

Πίνακας 1.1. Ιδιότητες και σύσταση των κυριότερων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος^[2].

1.2 Το μονοπάτι βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL

Η HDL συντίθεται και καταβολίζεται μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού. Στα αρχικά βήματα του μονοπατιού βιοσύνθεσης της HDL, η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι (αποΑ-Ι), η οποία είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη της HDL, εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ ελεύθερη λιπιδίων και προσλαμβάνει φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη μέσω αλληλεπιδράσεων με το μεταφορέα χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων ABCA1 (ATP-Binding cassette Transporter A1) σχηματίζοντας πρόδρομα HDL σωματίδια, προβ HDL. Στη συνέχεια μέσω μιας σειράς ενδιαμέσων βημάτων, η αποΑ-Ι λιπιδιώνεται περαιτέρω και μετατρέπεται σε δισκοειδές σωματίδιο. Έπειτα τα δισκοειδή σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά μέσω της δράσης του ενζύμου εστεροποίησης της χοληστερόλης, ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνηςχοληστερόλης (LCAT: Lecithin: Cholesterol Acyl Transferase), το οποίο ενεργοποιείται από την αποΑ-Ι. Η HDL μετά το σχηματισμό της συμμετέχει σε μια σειρά αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να γίνεται αλλαγή της σύστασης και αναδιοργάνωση της HDL. Η HDL αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) επάγοντας την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από τα κύτταρα, καθώς και την

εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα. Μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με το μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 (ATP-Binding cassette Transporter G1) προάγοντας την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα προς την HDL. Η υδρόλυση των λιπιδίων της HDL μεσολαβείται από διάφορες λιπάσες (τη λιποπρωτεϊνική, την ενδοθηλιακή και την ηπατική) και η ανταλλαγή των λιπιδίων από την πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων PLTP (PhosphoLipid Transfer Protein) και την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein)^[3] (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού μεταβολισμού της HDL. Οι αριθμοί 1 ως 8 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL. (1) Η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι, αποΑ-Ι, (2) ο μεταφορέας χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, ABCA1, (3) το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης, LCAT, (4) η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, CETP, (5) η λιποπρωτεϊνική λιπάση, LPL, (6) ο υποδοχέας SR-B1, (7) ο υποδοχέας της LDL και (8) ο μεταφορέας χοληστερόλης, ABCG1. (Όπου PL: φωσφολιπίδια, FC: ελεύθερη χοληστερόλη, CE: εστέρες χοληστερόλης).

1.3 Απολιποπρωτέΐνη Α-Ι (αποΑ-Ι)

1.3.1 ΑποΑ-Ι, η κύρια πρωτεΐνη της HDL

Η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL και συμμετέχει στη βιοσύνθεση, στη δομή, στις λειτουργίες, καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα^[1]. Έχει διαπιστωθεί ότι μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι αναστέλλουν διακριτά βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL και είτε οδηγούν σε γρήγορο καταβολισμό είτε σε συσσώρευση ενδιαμέσων προϊόντων^[6]. Παρακάτω θα αναφερθούν χαρακτηριστικές μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες της αποΑ-Ι (Εικόνα 1.2).

Η αποΑ-Ι μπορεί να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα, μία διαδικασία η οποία είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της ομοιόστασης της ελεύθερης χοληστερόλης^[7], για την ενδοκύττωση και την ανακύκλωση των υποδοχέων^[8], καθώς και για την κυτταρική σηματοδότηση^[9]. Η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-Ι μπορεί να επάγει εκροή φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης μέσω των αλληλεπιδράσεων με το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1^[10;11]. Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με τον ABCA1 είναι πολύ σημαντικές για το πρώτο βήμα βιογένεσης της HDL. Έχει δειχθεί ότι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι στις οποίες έχει γίνει απαλοιφή της περιοχής 220-231 στο καρβοξυ-τελικό άκρο δεν προάγουν την εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1, εμποδίζοντας τη λιπιδίωση της αποΑ-Ι, και αποτυγχάνουν να σχηματίσουν δισκοειδή ή σφαιρικά HDL σωματίδια σε ποντίκια ^[12;13].

Στο γενικό πληθυσμό έχουν περιγραφεί αρκετές μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι οι οποίες σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα της HDL στο πλάσμα. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με την LCAT^[14]. Η *in vivo* ανάλυση της έκφρασης σε ποντίκια δύο φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων της αποΑ-Ι, των αποΑ-Ι(Leu141Arg)_{Pisa} και αποΑ-Ι(Leu159Arg)_{FIN}, οι οποίες έχουν εξαιρετικά μειωμένη ικανότητα να ενεργοποιούν την LCAT, έδειξε ότι οι μεταλλάξεις αυτές αναστέλλουν τη βιογένεση της HDL, λόγω της ανεπαρκούς εστεροποίησης της χοληστερόλης των προβ HDL σωματιδίων από την ενδογενή LCAT^[15]. Αυτές οι μεταλλάξεις φαίνεται ότι προάγουν τον ταχύ καταβολισμό της πρόσφατα λιπιδιωμένης αποΑ-Ι, καθώς και της LCAT του πλάσματος και αυτό εμποδίζει το σχηματισμό είτε των δισκοειδών είτε των σφαιρικών σωματιδίων HDL^[15]. Επιπλέον, η μελέτη άλλων δύο φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων, αποΑ-I(Arg151Cys)_{Paris} και αποΑ-I(Arg160Leu)_{Oslo}, οι οποίες επίσης έχουν εξαιρετικά μειωμένη ικανότητα να ενεργοποιούν την LCAT, έδειξε ότι επιτρέπεται ο σχηματισμός δισκοειδών HDL σωματιδίων, αλλά λόγω ανικανότητας των αποΑ-Ι να ενεργοποιούν την ενδογενή LCAT εμποδίζεται η μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων σε σφαιρικά HDL σωματίδια με

Η μελέτη τριών τεχνητών μεταλλάξεων σε ποντίκια με ανεπάρκεια της αποΑ-Ι, αποΑ-Ι[Δ(62-78)], αποΑ-Ι[Glu110Ala/Glu111Ala], αποΑ-I[Asp89Ala/Glu91Ala/Glu92Ala] έδειξε ότι μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι μπορούν να προκαλούν υπερλιπιδαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και σοβαρή υπερτριγλυκεριδαιμία^[17-19]. Η μελέτη μιας άλλης τεχνητής μετάλλαξης αποΑ-Ι[Δ(89-99)] έδειξε ότι μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι μπορούν επίσης να προκαλούν αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα^[18].



Εικόνα 1.2. Δευτεροταγής δομή της αποΑ-Ι βασισμένη σε ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Οι περιοχές της αποΑ-Ι που επηρεάζουν ποικίλες βιολογικές της λειτουργίες απεικονίζονται με χρώματα. Το ροζ και πράσινο χρώμα παριστούν περιοχές που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με τον ABCA1 και την LCAT, αντίστοιχα. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η περιοχή που σχετίζεται με την επαγωγή υπερχοληστερολαιμίας. Με γαλάζιο χρώμα συμβολίζονται η περιοχή της αποΑ-Ι και τα μινοξέα που σχετίζονται με την επαγωγή υπερτριγλυκεριδαιμίας.

Με τη συστηματική μελέτη των λειτουργιών της αποΑ-Ι έχουν εντοπιστεί πέντε βήματα του μονοπατιού μεταβολισμού της HDL, τα οποία μπορούν να διαταραχθούν: α) Έλλειψη της σύνθεσης της HDL, λόγω μεταλλάξεων στην αποΑ-Ι, ο οποίες επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι με τον ABCA1, β) Αποτυχία σύνθεσης δισκοειδών ή σφαιρικών HDL σωματιδίων, εξαιτίας του γρήγορου καταβολισμού της ελάχιστα λιπιδιωμένης αποΑ-Ι, γ) Συσσώρευση δισκοειδών HDL σωματιδίων. Ο φαινότυπος αυτός οφείλεται σε μεταλλάξεις στην περιοχή 149-160 της αποΑ-Ι, οι οποίες αποτυγχάνουν στο να ενεργοποιήσουν την LCAT, δ) Συσσώρευση δισκοειδών HDL σωματιδίων και επαγωγή υπερχοληστερολαιμίας. Αυτή η κατάσταση έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση της μετάλλαξης αποΑ-Ι[Δ(89-99)][18][18][18], ε) Επαγωγή υπερτριγλυκεριδαιμίας. Αυτή η κατάσταση παρατηρήθηκε στις μεταλλάξεις αποΑ-Ι[Δ(62-78)], αποΑ-I[Glu110Ala/Glu111Ala], αποΑ-I[Asp89Ala/Glu91Ala/Glu92Ala]^[6].

1.3.2 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι

Το γονίδιο της αποΑ-Ι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και αποτελείται από 4 εξώνια και 3 ιντρόνια^[20]. Η αποΑ-Ι εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στο λεπτό έντερο ως μια πρε-προ-πρωτεΐνη 267 αμινοξέων. Έπειτα από ενδομεμβρανικό κόψιμο του πεπτιδίου σήματος 18 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο, η προ-αποΑ-Ι εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου μια πρωτεάση πέπτει το προπεπτίδιο 6 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η ώριμη αποΑ-Ι είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 243 αμινοξέων, με μοριακή μάζα 28 kDa^[21]. Τα πρώτα 43 αμινοξέα της αμινο-τελικής περιοχής κωδικοποιούνται από το εξώνιο 3 και θεωρείται ότι σχηματίζουν μία G έλικα ενώ η περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 44-243 κωδικοποιείται από το εξώνιο 4^[22] και αποτελείται από επαναλήψεις 22- και 11- αμινοξέων, οι οποίες σύμφωνα με την ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ, οργανώνονται σε δέκα αμφιπαθείς α-έλικες της κλάσης Α^[23;24].

Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-Ι στο αμινο-τελικό άκρο, αποΑ-Ι[Δ(1-43)], έδειξε ότι το μονομερές μόριό της υιοθετεί μία έντονα πεταλοειδή διαμόρφωση. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 44-243 του μονομερούς της αποΑ-Ι, εκτός της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 220 και 227, συνιστούν μια σχεδόν συνεχή αμφιπαθή α-έλικα, η οποία διακόπτεται κατά διαστήματα από κατάλοιπα προλίνης, τα οποία εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις και κάμπτουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτή η καμπυλότητα του μορίου τοποθετεί το αμινο-τελικό και καρβοξυ-τελικό άκρο το ένα κοντά στο άλλο, παρά το γεγονός ότι οι διαστάσεις του μονομερούς είναι 125x80x40 Å^[23;25] (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-Ι στο αμινο-τελικό της άκρο αποΑ-Ι[Δ(1-43)]^[23].

Επίσης, η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-Ι στο καρβοξυ-τελικο άκρο αποΑ-Ι[Δ(185-243)] έδειξε ότι το μονομερές μόριό της σχηματίζει ημικύκλιο (Εικόνα 1.4Α). Κάθε μονομερές αλληλεπιδρά με ένα σχετικά συμμετρικό μόριο για να σχηματίσουν ένα ομοδιμερές. Το διμερές έχει μια σχετικά ημικυκλική αρχιτεκτονική με ύψος ~17Å και διάμετρο ~110Å. Ο σκελετός του διμερούς αποτελείται από δύο μακριές αντιπαράλληλες έλικες, οι οποίες συνίστανται από διαδοχικές επαναλήψεις αλληλουχιών (τύπου Α και Β) και χωρίζονται μεταξύ τους από κατάλοιπα προλίνης. Στο άκρο κάθε διμερούς σχηματίζεται ένα δεμάτι που αποτελείται από τέσσερις α-έλικες και ένα εκτεταμένο τμήμα. Τα αμινοξέα 1-43 του κάθε μονομερούς σχηματίζουν την πρώτη έλικα. Μία εκτεταμένη αλυσίδα και μία δεύτερη μικρότερη περιοχή με ελικοειδή μορφή αποτελεί τη σύνδεση με μία τρίτη μεγαλύτερη παράλληλη έλικα του δεματίου, το οποίο αποτελεί το μονομερές. Η τέταρτη έλικα σχηματίζεται από τα καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα του συμμετρικά συσχετιζόμενου μορίου και ενσωματώνεται στο δεμάτιο αποκρύπτοντας τα υδρόφοβα κατάλοιπα και σταθεροποιώντας τη δομή του δεματίου. Αυτή η οργάνωση οδηγεί στην αλληλεπίδραση των κεντρικών ελίκων (Η5, ΑΒ3) στην οποία οι δύο αντιπαράλληλες έλικες συνδέουν το δεμάτι ελίκων στο κάθε του άκρο(Εικόνα 1.4B)^[24].

Η δομή του δεματίου σταθεροποιείται από δύο συμπλέγματα αρωματικών αμινοξέων, ένα στο κάθε άκρο του διμερούς, καθώς και από δύο αλληλεπιδράσεις π-κατιόντων (Εικόνα 1.5)^[24]. Επιπλέον, οι δύο κεντρικές αντιπαράλληλες έλικες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνης, σταθεροποιώντας περισσότερο τη δομή του μορίου (Εικόνα 1.5)^[24]. Ακόμα, η δομή του διμερούς σταθεροποιείται περισσότερο μέσω των γεφυρών άλατος (i+4, i+3) που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των φορτισμένων καταλοίπων του κάθε μονομερούς (Εικόνα 1.6Α), αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις των δύο μονομερών (Εικόνα 1.6B)^[24;26].

30



Εξωτερική πλευρά του ημικυκλίου



Εικόνα 1.4. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-Ι στο καρβοξυ-τελικο της άκρο αποΑ-Ι[Δ(185-243)]. Α) Ένα μονομερές. Β) Ένα μονομερές αλληλεπιδρά με ένα σχετικά συμμετρικό μόριο για να σχηματιστεί ένα ομοδιμερές. Κάθε μονομερές αποτελείται από 5 ΑΒ επαναλήψεις. Το αμινο-τελικό άκρο κάθε μονομερούς σχηματίζει ένα δεμάτι 4 α-ελίκων με το καρβοξυ-τελικό άκρο του συμμετρικού μονομερούς^[24].



Εικόνα 1.5. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπλεγμάτων των αρωματικών αμινοξέων (C- και N-) και των π-κατιόντων (C- και N-) σταθεροποιούν τη δομή του δεματίου των 4 α-ελίκων. Επίσης, απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αντιπαράλληλων ελίκων του διμερούς^[24].





Εικόνα 1.6. Αλληλεπιδράσεις γεφυρών άλατος στο μονομερές και μεταξύ των μονομερών. Α) Απεικόνιση των πιθανών γεφυρών άλατος στην ομόλογη αλληλουχία του μοντέλου ΑΒ και των παρατηρούμενων γεφυρών άλατος μεταξύ των πέντε

επαναλήψεων AB από την κρυσταλλική δομή του μονομερούς σε διαγράμματα τροχού. Οι γέφυρες άλατος μεταξύ i, i+4 συνδέονται με μωβ διακεκομμένες γραμμές με βέλη, ενώ οι γέφυρες άλατος μεταξύ i, i+3 με μπλε διακεκομμένες γραμμές με βέλη. Τα κατάλοιπα που επισημαίνονται με κόκκινο αστεράκι σχηματίζουν τριάδες γεφυρών άλατος. Ασυνήθιστες γέφυρες άλατος συνδέονται με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές με βέλη. Με κόκκινο κύκλο συμβολίζονται τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα, με μπλε κύκλο τα θετικά φορτισμένα, τα υδρόφοβα αμινοξέα συμβολίζονται με άσπρο κύκλο, οι προλίνες με κίτρινο κύκλο, τα ουδέτερα αμινοξέα με πράσινο και οι ιστιδίνες με άσπρο και μπλε κύκλο. Β) Απεικόνιση των δικτύων γεφυρών άλατος μεταξύ των δύο μονομερών που συγκρατούν το διμερές^[24].

Στην εικόνα 1.7 παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αποΑ-Ι του ανθρώπου ύστερα από τις πληροφορίες που αντλήθηκαν από τις κρυσταλλικές δομές των ελλειμματικών μορφών της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι στο αμινο- και καρβοξυ-τελικο της άκρο (αποΑ-Ι[Δ(1-43)] και αποΑ-Ι[Δ(185-243)]) αντίστοιχα.



Εικόνα 1.7. Η δευτεροταγής δομή της ανθρώπινης αποΑ-Ι βασισμένη σε κρυσταλλογραφία ακτινών Χ διαφορετικών ελλειμματικών μορφών της αποΑ-Ι. Τα αμινοξέα 1-43 συνιστούν την έλικα G. Τα κατάλοιπα 44-243 αποτελούνται από επαναλήψεις 22- και 11- αμινοξέων, οι οποίες οργανώνονται σε 10 αμφιπαθείς α-έλικες (Η1-Η10).

1.3.3 Η δομή της λιπιδιωμένης αποΑ-Ι

Με βάση τη δομή της αποΑ-Ι και διάφορες φυσικοχημικές μελέτες έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για τον τρόπο με τον οποίο η αποΑ-Ι οργανώνεται στα δισκοειδή ή σφαιρικά HDL σωματίδια. Για την οργάνωση της αποΑ-Ι στα δισκοειδή σωματίδια έχει προταθεί το μοντέλο «διπλής ζώνης» ("double belt"), όπου δύο μόρια αποΑ-Ι τυλίγονται με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μία δισκοειδή διπλοστοιβάδα, η οποία αποτελείται από 160 μόρια φωσφολιπιδίων (Εικόνα 1.8Α). Οι αμφιπαθείς έλικες της καρβοξυ-τελικής περιοχής (αμινοξέα 44-243) κάθε μονομερούς της αποΑ-Ι σχηματίζουν ένα δακτύλιο με 3.67 κατάλοιπα ανά στροφή έλικας, όπου η υδρόφοβη επιφάνεια «κοιτάζει» εσωτερικά προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μία τέτοια έλικα, ονομάζεται «11/3» και κάνει 3 πλήρεις στροφές ανά 11 αμινοξέα. Έχει προταθεί ότι η έλικα 5 του ενός μονομερούς αλληλεπιδρά με την έλικα 5 του άλλου μονομερούς (LL5/5) και ο προσανατολισμός των δύο μονομερών είναι τέτοιος ώστε να μεγιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις δεσμών άλατος μέσα στο κάθε μόριο (Εικόνα 1.8B)^[27;28].

Α.



В.


Εικόνα 1.8. Το μοντέλο "double belt" της δισκοειδούς HDL. Α) Δύο μόρια αποΑ-Ι[Δ(1-43)] (έλικες με γαλάζιο χρώμα) με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων διαμέτρου 85Å. Β) Σχηματική απεικόνιση των δεσμών άλατος που θεωρείται ότι σχηματίζοντα μεταξύ των δύο μορίων αποΑ-Ι[Δ(1-43)].

Το 2008 ο Davidson και οι συνεργάτες του παρήγαγαν σφαιρικά σωματίδια ανασυνδυασμένης HDL διαφορετικής διαμέτρου (93, 80Å) από δισκοειδή σωματίδια και συνέκριναν τις δομές της αποΑ-Ι. Χρησιμοποιώντας μεθόδους διασύνδεσης (cross-linking) και φασματομετρίας μάζας, βρήκαν ότι η οργάνωση της δομής της αποΑ-Ι και στα δυο είδη σωματιδίων ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από το μέγεθος των σωματιδίων και του γεγονότος ότι στα σφαιρικά σωματίδια των 93 Å υπήρχαν 3 μόρια αποΑ-Ι αντί για 2 που υπήρχαν στα δισκοειδή. Έτσι λοιπόν, για τη διαμόρφωση των 3 μορίων αποΑ-Ι στα σφαιρικά HDL σωματίδια πρότειναν το μοντέλο "trefoil", βασισμένοι στο μοντέλο "double belt". Οι έλικες 5 και 10 του κάθε μονομερούς της αποΑ-Ι καμφθεί 60° εκτός του επιπέδου του σωματιδίου. Έτσι, ένα τρίτο μόριο αποΑ-Ι μπορεί να καμφθεί κατά τον ίδιο τρόπο και να τοποθετηθεί μεταξύ των δύο αρχικών μορίων της αποΑ-Ι. Η διάταξη αυτή διαχωρίζει την επιφάνεια της σφαίρας σε τρία ίσα μέρη (μηνίσκοι) (Εικόνα 1.9)^[29].

Το 2011 η ίδια ερευνητική ομάδα διαχώρισε HDL ανθρώπου σε πέντε διαφορετικές πυκνότητες υποπληθυσμών και στη συνέχεια απομόνωσαν αυτές που περιείχαν μόνο την αποΑ-Ι (LpA-I). Χρησιμοποιώντας και πάλι μεθόδους χημικής διασύνδεσης και φασματομετρίας μάζας, καθόρισαν πόσα μόρια αποΑ-Ι περιέχονται στα σφαιρικά σωματίδια, ανάλογα με τη διάμετρό τους (Εικόνα 1.10Α). Επίσης, βρήκαν ότι η αποΑ-Ι υιοθετεί ένα δομικό σκελετό σε αυτά τα σωματίδια που μοιάζει πολύ με αυτό της συνθετικής HDL. Προσάρμοσαν καθιερωμένες δομές συνθετικής HDL για να παράγουν τα πρώτα λεπτομερή μοντέλα αυθεντικής HDL του ανθρώπινου πλάσματος, στο οποίο η αποΑ-Ι υιοθετεί συμμετρική δομή που ομοιάζει με κλουβί. Τα μοντέλα υποδεικνύουν ότι το μέγεθος της HDL διαμορφώνεται με περιστροφική κίνηση των ήδη υπαρχόντων μορίων της αποΑ-Ι (Εικόνα 1.10Β). Επίσης διαπίστωσαν ότι η αποΑ-Ι υιοθετεί μία κοινή δομική οργάνωση σε όλα τα σωματίδια, η οποία χαρακτηρίζεται από διακριτές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, ανεξάρτητα από το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων^[30].



Εικόνα 1.9. Σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των μορίων της αποΑ-Ι σε ένα δισκοειδές σωματίδιο "double belt"και σε ένα σφαιρικό σωματίδιο "trefoil". Κάθε α-έλικα συμβολίζεται με διαφορετικό χρώμα. Οι αλληλεπιδράσεις έλικας-έλικας που είναι παρούσες στο δισκοειδές σωματίδιο, βλέπουμε ότι είναι οι ίδιες και στο σφαιρικό σωματίδιο^[29].



Εικόνα 1.10. Το μοντέλο "trefoil" των σφαιρικών HDL σωματιδίων του ανθρώπινου πλάσματος. Α) Ενσωμάτωση των πρόσθετων μορίων αποΑ-Ι στο μοντέλο "trefoil" και

προσαρμογή των μορίων της αποΑ-Ι σε σωματίδια με μικρότερη διάμετρο. α) Σχηματική απεικόνιση τριών μορίων αποΑ-Ι στο μοντέλο "trefoil", με κάθε μόριο αποΑ-Ι να παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. β) Το πενταμερές σύμπλοκο που προτείνεται για τη δομή της LpA-I_{2b}. γ) Ένα εξιδανικευμένο, πλήρως εκτεταμένο τετραμερές σύμπλοκο. δ) Ένα συστραμμένο τετραμερές σύμπλοκο, μικρότερης διαμέτρου, όπως προτείνεται για τη δομή της LpA-I_{2a}. B) Η μοριακή περιστροφή που απαιτείται να επιτύχουν τα μόρια της αποΑ-Ι πάνω στα σφαιρικά σωματίδια της HDL, ώστε να διαμορφώσουν κατάλληλα το μέγεθός τους. Οι α-έλικες της αποΑ-Ι αναπαρίστανται σαν εκτεταμένοι σωλήνες κατά μήκος της επιφάνειας της HDL, όπου κάθε μόριο αποΑ-Ι έχει διαφορετικό χρώμα. Η LpA-I_{2b} αποτελείται από 5 μόρια αποΑ-Ι που εκτείνονται στο μέγιστο βαθμό. Τα μικρότερα σωματίδια περιέχουν τέσσερα μόρια αποΑ-Ι, και κάθε μόριο έχει περιστραφεί με γωνία θ^[30].

Τελευταία, έχει προταθεί ένας μοριακός μηχανισμός νια τη διαμόρφωση της αποΑ-Ι πλήρους μήκους, καθώς αυτή προσλαμβάνει λιπίδια, ο οποίος είναι βασισμένος στο μοντέλο "double belt". Η διαμόρφωση της αποΑ-Ι στα μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους HDL σωματίδια που έχει προταθεί, βασίζεται στην αλληλουχία επαναλήψεων α-ελίκων και την κρυσταλλική δομή της αποΑ-Ι[Δ(185-243)], και επιβεβαιώνεται από εκτεταμένα δεδομένα βιοφυσικών πειραμάτων από πολλές ερευνητικές ομάδες. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η κεντρική αλληλουχία της αποΑ-Ι στο μοντέλο "double belt" (σταθερή περιοχή 66-184) είναι δομικά συντηρημένη, ενώ τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα (μεταβλητές περιοχές 1-65 και 185-243 αντίστοιχα) αναδιαμορφώνονται καθώς το σωματίδιο της HDL επιμηκύνεται (Εικόνα 1.11). Η επιμήκυνση του κάθε μορίου της αποΑ-Ι επιτυγχάνεται με το σταδιακό ξεδίπλωμα του αμινο-τελικού άκρου γύρω από 2 εύκαμπτες περιοχές που περιέχουν τα αμινοξέα G39 και G65, καθώς και τη συντονισμένη ταλάντωση γύρω από τις "αρθρώσεις" G65-P66 και G185-G186 (Εικόνα 1.11Η), προκειμένου η αποΑ-Ι να "αγκαλιάζει" συνέχεια τον πυρήνα HDL^[31]. λιπιδίων, καθώς μεγαλώνει σωματίδιο то της



Εικόνα 1.11. Αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-Ι πλήρους μήκους στο μοντέλο "double belt" βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της αποΑ-Ι[Δ(185-243)]. Α-Β) Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της αποΑ-Ι[Δ(185-243)] ενός μονομερούς (Α) και ενός κρυσταλλογραφικού διμερούς (Β) μορίων αποΑ-Ι με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Οι ευθείες γραμμές αντιπροσωπεύουν τμήματα α-ελίκων, ενώ οι κυματιστές γραμμές όχι, όπως παρατηρήθηκαν στις κρυσταλλικές δομές των ελλειμματικών μορφών της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι, αποΑ-Ι[Δ(1-43)] και αποΑ-Ι[Δ(185-243)]. G0–G3: αμινοξέα 1–43, Η1–Η7: αμινοξέα 44– 184, Ρ: προλίνη, G: γλυκίνη. Προτεινόμενη διαμόρφωση της πλήρους μήκους αποΑ-Ι (Γ) σε ένα μικρό μοντέλο "double belt" διαμέτρου 8,4 nm μονομερούς και (Δ) διμερούς, (E) σε ένα μεσαίο μοντέλο "double belt" διαμέτρου 9,6 nm μονομερούς και (ΣΤ) διμερούς, (Η) σε ένα μεγάλο μοντέλο "double belt" διαμέτρου 11,5 nm διμερούς. Στο (Ζ) απεικονίζεται ένα μονομερές της αποΑ-Ι σε πλήρη έκταση με διαμόρφωση διπλής φουρκέτας που σχηματίζεται από την περιστροφή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γύρω από τις "αρθρώσεις" G65-P66 και G185-G186. Μπλε: αμινο-τελική μεταβλητή περιοχή (G και H1), Μαύρο: σταθερή περιοχή (H2-H7) εκτός από τις κεντρικές επαναλήψεις, Πράσινο: περιοχή Η5, Κόκκινο: καρβοξυ-τελική περιοχή (Η8-Η10), η οποία είναι απών από την αποΑ-Ι[Δ(185–243)

Επίσης, η ίδια ερευνητική ομάδα προτείνει το μηχανισμό με τον οποίο η αποΑ-Ι αλλάζει διαμόρφωση καθώς το σωματίδιο της HDL μετατρέπεται από δισκοειδές σε σφαιρικό. Ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι ο ίδιος, με τη διαφορά ότι στα σφαιρικά σωματίδια αυξάνεται ο αριθμός της αποΑ-Ι και ότι, ενώ στα δισκοειδή σωματίδια δεν υπάρχει κλίση ανάμεσα στη σταθερή και μεταβλητή περιοχή της ίδιας αποΑ-Ι, στα σφαιρικά υπάρχει και εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων της αποΑ-Ι (Εικόνα 1.12)^[31].



Εικόνα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-Ι πλήρους μήκους σε δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια μετά τη δράση του ενζύμου LCAT και καθώς αυτά μεγαλώνουν σε μέγεθος με την πρόσληψη χοληστερόλης^[31].

1.4 Ο Μεταφορέας ΑΒCA1

1.4.1 Η δομή του ΑΒCΑ1

Το ανθρώπινο γονίδιο του ΑΒCA1 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 9 και αποτελείται από 50 εξώνια, τα αποία κωδικοποιούν 2261 αμινοξέα^[32]. Ο ABCA1 ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων ABC και αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες απαρτίζονται από 6 αμφιπαθείς α-έλικες η καθεμία, και δύο ενδοκυτταρικές περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD: Nucleotide Binding Domain). Κάθε περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου περιέχει δύο συντηρημένα πεπτιδικά μοτίβα, γνωστά ως Περιπατητής A (Walker A) και Περιπατητής B (Walker B), τα οποία είναι παρόντα σε όλους τους μεταφορείς της οικογένειας ABC, καθώς και σε πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύουν ATP (Εικόνα 1.13)^[33-35]. Επίσης, περιέχει έναν Περιπατητή C ή υπογραφή-μοτίβο (Walker C ή S, 5 αμινοξέα) που είναι μοναδικός σε κάθε ABC μεταφορέα^[36]. Ο ABCA1 έχει την αμινο-τελική του πλευρά προσανατολισμένη προς το κυτοσόλιο, και περιέχει δύο μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένοι και συνδέονται μέσω ενός ή περισσοτέρων δισουλφιδικών δεσμών^[35;37].



Εικόνα 1.13. Σχηματική απεικόνιση της δομής του ABCA1 μεταφορέα. Όπως όλοι οι πλήρους μήκους ABC μεταφορείς, έτσι και ο ABCA1 αποτελείται από δυο υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές κάθε μια αποτελούμενη από 6 α-έλικες (μπλε χρώμα) και δυο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD-1 και NBD-2). Κάθε NBD χαρακτηρίζεται από τον Περπατητή Α και τον Περπατητή Β (Walker A and Walker B), (κόκκινο χρώμα) και μια μοναδική περιοχή (κίτρινο), όπου και προσδένεται η ATP που απαιτείται για τη λειτουργία του μεταφορέα, ενώ τέλος περιέχει και δυο μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους που είναι ισχυρά γλυκοζυλιωμένοι^[38].

1.4.2 Ο ΑΒCA1 και η εκροή χοληστερόλης

Ο ABCA1 επάγει την εκροή χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων, καθώς και άλλων λιπόφιλων μορίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης από το κύτταρο στην ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-Ι ή στη φτωχή λιπιδίων προβHDL. Φαίνεται ότι ο ABCA1 σχηματίζει ένα κανάλι στη μεμβράνη, όπου προωθεί τη μετατόπιση (flipping) των λιπιδίων από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μέσω μιας εξαρτώμενης από το ΑΤΡ διαδικασία. Ο ABCA1 εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπου θα μπορούσε δυνητικά να διευκολύνει τη μεταφορά λιπιδίων 3TÌ3 3TÌ3 στην κυτταρική επιφάνεια εσωτερικεύοντας απολιποπρωτεΐνες^[39].

Τρία μοντέλα έχουν προταθεί για να περιγράψουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αποΑ-Ι και του ABCA1 που οδηγούν σε εκροή λιπιδίων^[3]. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του ABCA1 και της αποΑ-Ι, αλλά η αποΑ-Ι προσδένεται σε ασταθείς περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα της πλασματικής μεμβράνης ύστερα από μετατόπιση φωσφολιπιδίων (ειδικά φωσφατιδυλοσερίνης), μέσω της δράσης του ABCA1. Ύστερα από την πρόσδεση της αποΑ-Ι, ακολουθεί λιπιδίωση των αμφιπαθών ελίκων της^[40;41]. Σε μία παραλλαγή αυτού του μοντέλου, η λιπιδίωση της αποΑ-Ι, μετά την πρόσδεσή της στην πλασματική μεμβράνη, περιλαμβάνει «εκχύλιση» των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης της πλασματικής μεμβράνης μέσω μικροδιαλυτοποίησης^[42].

Το δεύτερο μοντέλο, το οποίο χαρακτηρίζεται ως υβριδικό, αποτελεί τροποποίηση του πρώτου μοντέλου. Με βάση αυτό το μοντέλο, η αποΑ-Ι προσδένεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω του καρβοξυ-τελικού της

άκρου. Ακολούθως, η δεσμευμένη στη μεμβράνη αποΑ-Ι αλληλεπιδρά με το μεταφορέα ABCA1, ο οποίος μεταφέρει άμεσα λιπίδια στην αποΑ-Ι^[43].

Πειραματικές μελέτες όπου έχουν χρησιμοποιηθεί χημικοί αναστολείς ή μεταλλάξεις του ABCA1 υποδεικνύουν ότι απαιτείται η πρόσδεση της αποΑ-Ι στο μεταφορέα ABCA1 και στα κύτταρα για την εξαρτώμενη από τον ABCA1 εκροή λιπιδίων^[11;44;45]. Φαίνεται ότι υπάρχουν δύο διακριτές θέσεις που δεσμεύουν την αποΑ-Ι, μία χαμηλής απόδοσης, η οποία αφορά άμεση αλληλεπίδραση της αποΑ-Ι με τον ABCA1, και μία δεύτερη θέση υψηλής απόδοσης, η οποία αφορά αλληλεπίδραση της αποΑ-Ι με λιπίδια οργανωμένα στην κυτταρική μεμβράνη από τη δράση του ABCA1^[46].

Ο ABCA1 μπορεί να επάγει την εκροή λιπιδίων σε διάφορες απολιποπρωτεΐνες της HDL, συμπεριλαμβανομένων των αποΑ-Ι, αποΑ-ΙΙ, αποΕ, αποC-Ι, αποC-ΙΙ, αποC-ΙΙΙ και αποΑ-ΙV^[10]. Οι απολιποπρωτεΐνες αυτές περιέχουν επαναλήψεις 11- και 22- αμινοξέων, οι οποίες οργανώνονται σε αμφιπαθείς α-έλικες^[47]. Επίσης, πειράματα εκροής φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης σε συνθετικά πεπτίδια μήκους 18 αμινοξέων, τα οποία ήταν ανάλογα των αμφιπαθών α-ελίκων, έδειξαν ότι τα διμερή τους μιμούνται την αποΑ-Ι στην εκροή χοληστερόλης^[48-50]. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η αμφιπαθής α-έλικα είναι το κύριο δομικό μοτίβο για τη μεταφορά λιπιδίων μέσω του ABCA1^[3].

1.5 LCAT

1.5.1 Η δομή της LCAT

Η LCAT (ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης) περιγράφηκε πρώτη φορά το 1962 από τον Glomset^[51]. Το γονίδιο της LCAT εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16q22 και αποτελείται από έξι εξώνια. Η LCAT εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, και σε πολύ μικρότερες ποσότητες στον εγκέφαλο και στους όρχεις. Η ώριμη LCAT είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 416 αμινοξέα με μοριακό βάρος 63kDa, το οποίο είναι 20% μεγαλύτερο από το προβλεπόμενο. Το επιπλέον μοριακό βάρος της πρωτεΐνης οφείλεται τόσο στη Ν-γλυκοζυλίωση, όσο και στην Ογλυκοζυλίωση^[52]. Τα επίπεδα της LCAT στο πλάσμα (~5mg/L) σχετίζονται με τη δραστικότητα του ενζύμου και διαφέρουν ελάχιστα ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, τις διατροφικές συνήθειες και το κάπνισμα^[53].

Η τεταρτοταγής δομή της LCAT δεν είναι γνωστή, αλλά έχει προταθεί ένα μερικό δομικό μοντέλο με βάση την ομολογία της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας με δομή α/β υδρολασών, όπως οι λιπάσες. Η κεντρική περιοχή αποτελείται από εφτά συντηρημένες έλικες με διαμόρφωση β-φύλλων, οι οποίες συνδέονται με τέσσερις α-έλικες και βρόγχους (Εικόνα 1.14)^[54]. Το μοντέλο προβλέπει τη διαμόρφωση της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου, η οποία σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Ser181, Asp345, και His377. Επίσης, περιέχει έξι κατάλοιπα κυστεΐνης, από τα οποία τα τέσσερα βρίσκονται στην καταλυτική περιοχή της πρωτεΐνης και σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες (Cys50-Cys74 και Cys313-Cys356)^[55;56]. Ο δεσμός που σχηματίζουν τα κατάλοιπα Cys50-Cys74 εκτείνεται στην περιοχή επικάλυψης (lid region) της LCAT, η οποία καλύπτει την καταλυτική περιοχή της LCAT και ανοίγει όταν το ένζυμο προσδένεται στις επιφάνειες των λιποπρωτεϊνών^[57].Οι δύο άλλες ελεύθερες κυστεΐνες, Cys31 και Cys184 δύνανται να βρίσκονται κοντά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, αλλά δε συμμετέχουν άμεσα στο καταλυτικό μηχανισμό^[58].



Εικόνα 1.14. Η κεντρική περιοχή του ενζύμου LCAT. Οι τελείες παριστάνουν τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, ενώ τα αστέρια άλλα αμινοξέα του ενεργού κέντρου^[54].

1.5.2 Ο ρόλος της LCAT στο μεταβολισμό της HDL

Η LCAT έχει τόσο δραστικότητα φωσφολιπάσης A2 όσο και ακυλοτρανσφεράσης. Πρώτα, διασπά το λιπαρό οξύ στη θέση sn-2 της λεκιθίνης και το μεταφέρει στη Ser181. Εν συνεχεία, το λιπαρό οξύ μετεστεροποιείται στην ελεύθερη 3-β υδροξυλομάδα της χοληστερόλης, δημιουργώντας έτσι ένα χοληστερυλεστέρα^[52]. Με τον τρόπο αυτό, η LCAT είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των περισσοτέρων χοληστερυλεστέρων του πλάσματος^[59].

Το προτιμώμενο υπόστρωμα για την LCAT είναι τα προβ HDL δισκοειδή σωματίδια, που παράγονται μέσω των αλληλεπιδράσεων της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι με τον ABCA1 και την επακόλουθη εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων^[52]. Επειδή οι εστέρες χοληστερόλης είναι πιο υδρόφοβοι από τη χοληστερόλη, μεταναστεύουν στον υδρόφοβο πυρήνα των λιποπρωτεϊνών, και έτσι μετατρέπονται τα προ-β HDL σωματίδια σε σφαιρικά α-HDL σωματίδια, τα οποία έχουν αθηροπροστατευτικές ιδιότητες. Αυτά τα σφαιρικά HDL σωματίδια μπορούν πάλι να μετατραπούν σε προ-β HDL σωματίδια μέσω της συντονισμένης δράσης της CETP και άλλων λιπασών^[60]. Τα προ-β HDL σωματίδια έχουν μικρό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα και απομακρύνονται ταχέως μέσω των νεφρών^[60], ενώ τα σφαιρικά σωματίδια έχουν βραδύτερο κύκλο εργασιών. Έτσι, η LCAT παίζει κεντρικό ρόλο στον ενδοαγγειακό μεταβολισμό της HDL και στον καθορισμό των επιπέδων της HDL στο πλάσμα^[61].

Εκτός από το ρόλο της στην εστεροποίηση της χοληστερόλης στην HDL, η LCAT υποστηρίζεται επίσης ότι συμβάλλει στην εκροή χοληστερόλης, διατηρώντας την κλίση συγκέντρωσης της χοληστερόλης μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και των εξωκυτταρικών αποδεκτών, διευκολύνοντας έτσι την εκροή χοληστερόλης μέσω παθητικής διάχυσης ή μέσω του μεταφορέα ABCG1^[62;63]. Επιπλέον, η εστεροποίηση της χοληστερόλης του πλάσματος ίσως απαιτείται πριν οι CE προσληφθούν από τα ηπατοκύτταρα, είτε άμεσα μέσω του SR-BI είτε έμμεσα μέσω της CETP (Εικόνα 1.15)^[64].



Εικόνα 1.15. Ο ρόλος της LCAT στο μεταβολισμό της HDL. UC: μη εστεροποιημένη χοληστερόλη^[64].

1.6 Αθηροσκλήρωση

1.6.1 Η δομή της αρτηρίας

Μία υγιής αρτηρία αποτελείται από τρία ομόκεντρα στρώματα: το ενδότατο στρώμα που καλείται έσω χιτώνας, το μέσο στρώμα που καλείται μέσος χιτώνας και το εξωτερικό στρώμα που είναι γνωστό ως έξω χιτώνας. Ο έσω χιτώνας οριοθετείται από ένα ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που έρχεται σε επαφή με τον αυλό του αγγείου και εξωτερικά από το εσωτερικό ελαστικό έλασμα. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από εξωκυττάρια ύλη, κυρίως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο. Προχωρώντας προς τα έξω, ο μέσος χιτώνας αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα. Ανάλογα με το μέγεθος της αρτηρίας, υπάρχουν ένα ή περισσότερα στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται σε συνοχή από μια εξωκυττάρια ύλη που αποτελείται κυρίως από ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου ενώ μπορούν, επίσης, να συνδέονται μεταξύ τους μέσω κυτταρικών συνδέσμων. Μετά το εξωτερικό ελαστικό έλασμα, υπάρχει ο έξω χιτώνας που είναι το πιο ακραίο στρώμα της αρτηρίας. Ο έξω χιτώνας αποτελείται από μια χαλαρή ύλη με μικρό ποσό ινών ελαστίνης, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες, και κολλαγόνο (Εικόνα 1.16)^[65;66].



Εικόνα 1.16. Η δομή μιας μεγάλης φυσιολογικής αρτηρίας^[65].

1.6.2 Ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μία προοδευτική πάθηση των μεγάλων αρτηριών, η οποία χαρακτηρίζεται από πάχυνση του έσω χιτώνα της αρτηρίας, λόγω συσσώρευσης λιπιδίων και ινωδών στοιχείων, καθώς και στένωση του αυλού της αρτηρίας. Οι πρώιμες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις συνίστανται από υποενδοθηλιακή συσσώρευση χοληστερόλης και διογκωμένων μακροφάγων, τα οποία καλούνται "αφρώδη κύτταρα". Στους ανθρώπους, η αθηρωματική πλάκα μπορεί να βρεθεί στην αορτή την πρώτη δεκαετία της ζωής μας, στις στεφανιαίες αρτηρίες τη δεύτερη δεκαετία και στα αγγεία του εγκεφάλου την τρίτη ή τέταρτη δεκαετία^[65].

Η υποκείμενη παθολογία της νόσου χαρακτηρίζεται ως μία χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία των αρτηριακών τοιχωμάτων που συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές με διαταραχές στη ροή του αίματος στον αυλό των αρτηριών, κυρίως σε περιοχές διακλάδωσης. Το εναρκτήριο βήμα αυτής της διαδικασίας είναι η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου και αλλαγές στη δομή του αγγείου, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας σε κάποια σημεία της ελαστικότητας του στρώματος του αγγείου που περιβάλλει τον αυλό και έκθεση των πρωτεογλυκανών, που επιτρέπουν τη συσσώρευση των LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών). Τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης της κυκλοφορίας που μεταφέρεται από τις LDL που περιέχουν την αποΒ100 προάγουν την αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η πρόσδεση της αποΒ100 στις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας οδηγεί στη διατήρηση των LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου είναι επιδεκτικές στην οξειδωτική τροποποίηση από δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS: Reactive Oxygen Species) ή ένζυμα όπως η μϋελοπεροξειδάση ή λιποξυγενάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα. Τα οξειδωμένα λιπίδια και οι οξειδωμένες LDL (oxLDL) οδηγούν στην έκφραση προσκόλλησης επιφανειακών μορίων και την έκκριση χυμοκινών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Αυτές οι αλλαγές στη λειτουργία του ενδοθηλίου οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση των μονοκυττάρων, των Τ λεμφοκυττάρων και των NK (natural killers cells) κυττάρων από την κυκλοφορία στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος. Όταν τα μονοκύτταρα εισέλθουν στον έσω χιτώνα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και συσσωρεύουν oxLDL και κυτταρικά υπολείμματα μέσω των υποδοχέων "εκκαθαριστών" (scavengers), όπως οι SRA-I (Scavenger Receptor class A type I), SRA-II και CD36, που εκφράζουν. Αυτό αυξάνει τα εσωτερικά αποθέματά τους σε εστέρες χοληστερόλης με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε "αφρώδη κύτταρα". Τα ενεργοποιημένα αφρώδη κύτταρα ενισχύουν τη χημειοταξία των λεμφοκυττάρων εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες. Στον άνθρωπο, αυτή η πρώιμη κάκωση του αγγείου χαρακτηρίζεται από τις κονδυλώδεις περιοχές απόθεσης λιπιδίων, οι οποίες μορφολογικά έχουν ονομαστεί "λιπαρές ραβδώσεις" (fatty streak lesions)^[65;66].

Η κάκωση του αγγείου που χαρακτηρίζεται από "λιπαρές ραβδώσεις" επιδεινώνεται με τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από το μέσο στον έσω χιτώνα όπου πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύουν λιπίδια και κυτταρικά υπολείμματα. Η μετανάστευση των κυττάρων αυτών διευκολύνεται από την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας στην οποία ενεργό ρόλο παίζουν οι καθεψίνες (πρωτεάσες σερίνης) σε συνδυασμό με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs, Matrix Metallopeptidases). Η αγγειογένεση παρέχοντας οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας συμβάλλει στην ανάπτυξη και τη σταθεροποίησή της. Οι πιο

48

προχωρημένες και ασταθείς ινώδεις αθηρωματικές πλάκες στον έσω χιτώνα αποτελούνται από έναν πυρήνα πλούσιο σε νεκρωτικό υλικό και λιπίδια που περιβάλλεται από εξωκυττάριο υλικό και καλύπτεται από ινώδες κάλυμμα που περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα. Οι πλάκες μπορούν να γίνουν ολοένα και πιο περίπλοκες – οπότε και ονομάζονται ώριμες - με ασβεστοποίηση των ινωδών περιοχών, εξέλκωση στην επιφάνεια του αυλού, και αιμορραγία από μικρά αγγεία που αναπτύσσονται στην περιοχή της κάκωσης και προέρχονται από το μέσο χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος^[65;66].

Τα παραπάνω γεγονότα περιγράφουν την πορεία ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 1.17), η κύρια επίπτωση της οποίας στην υγεία του ανθρώπου είναι η μείωση της αιματικής ροής. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η αθηρωματική πλάκα μειώνει τη στεφανιαία αιματική ροή είναι οι ακόλουθοι: 1) τα επιπρόσθετα μυϊκά κύτταρα και οι διάφορες εναποθέσεις στο τοίχωμα προβάλλουν στον αυλό του αγγείου και αυξάνουν την αντίσταση στην ροή, και 2) τα παθολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα της αθηροσκληρωτικής περιοχής απελευθερώνουν υπέρμετρα αγγειοσυσταλτικές ουσίες (όπως για παράδειγμα ενδοθηλίνη-1) και ανεπαρκώς αγγειοδιασταλτικές ουσίες (μονοξείδιο του αζώτου και προστακυκλίνη). Αυτές οι διαδικασίες είναι προοδευτικές, οδηγώντας τελικά μερικές φορές σε πλήρη απόφραξη. Πλήρης οξεία απόφραξη προκαλείται, ωστόσο, συνήθως λόγω θραύσης της πλάκας και σχηματισμού θρόμβου αίματος στη στενεμένη αθηροσκληρωτική αρτηρία, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση σοβαρών κλινικών επιπλοκών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικό επεισόδιο^[65;66].



Εικόνα 1.17. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη γεγονότων που προάγουν την έναρξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων και το σχηματισμό λιπωδών ραβδώσεων και σύνθετων αλλοιώσεων. MCP-1: χημειοτακτικός παράγοντας μονοκυττάρων, LDL, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, mmLDL: μερικώς τροποποιημένη LDL, oxLDL: οξειδωμένη LDL, SRA-I (Scavenger Receptor class A type I), SRA-II και CD36: υποδοχείς "εκκαθαριστές".

1.7 Οι αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL

1.7.1 Η HDL και οι αθηροπροστατευτικές της ιδιότητες

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της HDL χοληστερόλης και του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (CVD: Cardiovascular Disease). Στη μελέτη Framingham Heart, κάθε αύξηση 0.26mmol/L της HDL χοληστερόλης συσχετίστηκε με μία σημαντική μείωση του σχετικού κινδύνου θνησιμότητας από CVD. Στην HDL έχουν αποδοθεί αθηροπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στη σύστασή της^[67].

Τα κυριότερα λιπίδια που αποτελούν την HDL είναι τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, οι εστέρες χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια, ενώ οι κύριες πρωτεΐνες είναι η αποΑ-Ι (~70%) και η αποΑ-ΙΙ. Περιέχει επίσης, και άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες σε μικρότερες ποσότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις αποC-Ι, αποC-ΙΙ, αποC-ΙΙΙ, αποD, αποΕ, αποF, αποΗ, αποJ, αποL και αποΜ. Ακόμα, περιέχει διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, όπως την παραοξονάση 1, (PON1), την ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, (PAF-AH), την LCAT, τη σεληνοϋπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSPx) και τη CETP^[67]. Μεταξύ των δράσεων τους τα παραπάνω ένζυμα υποστηρίζεται ότι τροποποιούν δυνητικά αθηρογόνες ROS στην LDL, στα αγγειακά τοιχώματα, ακόμα και στην ίδια την HDL^[68].

Οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL περιλαμβάνουν την προαγωγή του μονοπατιού ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης (RCT: Reverse Cholesterol Transport)^[65], την αναστολή οξείδωσης των LDL^[69], τη ρύθμιση έκκρισης φλεγμονωδών παραγόντων^[14], αντιθρομβωτικές και αντιαθηρογόνές επιδράσεις στο ενδοθήλιο, όπως διέγερση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προαγωγή των μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου (Εικόνα 1.18)^[70].



Εικόνα 1.18. Η HDL και οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητές της. Ένας από τους αθηροπροστατευτικούς μηχανισμούς δράσης της HDL είναι η ικανότητας της να προάγει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα , η οποία στη συνέχεια είτε μεταφέρεται απευθείας στο ήπαρ μέσω της αλληλεπίδρασης HDL και SR-BI για απέκκριση από τη χολή ή στις VLDL/LDL. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται "ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης" (RCT). Άλλες σημαντικές ιδιότητες της HDL είναι οι αντιοξειδωτικές, οι αντιφλεγμονώδεις, οι ενδοθηλιοπροστατευτικές και οι αντιθρομβωτικές. PG1₂: προσταγλανδίνη I₂, EC: ενδοθηλιακά κύτταρα^[70].

1.7.1.1 HDL και το μονοπάτι ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης

Το πρώτο βήμα του μονοπατιού RCT είναι η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του ABCA1 προς την ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-Ι, σχηματίζοντας την πρόδρομη HDL (προβHDL σωματίδια). Στη συνέχεια μέσω της δράσης του ενζύμου LCAT, η ελεύθερη χοληστερόλη μετατρέπεται σε εστέρες χοληστερόλης και σχηματίζονται τα ώριμα σφαιρικά σωματίδια HDL (α-HDL). Η ώριμη HDL αλληλεπιδρά με τον SR-BI ο οποίος μπορεί προσλαμβάνει εστέρες χοληστερόλης από την HDL και να τους μεταφέρει στο ήπαρ, για απομάκρυνση από την κυκλοφορία μέσω της χολής^[3;71]. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη της HDL μπορεί επίσης να μεταφερθεί αρχικά από την HDL σε λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την αποΒ (VLDL και LDL) μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP και στη συνέχεια από τις VLDL και LDL να μεταφερθεί μέσω των LDL και LRP υποδοχέων στο ήπαρ^[3;72].

Οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL μέσω της πορείας RCT οφείλονται στην απομάκρυνση της περίσσειας κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η δημιουργία ή μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αφρωδών κυττάρων και εμποδίζεται ή μειώνεται ο ρυθμός του θανάτου των αφρωδών κυττάρων. Δεδομένου ότι από τη διαδοχική συσσώρευση αποπτωτικών κυττάρων, θραυσμάτων και κρυστάλλων χοληστερόλης σχηματίζεται ο νεκρωτικός πυρήνας της αθηρωματικής πλάκας, η δράση της HDL εμποδίζει το σχηματισμό ή υποστρέφει τον ήδη σχηματισμένο νεκρωτικό πυρήνα^[65].

52

1.7.1.2 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL

Ήδη από το 1992, βρέθηκε ότι η HDL είναι ο κύριος φορέας των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων στο ανθρώπινο πλάσμα^[73] και ότι αυτά τα υδροϋπεροξείδια παραλαμβάνονται γρηγορότερα από το ήπαρ από ότι τα μη οξειδωμένα λιπίδια^[74], γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της HDL στο οξειδωτικό στρες^[71]. Η HDL περιορίζει την οξείδωση των LDL ή ανάγει τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια, προστατεύοντας έτσι τα λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Αρκετά ένζυμα και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την HDL έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ανάμεσα τους είναι η PON1, η PAF-AH και η LCAT^[69]. Τα ένζυμα αυτά, υδρολύουν τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια προς λυσοφωσφατιδυλοχολίνη^[75;76].

Με τη δραστικότητα της φωσφολιπάσης A2 (PLA2), η LCAT μπορεί να υδρολύσει οξειδωμένες ακυλαλυσίδες φωσφατιδυλοχολινών (oxPL), παράγοντας τη λιγότερο βιοδραστική λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) και οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν εν συνεχεία να χρησιμοποιηθούν από την LCAT για να εστεροποιήσει τη διακυλογλυκερόλη, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο τριγλυκερίδια εκτός από τον σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης^[77;78]. Όσον αφορά την PON1 in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να αναστείλει τη βιολογική δραστικότητα της ελαφρώς οξειδωμένης LDL και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, υποδηλώνοντας ότι η PON1 μπορεί να υδρολύσει τα oxPL^[76;79]. Επίσης, πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα με ανεπάρκεια PON έχουν δείξει να είναι πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών ενώ πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζεται η PON έδειξαν να είναι λιγότερο επιρρεπή στην εμφάνιση αθηρωματικών πλακών^[70].

Η PAF-AH έχει δραστικότητα PLA2 και μπορεί να υδρολύσει τον PAF, έναν ισχυρό μεσολαβητή της φλεγμονής, καθώς και oxPL, παρόμοια του PAF, παράγοντας lysoPC και οξειδωμένα λιπαρά οξέα. Έτσι, διαδραματίζει καίριο ρόλο στην αποικοδόμηση προφλεγμονωδών λιπιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης^[80].

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η αποΑ-Ι εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση, δρώντας ως δέκτης των υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (HPETE) και υδροϋπεροξυδεκαδωδεκανοϊκό οξύ (HPODE) από την LDL. Τόσο HPETE και HPODE είναι τα προϊόντα της 12-λιποξυγενάσης, τα οποία είναι απαραίτητα για τη μη ενζυματική οξείδωση των φωσφολιπιδίων της LDL^[70;81].

1.7.1.3 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL

Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης της, η HDL προστατεύει και από τη φλεγμονή, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Έτσι η σφαιρική HDL εμποδίζει тnv έκφραση προφλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης και διεγείρει την έκφραση του αντιφλεγμονώδους παράγοντα TGF₂ (Transforming growth factor β_2 : αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β2) στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[70]. Επίσης εξουδετερώνει την προφλεγμονώδη δράση της CRP (C-reactive C-αντιδρώσα protein: πρωτεΐνη) και αναστέλλει тην παραγωγή προφλεγμονωδών προσταγλανδινών από μονοκύτταρα, ενώ εμποδίζει τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις της οξειδωμένης LDL στο ενδοθήλιο. Επιπλέον περιορίζει την παραγωγή του χημειοτακτικού παράγοντα μονοκυττάρων (MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1) που επάγεται από την LDL^[70;71]. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL μπορεί να μεσολαβούνται από τη διαταραχή της σύστασης των σχεδιών λιπιδίων ("lipid rafts") της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, δηλαδή περιοχών της πλασματικής μεμβράνης με υψηλά επίπεδα σε χοληστερόλη και σφιγγομυελίνη, μέσω της εκροής της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Η μείωση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη των σχεδιών λιπιδίων οδηγεί σε τροποποίηση της δομής τους ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας σηματοδοτικές πορείες που σχετίζονται με αυτές^[71].

1.7.1.4 Οι ενδοθηλιοπροστατευτικές ιδιότητες της HDL

Η HDL επάγει την παραγωγή NO από τη συνθετάση NO του ενδοθηλίου (eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase) και με αυτό τον τρόπο επάγει αγγειοδιαστολή^[82]. Μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον SR-BI έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις SR-BI-HDL ενεργοποιούν μοριακά μονοπάτια που καταλήγουν στη φωσφορυλίωση στη Ser1179 και ενεργοποίηση της eNOS^[83]. Η μεταγωγή σήματος λόγω αλληλεπιδράσεων SR-BI-HDL ξεκινά μέσω ενεργοποίησης της Src κινάσης που φωσφορυλιώνει

την PI3K κινάση η οποία με τη σειρά της καταλήγει στην ενεργοποίηση των Akt (Protein kinase B: πρωτεϊνική κινάση B) και MAPK (Mitogen-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο) που ανεξάρτητα φωσφορυλιώνουν την eNOS^[82]. Η HDL και τα ανασυνδιασμένα σωματίδια HDL που περιείχαν αποΑ-Ι, φωσφατιδυλοχολίνη και κυκλοδεξτρίνη αλλά όχι χοληστερόλη αύξησαν την ενεργότητα της eNOS, σε αντίθεση με την ανασυνδιασμένη HDL που περιείχε χοληστερόλη^[84]. Επιπλέον, η HDL που περιέχει σφιγγοσίνη-φωσφατιδυλοχολίνη, S1P (sphingosine-1-phosphate) και λυσοσουλφατιδικό μπορεί να επάγει αγγειοδιαστολή εξαρτώμενη από το NO σε δακτυλίους αορτής ποντικιού μέσω αλληλεπίδρασης S1P-S1P3 (sphingosine-1-phosphate receptor 3), η οποία καταλήγει σε κινητοποίηση Ca²⁺ και φωσφορυλίωση της eNOS μέσω της Akt^[85].

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπους με υπερχοληστερολαιμία ή με χαμηλά επίπεδα HDL ότι η χρήση ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο, επαγόμενη από το NO, αγγειοδιαστολή. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, σε ιδιαίτερα μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα ενδοθηλιακού NO, θεωρείται να παίζει ρόλο κλειδί στην έναρξη και ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης^[70;86;87].

1.7.1.5 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL

Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφερθεί στην αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL και τις ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, καταλήγοντας όμως σε αντικρουόμενες απόψεις. Αυτό, βέβαια εξηγείται βάσει των διαφορετικών επιδράσεων των υποπληθυσμών της HDL στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η HDL3 δεν επηρεάζει τα αιμοπετάλια, και δεν προκαλεί ενεργοποίηση των καναλιών ιόντων που σχετίζονται με τα αιμοπετάλια^[88], ενώ έχει παρατηρηθεί αναστολή από την HDL2 και από την HDL που είναι πλούσια σε από-E^[89]. Πράγματι, η HDL2 φαίνεται να μειώνει την επαγόμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση αιμοπεταλίων, απελευθερώνει την έκκριση 14C-σεροτονίνης, ADP και επινεφρίνης^[89], εμποδίζει την παραμόρφωση του σχήματος των αιμοπεταλίων και την κινητοποίηση του Ca²⁺, και τέλος μειώνει την επαγόμενη από την διαφόμενη από την

αιμοπεταλίων από την HDL2 μεσολαβείται από την αποΕ, ενώ χημικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία της από-Ε στα κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης και τυροσίνης, φαίνεται να καταστέλλουν αυτές τις επιδράσεις. Επιπρόσθετα, η αποΑ-Ι εμπλέκεται στην αναστολή των λειτουργιών των αιμοπεταλίων, αν και σε χαμηλότερο βαθμό από την αποΕ^[91], ενώ η προσθήκη της αποΑ-Ι Milano αποτρέπει τη δημιουργία θρόμβων σε ποντίκια, υποδηλώνοντας ότι η HDL αναστέλλει τον σχηματισμό του θρόμβου in vivo^[92].

Επίσης, η HDL σταθεροποιεί την προσταγλανδίνη-I₂ (PGI₂), έναν ισχυρό μεσολαβητή της θρομβοαντίστασης στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στα αιμοπετάλια και το αγγειακό τοίχωμα^[93-95]. Αξίζει να αναφερθεί ότι, αλλαγές στη διαιτητική πρόσληψη λιπαρών οξέων μπορεί να προάγει την απελευθέρωση της PGI2 από τα λεία μυϊκά κύτταρα^[96]. Επιπρόσθετα, οι αντιπηκτικές και ινωδολυτικές ιδιότητες της HDL έχουν ευρέως περιγραφεί σε πολλές in vitro μελέτες. Έχει δειχθεί ότι η απομονωμένη HDL ενισχύει σημαντικά την απενεργοποίηση του παράγοντα πήξης Va μέσω S^[97] ενεργοποίησης πρωτεϊνών С και των

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΚΟΠΟΣ

2. Σκοπός της εργασίας.

Η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I) είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη βιογένεση, την ωρίμανση και τις λειτουργίες της HDL. Η βιογένεση της HDL πραγματοποιείται εξωκυτταρικά και απαιτεί την αποA-I, το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 και το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης LCAT. Η βιογένεση της HDL λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους εξωηπατικούς ιστούς. Ο καθοριστικός ρόλος των αποA-I, ABCA1 και LCAT στη βιογένεση της HDL έχει εδραιωθεί από τη μελέτη φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων σε αυτές τις πρωτεΐνες σε ανθρώπους με χαμηλά επίπεδα HDL.

Προηγούμενες μελέτες μεταφοράς γονιδίων σε ποντίκια, έδειξαν ότι σε μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι που έχει γίνει απαλοιφή του καρβοξυτελικού άκρου και συγκεκριμένα της περιοχής αμινοξέων 220-231 παρεμποδίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αποΑ-Ι και ABCA1 και εμποδίζεται η βιογένεση φυσιολογικών αHDL σωματιδίων, αλλά επιτρέπεται ο σχηματισμός προβHDL σωματιδίων. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε ποια συγκεκριμένα καρβοξυ-τελικά αμινοξέα της αποΑ-Ι απαιτούνται για τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις με το μεταφορέα ABCA1 και/ή την LCAT που οδηγούν στο σχηματισμό ώριμων σωματιδίων αHDL. Για το σκοπό αυτό, εισήχθησαν τρία σετ μεταλλάξεων στη περιοχή 220-230 της αποΑ-Ι. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε το ρόλο οχτώ υδρόφοβων (L218, L219, V221, L222), (F225, V227, F229, L230) και δύο φορτισμένων (E223, K226) αμινοξέων που βρίσκονται εντός ή πλησίον της περιοχής 220-231 της αποΑ-Ι, που έχει δειχθεί προηγούμενα ότι απαιτείται για την εκροή λιπιδίων μέσω ABCA1 και για τη βιογένεση της HDL *in vivo*.

Ιn vivo μελέτες από τους συναδέλφους μας (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής) έδειξαν ότι η έκφραση της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] σε αποΑ-Ι^{-/-} x αποΕ^{-/-} ποντίκια προάγει την παραγωγή ελαττωματικών προβHDL σωματιδίων που αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σε αHDL σωματίδια, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της αποΑ-Ι και της HDL στο πλάσμα να είναι χαμηλά. Το ελάττωμα αυτό, που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά για αποΑ-Ι που φέρει σημειακές μεταλλάξεις στην καρβοξυ-τελική περιοχή, δεν μπορούσε να διορθωθεί με συνέκφραση της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και της LCAT. Η έκφραση της αποΑ-I[E223A/K226A] προκάλεσε ηπιότερες αλλά διακριτές αλλαγές στο φαινότυπο της HDL, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κατάλοιπα αυτά συμβάλλουν επίσης HDL. Όσον στη διαμόρφωση της αφορά тην αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230], η έκφρασή της σε αποΑ-Ι^{-/-} x αποΕ^{-/-} ποντίκια οδήγησε στο σχηματισμό προβ και α4 HDL σωματιδίων. Αυτός ο ελαττωματικός φαινότυπος της HDL μπορούσε να διορθωθεί με συνέκφραση της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230] και της LCAT.

Έχοντας λοιπόν, αυτά ως δεδομένα θελήσαμε να μελετήσουμε αν οι παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή και τη διαμόρφωση του μορίου της αποΑ-Ι. Ειδικότερα, εξετάσαμε τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού, τη σταθερότητά τους έναντι θερμικών και χημικών αποδιατακτικών ουσιών, καθώς και τις ιδιότητες δέσμευσης των υδρόφοβων περιοχών τους μέσω φθορισμού του ιχνηθέτη ANS.

Επιπλέον, θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1, που είναι το πρωταρχικό βήμα στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL και την ικανότητα τους να ενεργοποιούν το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης, LCAT.

Απώτερος στόχος των μελετών μας είναι να κατανοηθούν σε βάθος τα βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL, έτσι ώστε να αναπτυχθούν νέοι τρόποι για τη διάγνωση, πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία των χαμηλών επιπέδων HDL και της αθηροσκλήρωσης.

58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Διαπίδυση διαλύματος πρωτεϊνών

3.1.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- Υδροχλώριο, HCI, 4M (Merck).
- Δις αποσταγμένο (dd) H₂O.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris-HCl 0.01M, pH8.
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12kDa (Sigma-Aldrich).
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Labtech).

3.1.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της διαπίδυσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών μορίων από μεγάλα μακρομόρια μέσω μεμβράνης με εκλεκτική διαπερατότητα ή για την ανταλλαγή ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που πρόκειται να υποστεί διαπίδυση, τοποθετείται στη μεμβράνη διαπίδυσης και αφού η μεμβράνη σφραγιστεί καλά, τοποθετείται στον ογκομετρικό κύλινδρο που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα. Τα μικρά διαλυτά μόρια έρχονται σε ισορροπία μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά κατασκευασμένες ώστε οι πόροι που διαθέτουν να εμποδίζουν τη μετακίνηση μορίων που υπερβαίνουν κάποιο συγκεκριμένο μοριακό βάρος. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης θα πρέπει να είναι πολύ μικρότερο από το μέγεθος του μακρομορίου ενδιαφέροντος.

3.1.3 Πειραματική πορεία

Η αγρίου τύπου αποΑ-Ι και οι μεταλλαγμένες μορφές της προέρχονται από το μέσο καλλιέργειας κυττάρων HTB-13, που είχαν αναπτυχθεί σε κυλινδρικές φιάλες και επιμολυνθεί με αδενοϊούς που έφεραν το γονίδιο έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών (εργαστήριο του Δρ. Βασίλη Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής). Με αυτό το σύστημα έκφρασης το προ-πεπτίδιο (pre-peptide) 18 αμινοξέων της αποΑ-Ι κόπτεται πριν από την έκκριση και η προ-αποΑ-Ι (περιέχει το προπεπτίδιο (pro-peptide) 6 αμινοξέων) εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας. Το μέσο καλλιέργειας συλλέγεται κάθε 24 ώρες για 5 μέρες, υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι 25mM NH₄HCO₃, λυοφιλοποιείται και στέλνεται στο δικό μας εργαστήριο. Λυοφιλοποιημένα δείγματα που περιέχουν την αποΑ-Ι διαλύονται σε 30 mL Tris-HCI 0,01M, pH8. Κατόπιν, διαβρέχουμε τη μεμβράνη διαπίδυσης με dH₂O για 2 λεπτά. Η μεμβράνη κλείνεται καλά, με κόμπο, από τη μία πλευρά και σχηματίζεται ένας μεμβρανοειδής ασκός, και με τη βοήθεια μιας πιπέτας τοποθετούμε το διάλυμα στο μεμβρανοειδή ασκό. Η μεμβράνη κλείνεται καλά και από την άλλη πλευρά. Έπειτα, τοποθετούμε τον ασκό στον ογκομετρικό κύλινδρο, που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCI 0.01M, pH8 και ακολουθεί ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα στους 4°C όλη τη νύχτα. Πραγματοποιούνται συνολικά 3 αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος, και έπειτα το διάλυμα με την αποΑ-Ι αποχύνεται σε σωλήνα τύπου falcon και φυλάσσεται στους 4 °C για να καθαριστεί όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.2 Καθαρισμός της αγρίου τύπου απολιποπρωτεΐνης Α-Ι (WT αποΑ-Ι) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής^[98]

3.2.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- HCI 4M (Merck). Χρησιμοποιείται για να ρυθμίσουμε το pH.
- Διάλυμα Tris-HCI (10x) 0.1M, pH 8.
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH4HCO3 (Riedel-de Haen).
- Διάλυμα Α: Tris-HCI (1x) 0.01M, pH8.
- Διάλυμα Β: NH₄HCO₃ 1M.
- Διάλυμα αναγέννησης της στήλης: NaCl 1M (Sigma-Aldrich) σε Tris-HCl 0.02M, pH 8.
 - (Σημείωση: Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται και απαερώνονται πριν χρησιμοποιηθούν).
- Αποστειρωμένα φίλτρα 0.22μm (Millipore).
- Φυγόκεντρος ΚUBOTA.

- Σύστημα Akta/FPLC (GE Healthcare).
- Στήλη ανιονανταλλαγής HiTrap Q HP 5mL (Amersham Biosciences).
- Superloop 50mL (GE Healthcare).
- Σύριγγα 20mL (TERUMO).
- Σωλήνες τύπου eppendorf 2mL.

3.2.2 Αρχή της μεθόδου

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με τη χρωματογραφία της ιοντικής ανταλλαγής στηρίζεται στην προσρόφηση φορτισμένων μορίων στις καθηλωμένες ομάδες του ιοντικού ανταλλάκτη οι οποίες φέρουν αντίθετο φορτίο. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω του ότι τα διαφορετικά μόρια έχουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλεπίδρασης με τον ιοντικό ανταλλάκτη εξαιτίας των διαφορών στα φορτία, στις πυκνότητες φορτίου και το διαχωρισμό των φορτίων στις επιφάνειές τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να ελεγχθούν με μεταβολή διαφόρων συνθηκών, όπως η ιοντική ισχύς και το pH.

Υπάρχουν δύο είδη ιοντικών ανταλλακτών, οι θετικά φορτισμένοι (ανιοντοανταλλάκτες) και οι αρνητικά φορτισμένοι (κατιοντοανταλλάκτες). Στην προκειμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ανιοντικός ανταλλάκτης της στήλης HiTrap Q HP που φέρει σα λειτουργική ομάδα την -Ν⁺(CH₃)₃. Οι ανιοντικοί ανταλλάκτες με τεταρτοταγείς αμινομάδες θεωρούνται πολύ ισχυροί λόγω του ότι ιοντίζονται πλήρως σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH.

Το πρώτο βήμα για τη χρήση της στήλης είναι η εξισορρόπηση της στατικής φάσης της στήλης στις επιθυμητές συνθήκες με τη χρήση του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί η έγχυση του διαλύματος των πρωτεΐνών μέσα στη στήλη. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η προσρόφηση των πρωτεΐνών στις φορτισμένες ομάδες της στήλης με διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης και η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων. Ακολουθεί η έκλουση, κατά την οποία οι πρωτεΐνες απελευθερώνονται από τον ιοντοανταλλάκτη με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με διαφορετική ιοντική ισχύ ή pH. Μόρια με μεγαλύτερη αλληλεπίδραση.

3.2.3 Πειραματική πορεία

Η WT αποΑ-Ι μετά τη διαπίδυση σε Tris-HCI 0.01Μ, pH8 φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C στα 6000g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται σε ένα νέο σωλήνα και το ίζημα (αν υπάρχει) απορρίπτεται. Πριν την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, η στήλη ανιονανταλλαγής HiTrap Q HP εξισορροπείται με 5 όγκους στήλης (25mL) και ροή 5mL/min με το διάλυμα Α. Έπειτα, ακολουθεί η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια του Superloop με ροή 1 mL/min. Πριν αρχίσει η έκλουση των πρωτεϊνών, η στήλη εκπλένεται με 5 όγκους στήλης διαλύματος Α. Η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη γίνεται με γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος Β για 15 όγκους στήλης (ροή 1 mL/min). Το πρόγραμμα έκλουσης παρουσιάζεται στον πίνακα (Πίνακας 3.1). Συλλέγονται 50 κλάσματα, όγκου 1.5mL το καθένα. Τα κλάσματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Τέλος, τα κλάσματα με καθαρότητα >95% σε αποΑ-Ι ενώνονται και ακολουθεί διαπίδυση σε Μετά το πέρας του καθαρισμού, η στήλη εκπλένεται με 5 NH₄HCO₃ 5mM. όγκους στήλης NH₄HCO₃ 1M, με 5 όγκους στήλης NaCl 1M σε Tris-HCl 0.02M, pH8 και τέλος εξισορροπείται με 5 όγκους στήλης Tris-HCI 0.01M, pH8. Έτσι, η στήλη είναι έτοιμη για νέα χρήση.

Πίνακας 3.1: Πρόγραμμα έκλουσης WT αποΑ-Ι από στήλη ανιοντοανταλλαγής HiTrap Q HP.

T(min)	%A	%В
0	100	0
75	0	100

Διαλύτης Α: Tris-HCl 0.01M, pH8. Διαλύτης Β: NH₄HCO₃ 1M. Ταχύτητα ροής: 1 mL/min.

3.3 Καθαρισμός της αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α] με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής^[98]

3.3.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- HCI 4M (Merck). Χρησιμοποιείται για να ρυθμίσουμε το pH.
- Ουρία [CO(NH₂)₂] (Penta).
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH4HCO3 (Riedel-de Haen).
- Διάλυμα Tris-HCI (10x) 0.1M, pH 8.
- Διάλυμα A1: Tris-HCI 0.01M-ουρία 8M, pH8.
- Διάλυμα B1: NH₄HCO₃ 1M-ουρία 8M.
- Διάλυμα αναγέννησης της στήλης: NaCl 1M (Sigma-Aldrich) σε Tris-HCl 0.02M.

(Σημείωση: Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται και απαερώνονται πριν χρησιμοποιηθούν).

- Αποστειρωμένα φίλτρα 0.22μm (Millipore).
- Φυγόκεντρος ΚUBOTA.
- Σύστημα Akta/FPLC (GE Healthcare).
- Στήλη ανιοντοανταλλαγής HiTrap Q HP 5mL (Amersham Biosciences).
- Superloop 50mL (GE Healthcare).
- Σύριγγα 20mL (TERUMO).
- Σωλήνες τύπου eppendorf 2mL.

3.3.2 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή μεθόδου για τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] (mut1) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι ίδια, όπως αυτή που ισχύει και για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αποΑ-Ι WT. Το μόνο που αλλάζει, είναι τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή, των διαλυμάτων έγινε επειδή ο καθαρισμός της αποΑ-Ι mut1 με τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμός της αποΑ-Ι mut1 με τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό της αποΑ-Ι WT δεν ήταν επιτυχής. Μετά από διάφορες δοκιμές που έγιναν, καταλήξαμε στη χρήση διαλυμάτων που περιέχουν ουρία. Η προσθήκη ουρίας καταστρέφει τους ομοιοπολικούς δεσμούς, προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών και ευνοεί το διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συσσωματώνονται και συνεκλούονται. Έτσι επιτυγχάνεται καθαρισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης.

3.3.3 Πειραματική πορεία

Μετά το τέλος της διαπίδυσης της πρωτεΐνης σε Tris-HCI 0.01Μ προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα ουρίας, ώστε η τελική συγκέντρωσή της στο διάλυμα να είναι 8Μ. Η πρωτεΐνη αφήνεται με την ουρία μία ώρα σε πάγο, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Έπειτα, η αποΑ-Ι mut1 φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C στα 6000g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται σε ένα νέο σωλήνα και το ίζημα (αν υπάρχει) απορρίπτεται. Πριν την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, η στήλη βαθμονομείται με 5 όγκους στήλης (25mL) και ροή 5mL/min με το διάλυμα Α1. Έπειτα, ακολουθεί η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια μιας σύριγγας και το δείγμα διέρχεται μέσω του υλικού πλήρωσης. Πριν αρχίσει η έκλουση, το δείγμα εκπλένεται με 25mL διαλύματος Α1. Η αποδέσμευση των πρωτεϊνών από τη στήλη γίνεται με τη χρήση του διαλύματος B1, το οποίο εισάγεται στη στήλη με αυξανόμενη συγκέντρωση (ροή 1 mL/min). Συλλέγονται 50 κλάσματα, όγκου 1.5mL το καθένα. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται ο καθαρισμός της αποΑ-Ι mut1 και αυτό αποτυπώνεται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες. Τέλος, τα κλάσματα με καθαρότητα >95% ενώνονται και τοποθετούνται για διαπίδυση σε NH4HCO3 5mM. Το πρόγραμμα έκλουσης παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2).

Μετά το πέρας του καθαρισμού, η στήλη ξεπλένεται με 5 όγκους στήλης NH₄HCO₃ 1M-ουρία 8M, με 5 όγκους στήλης NaCl 1M σε Tris-HCl 0.02M και τέλος εξισορροπείται με 5 όγκους στήλης Tris-HCl 0.01M, pH8. Έτσι, η στήλη είναι έτοιμη για νέα χρήση. Πίνακας 3.2: Πρόγραμμα έκλουσης αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] από στήλη ανιοντοανταλλαγής HiTrap Q HP.

T(min)	%A1	%B1
0	100	0
75	0	100

Διαλύτης Α1: Tris-HCl 0.01Μ-ουρία 8Μ, pH8. Διαλύτης B1: NH₄HCO₃ 1Μ-ουρία 8Μ. Ταχύτητα ροής: 1 mL/min.

3.4 Καθαρισμός της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής^[98]

3.4.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

Όπως στην παράγραφο 3.2.1.

3.4.2 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή μεθόδου για τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης μορφής πρωτεΐνης αποΑ- I[F225A/V227A/F229A/L230A] (mut2) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι ίδια, όπως αυτή που ισχύει και για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αποΑ-I WT (βλ. Παράγραφο 3.2.2).

3.4.3 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης μορφής πρωτεΐνης αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] (mut2) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι ακριβώς ίδια με αυτή που ακολουθείται για τον καθαρισμό της αποΑ-Ι αγρίου τύπου (βλ. Παράγραφο 3.2.3).

3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)^[99]

3.5.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

• M $\epsilon\theta\alpha\nu\delta\lambda\eta$, CH₃OH (Sigma-Aldrich).

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- HCI 4M (Merck). Χρησιμοποιείται για να ρυθμίσουμε το pH.
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου/Ν,Ν'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου 37.5:1,
 διάλυμα 30%(w/v) (Biorad).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1.5M, pH 8.8.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1M, pH 6.8.
- Διάλυμα 10% w/v δωδεκυλοθειϊκού vατρίου (SDS) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (APS) (Sigma-Aldrich).
 Φυλάσσεται στους -20 °C.
- Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) (Sigma-Aldrich).
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης.
- Πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) 10%. Αναμιγνύονται 3.3mL
 διαλύματος ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου με 2.5mL
 ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, 0.1mL 10% w/v SDS
 και 4mL H₂O. Στη συνέχεια, προσθέτονται 100μL διαλύματος APS 10%
 και 4μL TEMED.
- Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) 5%. Αναμιγνύονται 830μL διαλύματος ακρυλαμιδίου/Ν,Ν'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου, 630μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCI 1M, pH 6.8, 50μL διαλύματος SDS 10% και 3.4mL H₂O. Στη συνέχεια προστίθενται 50μL διαλύματος APS 10% και 5μL TEMED.
- 5x διάλυμα δείγματος (Laemmli sample buffer): 2.5mL 1M Tris-HCl pH
 6.8, 4mL γλυκερόλη, 0.8g SDS, 2mL 2-μερκαπτοαιθανόλη και 1mL
 κυανούν της βρωμοφαινόλης 1%. Ο τελικός όγκος του διαλύματος
 ρυθμίζεται στα 10mL με H₂O.
- 5x διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 15.1g Tris, 94g γλυκίνη, 5g SDS. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στο 1L με H₂O.
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (10-260 ή 14-116 KDa).
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10x8cm.

- Ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) για την ρύθμιση του πάχους της πηχτής (1.5mm).
- Ειδική χτένα για τον σχηματισμό των φρεατίων της πηκτής.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-protean II, Biorad.
- Τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

3.5.2 Αρχή της Μεθόδου

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται μετά από συμπολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου Jμ то αντιδραστήριο διασταύρωσης Ν,Ν΄-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου. Ενώ αυτά τα δυο αντιδραστήρια είναι σταθερά, με την προσθήκη APS δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ξεκινούν τον συμπολυμερισμό. Η όλη αντίδραση επιταχύνεται παρουσία ΤΕΜΕD, που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το APS. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθεται περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης και SDS, με αποτέλεσμα η μεν μερκαπτοαιθανόλη να ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν στις πρωτεΐνες, το δε SDS να ενώνεται στις σουλφυδρυλομάδες που προκύπτουν, αποδίδοντας έτσι ένα συνολικό αρνητικό φορτίο στο μόριο των πρωτεϊνών. Έχοντας ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο με βάση τη μοριακή τους μάζα. Παρασκευάζονται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου: η πρώτη είναι η πηκτή επιστοίβασης και η άλλη πηκτή διαχωρισμού. Η διαφορά αυτών έγκειται στο διαφορετικό μέγεθος πόρων της πηκτής, καθώς και στη διαφορά ρΗ και ιοντικής ισχύος. Η πηκτή επιστοίβασης διευκολύνει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μία στενή λωρίδα, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη είσοδο όλων των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

3.5.3 Πειραματική πορεία

Αρχικά ετοιμάζεται το sandwich ηλεκτροφόρησης που δημιουργείται μετά την τοποθέτηση ειδικών διαχωριστικών ταινιών ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες. Στη συνέχεια τοποθετείται ειδική χτένα, ευθυγραμμίζεται και σημειώνεται 1cm από το κάτω άκρο της. Είναι το σημείο μέχρι το οποίο θα φτάσει η στάθμη της πηκτής διαχωρισμού. Μετά την παρασκευή του μίγματος

της πηκτής διαχωρισμού, αυτό τοποθετείται στο ενδιάμεσο χώρο των δυο πλακών του sandwich ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30-40min. Η πηκτή διαχωρισμού καλύπτεται με H₂O για να αποφευχθούν τυχόν φουσκάλες αέρα. Στη συνέχεια (αφού αφαιρεθεί το H₂O) προστίθεται η πηκτή επιστοίβασης μέχρι πάνω και τοποθετείται η κτένα. Μετά από 30min πολυμερισμού απομακρύνεται η χτένα και ξεπλένονται τα φρεάτια που έχουν σχηματιστεί με H₂O. Τα φρεάτια είναι ο χώρος τοποθέτησης των δειγμάτων. Τα δείγματα, πριν τοποθετηθούν στην πηκτή, υπόκεινται στην παρακάτω διαδικασία: προστίθεται διάλυμα δείγματος σε αναλογία 4:1 και θερμαίνονται για 5min στους 100⁰C. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Τέλος προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης στην άνω και στην κάτω μονάδα της συσκευής. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 120V και διαρκεί 1.5 h περίπου.

3.6 Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-Ι^[100]

3.6.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Υδροχλωρική γουανιδίνη, GndHCI (Applichem).
- Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca²⁺ or Mg²⁺ (10x), (DPBS, Lonza-whittaker).
- Διάλυμα GndHCl 8M σε DPBS 1x.
- Δις αποσταγμένο (dd) H₂O.
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12kDa (Sigma-Aldrich).
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Labtech).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Biofuge Fresco, Heraus).
- Φασματοφωτόμετρο (Nanodrop, ND-1000).

3.6.2 Αρχή της μεθόδου

Η υδροχλωρική γουανιδίνη είναι ένας ισχυρός παράγοντας αποδιάταξης που χρησιμοποιείται ευρέως στις βιοφυσικές μελέτες πρωτεϊνών. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη διάσπαση και την πιθανή καταστροφή τόσο της δευτεροταγούς (α-έλικα, β-φύλλα κ.λπ.) όσο και της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Δεδομένου, ότι οι αντιδράσεις αποδιάταξης δεν είναι αρκετά ισχυρές ώστε να σπάσουν τους πεπτιδικούς δεσμούς, η πρωτοταγής δομή (αλληλουχία αμινοξέων) παραμένει η ίδια μετά από μια διαδικασία αποδιάταξης.

Η αποδιάταξη συμβαίνει επειδή διαταράσσονται οι αλληλεπιδράσεις σύνδεσης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή. Οι δεσμοί που διαταράσσονται είναι οι εξής: δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες άλατος και μη πολικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η πιο κοινή παρατήρηση στη διαδικασία αποδιάταξης είναι η κατακρήμνιση ή η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης.

Στην παρούσα εργασία, η υδροχλωρική γουανιδίνη χρησιμοποιείται, ώστε να αποδιαταχθεί η πρωτεΐνη, και στη συνέχεια μέσω της διαπίδυσης να επαναδιαταχθεί κατάλληλα ενώ όσα μόρια πρωτεΐνης δεν έχουν επαναδιαταχθεί απομακρύνονται με τη μορφή ιζήματος.

3.6.3 Πειραματική πορεία

Πριν από όλες τις αναλύσεις, τα λυοφιλοποιημένα αποθέματα της άγριου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-Ι διαλύονται σε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.2mg/ml σε DPBS 1x-GndHCl 8M. Τα δείγματα πρωτεΐνης επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι DPBS 1x (3 αλλαγές, μία εκ των οποίων, όλη νύχτα). Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στα 13000 rpm, στους 4 °C, για να κατακρημνιστεί τυχόν ίζημα πρωτεΐνης. Στα υπερκείμενα διαλύματα γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm (ε_{wt}=1.310 mg⁻¹ cm⁻¹/mL, ε_{mut1}=1.317 mg⁻¹ cm⁻¹/mL, ε_{mut2}=1.320 mg⁻¹ cm⁻¹/mL, ε_{mut4}=1.315 mg⁻¹ cm⁻¹/mL). Οι πρωτεΐνες διατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (~ 0.1 mg/ml) στον πάγο για να αποφευχθεί τυχόν συσσωμάτωση. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε πρόσφατα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη.

3.7 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού^[101-104]

3.7.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1mm (Hellma Analytics).
- Φασματοπολωσίμετρο (Jasco-715).
- Θερμοστάτης (Jasco PTC-348 WI Peltier).

3.7.2 Αρχή της μεθόδου

Ως κυκλικός διχρωϊσμός (CD) ορίζεται η άνιση απορρόφηση του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από τις χειρόμορφες ουσίες. Μία δέσμη φωτός έχει εξαρτώμενα από το χρόνο ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία που σχετίζονται με αυτό. Εάν το φως είναι πολωμένο, περνώντας μέσα από κατάλληλα πρίσματα ή φίλτρα το ηλεκτρικό του πεδίο θα ταλαντεύεται ημιτονοειδώς σε ένα μόνο επίπεδο. Όταν παρατηρείται από μπροστά, το ημιτονοειδές κύμα μπορεί να απεικονιστεί ως η συνισταμένη δύο διανυσμάτων ίσου μήκους που χαράσσουν κύκλους, και το ένα κύμα περιστρέφεται δεξιόστροφα (ER) ενώ το άλλο αριστερόστροφα (EL). Τα δύο κυκλικά πολωμένα κύματα έχουν φυσική ύπαρξη. Τα κύματα είναι εκτός φάσεως 90 μοίρες το ένα με το άλλο, και μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας μία ποικιλία πρισμάτων και ηλεκτρονικών συσκευών. Όταν ασύμμετρα μόρια αλληλεπιδρούν με το φως μπορούν να απορροφήσουν δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως σε διαφορετικό βαθμό, και επίσης να έχουν διαφορετικούς δείκτες διάθλασης για τα δύο κύματα. Το αποτέλεσμα είναι ότι το επίπεδο του κύματος φωτός περιστρέφεται και η προσθήκη των διανυσμάτων ER και EL οδηγεί σε ένα διάνυσμα που χαράσσει έλλειψη και το φως λέγεται ότι είναι ελλειπτικά πολωμένο. Ο κυκλικός διχρωϊσμός μετράται, σε βαθμούς ελλειπτικότητας, ως η διαφορά στην απορρόφηση του δεξιόστροφα από το αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός (ΔΕ=ER-EL) από ένα ασύμμετρο μόριο, η οποία ορίζεται ως η γωνία της οποίας η εφαπτομένη είναι ο λόγος του δευτερεύοντος άξονα προς τον κύριο άξονα της έλλειψης. Η μοριακή ελλειπτικότητα δίνεται από τον τύπο: [θ]=3298ΔΕ και εκφράζεται σε μονάδες: degrees.cm²/dmoles.

Τα φάσματα των πρωτεϊνών που καταγράφονται με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωϊσμού στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας συνήθως χωρίζονται στην «εγγύς» και στην «άπω» υπεριώδη περιοχή. Η εγγύς υπεριώδης περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος 250-300nm και ονομάζεται και αρωματική περιοχή επειδή σε αυτή την περιοχή απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των αρωματικών αμινοξέων. Η άπω υπεριώδης περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος <250nm και σε αυτή την περιοχή απορροφά κυρίως ο πεπτιδικός κορμός μίας πρωτεΐνης.

Ο πεπτιδικός κορμός μίας πρωτεΐνης απορροφά στην άπω UV περιοχή λόγω του ότι υπάρχουν μη δεσμικά ηλεκτρόνια σε άτομα οξυγόνου και αζώτου, π ηλεκτρόνια, τα οποία διαχέονται σε κάποιο βαθμό πάνω από τα άτομα του άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου και σ δεσμικά ηλεκτρόνια. Η μικρότερη ενεργειακή μετάπτωση του πεπτιδικού κορμού είναι η μετάπτωση $n \rightarrow \pi^*$ η οποία συμβαίνει σε μήκη κύματος 210-230nm και έχει ως αποτέλεσμα την πόλωση του καρβονυλικού δεσμού. Η μεγαλύτερη ενεργειακή μετάπτωσης εμφανίζεται μεταξύ των ατόμων αζώτου και οξυγόνου και συμβαίνει περίπου σε μήκος κύματος 190nm.

Η τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού εφαρμόζεται στην μελέτη της δομής και της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών προκειμένου να εξαχθούν πληροφορίες αναφορικά με τα δομικά μοτίβα (α-έλικα, β-φύλλο, β-στροφή, τυχαίο σπείραμα) που υπάρχουν σε μία πρωτεΐνη. Ο τρόπος υπολογισμού των δομικών μοτίβων π.χ. ποσοστό του δομικού μοτίβου α-έλικας σε μία εξεταζόμενη πρωτεΐνη, είναι κατά κύριο λόγο εμπειρικός και στηρίζεται στην μορφή που έχουν τα φάσματα του κυκλικού διχρωϊσμού για κάθε μία από τις διαμορφώσεις που αναφέρθηκαν πριν σε κάθε πρωτεΐνη γνωστής δομής (Σχήμα 3.1).

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η δευτεροταγής διαμόρφωση της απολιποπρωτεΐνης Α-Ι χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό α-έλικας. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της α-έλικας χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας ευρείας και μεγάλης σε ένταση αρνητικής περιοχής με δύο ελάχιστες τιμές ίδιας έντασης, σε μήκος κύματος 222nm και 208nm. Το ελάχιστο σε μήκος κύματος 222nm οφείλεται σε μετάπτωση $n \rightarrow \pi^*$ ενώ το ελάχιστο σε

71
μήκος κύματος 208nm οφείλεται σε μέρος της μετάπτωσης $\pi \rightarrow \pi^*$ της οποίας η πόλωση είναι παράλληλη στον άξονα της α-έλικας. Οι $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των πεπτιδικών δεσμών μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας βρίσκονται σε σύζευξη. Ακόμη, παρατηρείται ένα θετικό σήμα σε μήκος κύματος 190nm για μία μετάπτωση της οποίας η πόλωση είναι κάθετη στον άξονα της α-έλικας. Άλλα δομικά μοτίβα δεν δείχνουν τέτοιο διαχωρισμό της $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωσης. Σαν μοντέλο α-έλικας χρησιμοποιείται διάλυμα πεπτιδίου πολυ-L-λυσίνης σε υδατικό διάλυμα.

Όπως αναφέρθηκε η ένταση του φάσματος του κυκλικού διχρωϊσμού της α-έλικας είναι μεγάλη. Αυτό το χαρακτηριστικό την κάνει ευδιάκριτη στο φάσμα μίας πρωτεΐνης. Για αυτό το λόγο, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για τον καθορισμό της δευτεροταγούς δομής της αποΑ-Ι.



Εικόνα 3.1: Χαρακτηριστικές δομές φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού πρωτεϊνών που περιέχουν τα δομικά χαρακτηριστικά, α-έλικα, β-φύλλο, τυχαίο σπείραμα, και βστροφή.

3.7.3 Πειραματική πορεία

Για να καταγράψουμε το φάσμα του CD στην άπω UV περιοχή των δειγμάτων της αποΑ-Ι από τα 190-260nm στους 25°C χρησιμοποιούμε το φασματοπολωσίμετρο Jasco-715. Το όργανο συνδέεται με ένα θερμοστάτη Jasco PTC-348 WI Peltier, που ελέγχει τη θερμοκρασία στο θάλαμο που βρίσκεται η κυψελίδα. Χρησιμοποιούμε κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1mm. Τα δείγματα πρωτεϊνών έχουν συγκέντρωση 0.1mg/mL σε DPBS (pH 7.4). Οι παράμετροι μέτρησης ήταν οι ακόλουθες: εύρος ζώνης 1nm, απόκριση 8sec, μέγεθος βήματος 0.2nm και ταχύτητα σάρωσης 50nm/min. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 5 λήψεων. Τα αποτελέσματα διορθώνονται, αφαιρώντας το υπόβαθρο απορρόφησης του ρυθμιστικού διαλύματος. Το ποσοστό της α-έλικας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη μοριακή ελλειπτικότητα στα 222nm, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία από τον Greenfield^[105] με βάση την εξίσωση:

% α -helix_{222nm}=([Θ]₂₂₂+3000)/(36000+3000)x100.

3.8 Θερμική Αποδιάταξη^[106;107]

3.8.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1mm (Hellma Analytics).
- Φασματοπολωσίμετρο (Jasco-715).
- Θερμοστάτης (Jasco PTC-348 WI Peltier).

3.8.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου και τις μη πολικές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Αυτό συμβαίνει διότι, η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την κινητική ενέργεια των μορίων, και τα μόρια εξαναγκάζονται να δονούνται τόσο γρήγορα, που αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαταράσσονται οι δεσμοί και να αποδιατάσσεται η πρωτεΐνη.

3.8.3 Πειραματική πορεία

Για να καταγράψουμε το προφίλ της θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης, παρακολουθούμε την αλλαγή της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222nm, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία σε ένα εύρος τιμών από 20-80°C με ρυθμό 1°C/min. Η καμπύλη της θερμικής αποδιάταξης που λαμβάνεται από το CD προσαρμόζεται σε ένα μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης Boltzman χρησιμοποιώντας το λογισμικό Graphpad Prism. Η θερμοκρασία τήξης (Tm) στο μέσο (όπου υπάρχει ίσος πληθυσμός μορίων σε διαταγμένη και αποδιαταγμένη μορφή) της μετάβασης από την πλήρως διαταγμένη δομή της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη, καθώς και η αλλαγή στη σχετική ενθαλπία (ΔΗν), καθορίζονται με μία συμβατική ανάλυση van't Hoff, με την παραδοχή του μοντέλου αποδιάταξης δύο σταδίων, με τις γραμμές αναφοράς που ελήφθησαν με γραμμική προέκταση των προ- και μεταμεταβατικών περιοχών. Στην περιοχή μετάβασης για κάθε θερμοκρασία, η φαινόμενη σταθερά ισορροπίας (Keq) καθορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

 $Keq(T)=(\Theta F \cdot \Theta obs(T))/(\Theta obs(T) \cdot \Theta U),$

Όπου: Θobs(T) είναι η παρατηρούμενη ελλειπτικότητα, και ΘF και ΘU είναι οι γραμμές αναφοράς της πλήρως διατεταγμένης δομής και της αποδιατεταγμένης αντίστοιχα.

Κατασκευάζουμε το διάγραμμα InKeq συναρτήσει της 1/Τ. Από το διάγραμμα, υπολογίζεται η κλίση και η τομή με τον άξονα χ (όταν Keq=1), οι οποίες παρέχουν τις τιμές ΔΗν και Tm αντίστοιχα, σύμφωνα με την εξίσωση:

 $InKeq = \Delta S/R - (\Delta Hv/R) \times 1/T$,

Όπου: Τ είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin,

R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1.98 cal/molK) και

ΔS είναι η εντροπία της μετάβασης.

Ο δείκτης συνεργιστικότητας, n, ο οποίος περιγράφει τη σιγμοειδή μορφή της καμπύλης της θερμικής αποδιάταξης υπολογίζεται με την εφαρμογή της εξίσωσης Hill, n=(log81)/log(T_{0.9}/T_{0.1}), όπου T_{0.1} και T_{0.9} είναι οι θερμοκρασίες όπου η αποδιάταξη της πρωτεΐνης έχει ολοκληρωθεί κατά κλάσμα 0.1 και 0.9, αντίστοιχα^[108].

3.9 Χημική Αποδιάταξη^[106;109]

3.9.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Διάλυμα GndHCl 8M-DPBS 1x.
- Κυψελίδα χαλαζία φθορισμού, χωρητικότητας 4mL (Hellma Analytics).
- Φθορισμόμετρο (Photon Technology International-QuantaMaster 4).
- Ρυθμιστικό διάλυμα: DPBS (1x) pH 7.4.

3.9.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός, ότι η υδροχλωρική γουανιδίνη διασπά τους δεσμούς υδρογόνου, τις γέφυρες άλατος και τις μη πολικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και καταστρέφει τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η αποδιάταξη της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τιτλοδότηση με υδροχλωρική γουανιδίνη. Για να παρακολουθήσουμε τη χημική αποδιάταξη της πρωτεΐνης καταγράφουμε τον εγγενή φθορισμό των καταλοίπων θρυπτοφάνης. Η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι που αποτελείται από 249 κατάλοιπα αμινοξέων, φέρει στο μόριό της 5 κατάλοιπα θρυπτοφάνης (W), που βρίσκονται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Καθώς αποδιατάσσεται η πρωτεΐνη, τα κατάλοιπα της θρυπτοφάνης αποκαλύπτονται και εκτίθενται περισσότερο στο υδρόφιλο περιβάλλον του διαλύματος.

3.9.3 Πειραματική πορεία

Για να καταγράψουμε το προφίλ της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι, 1,5mL πρόσφατα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης συγκέντρωσης 0.1mg/mL προστίθεται σε κυψελίδα χαλαζία φθορισμού 4mL και ο εγγενής φθορισμός των καταλοίπων θρυπτοφάνης μετράται σύμφωνα με τις ακόλουθες παραμέτρους: διέγερση στα 295nm, και λήψη του φάσματος από τα 310-420nm. Μικρές ποσότητες διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης 8.0M προστίθενται σταδιακά στην κυψελίδα. Το διάλυμα αναμιγνύεται για 10s. Μετά από κάθε προσθήκη ποσότητας υδροχλωρικής γουανιδίνης το διάλυμα επωάζεται στο σκοτάδι για 2 λεπτά πριν από τη μέτρηση του σήματος φθορισμού. Η τιτλοδότηση συνεχίζεται έως ότου περίπου 4M τελικής συγκέντρωσης υδροχλωρικής γουανιδίνης έχουν προστεθεί στην κυψελίδα. Παράλληλα, πραγματοποιείται τιτλοδότηση του σήματος φθορισμού.

Η καμπύλη της χημικής αποδιάταξης προσαρμόζεται σε ένα μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης Boltzman χρησιμοποιώντας το λογισμικό Graphpad Prism. Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της φυσικά διαταγμένης πρωτεΐνης και της αποδιατεταγμένης μορφής (διαμορφωτική σταθερότητα) ΔG_D°, η συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης D_{1/2} στο μέσο της μετάβασης από την πλήρως διαταγμένη δομή της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη, και η τιμή m που αντικατοπτρίζει την κλίση της καμπύλης αποδιάταξης στη μεταβατική περιοχή, υπολογίζονται χρησιμοποιώντας μία μέθοδο γραμμικής προεκβολής (linear extrapolation), υποθέτοντας ότι ακολουθείται το μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων^[110]. Η φαινόμενη σταθερά ισορροπίας, K_{eq}, υπολογίζεται με βάση το μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού για κάθε συγκέντρωση GndHCI. Κατασκευάζεται το διάγραμμα της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs, ΔG_D =-RTInK_{eq} (όπου T είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,98 cal/molK), συναρτήσει της συγκέντρωσης GndHCI, [D]. Από το διάγραμμα υπολογίζεται οι τιμές των ΔG_D° , D_{1/2} (όταν Keq=1) και m με βάση την εξίσωση: ΔG_D = ΔG_D° m[D].

3.10 Μέτρηση φθορισμού του ANS^[106;111]

3.10.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- 8-ανιλινο-1-ναφθάλινο-σουλφονικό, ANS (Sigma-Aldrich).
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO (Sigma-Aldrich).
- Ρυθμιστικό διάλυμα: DPBS (1x) pH 7.4.
- Μετρητής απορρόφησης-φθορισμού πλακιδίων (TECAN Infinite® M200).

3.10.2 Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός του ANS παρουσία της μη λιπιδιωμένης μορφής της αποΑ-Ι αγρίου τύπου, καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-Ι μετράται για να προσδιοριστεί εάν οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την έκθεση των υδρόφοβων περιοχών της αποΑ-Ι.

Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση του εγγενούς φθορισμού του ANS. Έχει δειχθεί, ότι η ένταση του φθορισμού του ANS είναι ενισχυμένη και μετατοπισμένη προς το μπλε, κατά τη σύνδεσή του με υδρόφοβες επιφάνειες. Αντίθετα, σε επαφή με υδατικό διάλυμα το ANS δε συμβάλλει στην εκπομπή. Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών η ένταση φθορισμού του ANS είναι χαμηλή και εμφανίζει μέγιστο εκπομπής στα 517nm.

3.10.3 Πειραματική πορεία

Το ANS διαλύεται σε DMSO σε τελική συγκέντρωση 50mM και φυλάσσεται στους -20°C. Σε πηγάδια πλακιδίου 96-θέσεων εισάγονται 160μL πρόσφατα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης άγριου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-Ι συγκέντρωσης 0.1mg/mL σε DPBS 1x pH 7.4. Πραγματοποιείται διέγερση των δειγμάτων στα 395nm και λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού στα 425-600nm. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστίθεται 1μL διαλύματος ANS (η τελική συγκέντρωση του ANS είναι 310μM) και λαμβάνεται πάλι το φάσμα φθορισμού. Επίσης, καταγράφεται το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης, ώστε να επιτραπεί ο υπολογισμός της ενίσχυσης του σήματος φθορισμού του ANS παρουσία της πρωτεΐνης.

3.11 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς μακροφάγων ποντικού J774^[13]

3.11.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774.
- Θρεπτικό υλικό καλλιεργειών Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει ultraglutamine 1 και 4.5g/L γλυκόζη (Bio Whittaker, Lonza).
- Αντιβιοτικά: διάλυμα πενικιλίνης (100U/ml) και στρεπτομυκίνης (100µg/mL) (Sigma).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Sigma).
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας επιφάνειας 75cm² (Greiner).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon των 15 και 50mL (Greiner).
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 2, 5, 10, 20 και 50mL (Greiner).
- Αποστειρωμένες σύριγγες.
- Αποστειρωμένες πιπέτες.
- Αποστειρωμένα φίλτρα πόρων μεγέθους 0.22μm (Millipore).
- Αποστειρωμένα εξαρτήματα αποκόλλησης κυττάρων (ξύστρες) (Greiner).

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safeth Cabinets).
- Επωαστήρας ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37°C (Thermo Scientific).
- Υδατόλουτρο 37 °C.
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος.

3.11.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας μακροφάγων: Στο διάλυμα DMEM προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) ώστε η συνολική συγκέντρωσή τους να είναι 1% (v/v) και FBS σε συγκέντρωση 10% (v/v).

3.11.3 Ανάπτυξη των καλλιεργειών μακροφάγων J774

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φιάλη καλλιέργειας 75 cm² που περιέχει 15 mL θρεπτικού υλικού DMEM/FBS 10% (v/v), 100U/mL πενικιλίνη και 100µg/mL στρεπτομυκίνη. Χαλαρώνεται το καπάκι της φιάλης (ώστε να επιτρέπεται η είσοδος 5% (v/v) CO₂ σε αέρα) και τοποθετείται στον επωαστήρα 5% (v/v) CO2, στους 37°C. Ανά δύο ή τρεις μέρες, ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξής τους, απορρίπτεται το μέσο και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό μακροφάγων. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί μέχρι το 90% της κατάστασης συμβολής γίνεται ανακαλλιέργεια αυτών. Γίνεται αποκόλληση των μακροφάγων από τον πυθμένα της φιάλης με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων. Παραλαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων, γίνεται αραίωση του κυτταρικού πληθυσμού συνήθως 1:4 σε φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM/FBS/πεν./στρεπτ. Έπειτα η καλλιέργεια κυττάρων τοποθετείται σε νέα φιάλη καλλιέργειας. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται για 2-3 μήνες.

3.13 Εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1^[13]

3.13.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

• Μακροφάγα ποντικού J774.

- Δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) (Greiner bio-one/CELLSTAR).
- Θρεπτικό υλικό καλλιεργειών Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει ultraglutamine 1 και 4.5g/L γλυκόζη (Bio Whittaker, Lonza).
- Αντιβιοτικά: διάλυμα πενικιλίνης 100U/mL και στρεπτομυκίνης 100μg/mL (Sigma).
- Ορός εμβρύου βοός, FBS (Sigma-Aldrich).
- Αλβουμίνη από ορό βοός, BSA, ελεύθερη λιπαρών οξέων, κατάλληλη για καλλιέργεια κυττάρων (Sigma-Aldrich).
- Αποστειρωμένα εξαρτήματα αποκόλλησης κυττάρων (ξύστρες) (Greiner).
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon των 15 και 50 mL (Greiner).
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 2, 5, 10, 20 και 50 mL (Greiner).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safeth Cabinets).
- Υδατόλουτρο 37 °C.
- Επωαστήρας ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37°C (Thermo Scientific).
- Αιθανόλη 100% (Merck).
- Διάλυμα [4-¹⁴C]χοληστερόλης 0.1mCi/mL, ειδικής δραστικότητας 50 mCi/mmol σε αιθανόλη (ARC).
- Ζυγός Sartorius TE 64.
- cpt-cAMP (8-(4chlorophenylthio) adenosine 3':5'-cyclic monophosphate sodium salt) (Sigma-Aldrich).
- Σωλήνες τύπου eppendorf.
- Φυγόκεντρος BIOFUGE fresco Heraeus.
- Triton X-100 (Merck).

- DPBS (1x) pH 7.4.
- Υγρό σπινθηρισμού.
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

3.13.2 Παρασκευή διαλυμάτων

- Θρεπτικό διάλυμα DMEM/πεν-στρ: Στο διάλυμα DMEM προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) ώστε η συνολική συγκέντρωσή τους να είναι 1% (v/v).
- Διάλυμα 10% (w/v) BSA/DMEM/πεν-στρ: Σε διάλυμα που περιέχει DMEM και αντιβιοτικά προσθέτουμε κατάλληλα ποσότητα BSA, ώστε η συγκέντρωσή της στο διάλυμα να είναι 10% (w/v).
- Διάλυμα 0.2% (w/v) BSA/DMEM/πεν-στρ: Από το διάλυμα 10% (w/v) BSA/DMEM/πεν-στρ με κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα DMEM/πενστρ φτιάχνουμε διάλυμα συγκέντρωσης 0.2% (w/v) BSA/DMEM/πενστρ.
- Διάλυμα επισήμανσης: Χρησιμοποιούμε 3μL διαλύματος [4-¹⁴C]χοληστερόλης/mL. Η ποσότητα αυτή εξατμίζεται με αέριο N₂ και η χοληστερόλη αναδιαλύεται σε αιθανόλη 100% 0.5 μL/πηγάδι, προστίθεται 1μL 10% BSA/DMEM/πεν-στρ /πηγάδι και ακολουθεί καλή ανάδευση. Τελικά προστίθενται 0.4mL 0.2% BSA/DMEM/πεν-στρ /πηγάδι.
- Διάλυμα cpt-cAMP 0.3mM: Διαλύουμε συγκεκριμένη ποσότητα cptcAMP ώστε η συγκέντρωση να είναι 0.3mM σε διάλυμα που περιέχει 0.2% (v/v) BSA/ DMEM/πεν-στρ.
- Υγρό σπινθηρισμού: 11g PPO (2,5-διφαινυλοξαζόλιο) (Sigma-Aldrich), 0.2g POPOP (1,4-δι[2-(5-φαινυλοξαζολυλο)]-βενζόλιο) (Fluka), 1266mL τολουόλιο. Αυτά τα τρία συστατικά επωάζονται όλη τη νύχτα και την υπόλοιπη μέρα προσθέτονται 660mL Triton X-100.

3.13.3 Αρχή της μεθόδου

Η εκροή χοληστερόλης, καθώς και των φωσφολιπιδίων, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 πραγματοποιείται κυρίως με την αλληλεπίδραση του μεταφορέα με την ελεύθερη λιπιδίων απολιποπρωτεΐνη A-I, η οποία δεσμεύει βαθμιαία λιπίδια. Για τον υπολογισμό της ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης χρησιμοποιούνται μακοφάγα ποντικού J774 στα οποία η έκφραση του μεταφορέα επάγεται μέσω του αναλόγου του cAMP, cpt-cAMP.

3.13.4 Πειραματική πορεία

Κύτταρα J774 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών σε πυκνότητα που να καλύπτει το 40% της συνολικής επιφάνειας κάθε πηγαδιού σε 0.5mL θρεπτικό μέσο (DMEM/FBS 10% (v/v) και 1% (v/v) αντιβιοτικά) (Ημέρα 0). Μετά από 48 ώρες επώασης στους 37°C, αφαιρείται από τα κύτταρα το θρεπτικό μέσο, προστίθενται 0.4mL διαλύματος επισήμανσης και τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 24 ώρες στους 37°C (Ημέρα 2). Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα επισήμανσης από τα κύτταρα, προστίθενται 0.4mL διαλύματος cpt-cAMP και τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 24 ώρες στους 37°C (Ημέρα 3). Κατόπιν, αφαιρείται το διάλυμα cpt-cAMP από τα κύτταρα, προστίθενται 0.4mL διαλύματος 0.2% (w/v) BSADMEM/πεν-στρ παρουσία ή απουσία WT ή μεταλλαγμένης αποΑ-Ι (αποδέκτης της χοληστερόλης) σε συγκέντρωση 1μΜ (28µg/mL) (Ημέρα 4). Τα κύτταρα επωάζονται για 4 ώρες στους 37°C και κατόπιν συλλέγεται το μέσο και τα κύτταρα. Το μέσο των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 8000rpm για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που αιωρούνται. Τα κύτταρα στους δίσκους καλλιέργειας λύονται υπό ανάδευση με 0.4mL PBS/1% Triton-X100, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, λαμβάνονται 200μL από το μέσο των κυττάρων και 200μL από το λύμα των κυττάρων, προστίθενται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5mL υγρό σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Το ποσοστό της εξερχόμενης από τα κύτταρα [¹⁴C]-χοληστερόλης υπολογίζεται διαιρώντας τις κρούσεις που μετρήθηκαν στο μέσο των κυττάρων με το σύνολο των κρούσεων του μέσου των κυττάρων και κυτταρικού λύματος. Για τον υπολογισμό της καθαρής cptcAMP-(ABCA1-) εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επωάστηκαν με το cpt-cAMP, αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επωάστηκαν με cpt-cAMP.

3.14 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών^[112;113]

3.14.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Υγρό σπινθηρισμού: 0.2g POPOP (1,4-δι[2-(5-φαινυλοξαζολυλο)]βενζόλιο (Fluka), 11g PPO (2,5-διφαινυλοξαζόλιο) (Sigma-Aldrich), 1266mL Τολουόλιο (Merck). Ακολουθεί καλή ανάδευση του μίγματος και ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη μέρα προστίθενται 660mL Triton X-100 (Merck).
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).
- Καταγραφέας Epson LX-300+.

3.14.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση της ραδιενέργειας γίνεται με την τεχνική σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counting), στην οποία η ραδιενεργή ακτινοβολία μετράται δευτερογενώς. Το ραδιενεργό δείγμα περιέχει κάποιο ισότοπο (¹⁴C), το οποίο εκπέμπει β⁻ σωματίδια και τοποθετείται σε ένα «κοκτέιλ» σπινθηρισμού. Το «κοκτέιλ» σπινθηρισμού περιέχει: α) το διαλύτη (S, τολουόλιο) που απορροφά μέρος της ακτινοβολίας των εκπεμπόμενων β⁻ σωματιδίων και διεγείρεται, β) τον πρωταρχικό σπινθηριστή που είναι μια φθορίζουσα ουσία (F₁, PPO), στην οποία μεταφέρεται η διέγερση του διαλύτη και γ) έναν δευτερεύοντα σπινθηριστή (F₂, POPOP), ο οποίος απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει ο πρωταρχικός σπινθηριστής και εκπέμπει φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος, τα οποία ανιχνεύονται καλύτερα από το φωτοπολλαπλασιαστή του ειδικού θαλάμου μέτρησης ραδιενέργειας. Η σειρά των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα είναι η εξής:

$^{14}C_6 \longrightarrow {}^{14}N_7 + \beta^-$	β- + S → S* + (β - E)	
$S^* + F_1 \longrightarrow F_1^* + S$	$F_1 \xrightarrow{*} F_1 + hv_1$	
$hv_1 + F_2 \rightarrow F_2^*$	$F_2^* \rightarrow F_2 + hv_2$	

Τέλος, η ακτινοβολία αποδιέγερσης των φθοριζουσών ουσιών που ανιχνεύεται και η οποία είναι ανάλογη προς την ενέργεια των β⁻ σωματιδίων που απορροφήθηκε, καταγράφεται ως ο αριθμός των κρούσεων ανά λεπτό (cpm, counts per minute).

3.14.3 Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5mL υγρό σπινθηρισμού τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα του υπό μέτρηση δείγματος, ακολουθεί έντονη ανάδευση και μετράται η ραδιενέργεια στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

3.15 Προσδιορισμός πρωτέΐνης κατά Lowry^[114]

3.15.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

Kit (Biorad) που περιέχει:

250mL Αντιδραστήριο Α (αλκαλικό διάλυμα χαλκού).

2L Αντιδραστήριο B (αραιό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu).

- Αλβουμίνη ορού βοός, BSA (Sigma-Aldrich). Φτιάχνονται πρότυπα διαλύματα BSA αυξανόμενων συγκεντρώσεων σε PBS 1x (0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL).
- DPBS 1x (LONZA, Whittaker).
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής απορρόφησης-φθορισμού πλακιδίων (TECAN Infinite® M200).

3.15.2 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στο γεγονός ότι ο Cu²⁺ σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζει σύμπλοκα ιώδους χρώματος με τους

πεπτιδικούς δεσμούς και ανάγεται προς Cu⁺. Στη συνέχεια, με την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu γίνεται αναγωγή των μολυβδαινικών και των βολφραμικών ιόντων, που περιέχονται σε αυτό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό έντονου μπλε προϊόντος. Η εμφάνιση χρώματος οφείλεται κυρίως στα αμινοξέα Tyr και Trp και σε μικρότερο βαθμό στην His και Cys. Το μέγιστο της απορρόφησης είναι στα 750nm, ενώ το ελάχιστο στα 405nm.

3.15.3 Πειραματική πορεία

Αναμιγνύονται καλά 5μL προτύπων διαλυμάτων ή 5μL δείγματος με 25μL αντιδραστηρίου Α και 200μL αντιδραστηρίου Β. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το PBS (5 μL). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15min και μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm.

3.16 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)^[115;116]

3.16.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- L-α φωσφατιδυλοχολίνη, egg-PC: 20mg egg-PC/mL σε CHCl₃-CH₃OH (2:1) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα χολικού νατρίου 30mg/mL σε SB (βλέπε παρακάτω) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα χοληστερόλης 2mg/mL σε CHCl₃-CH₃OH (2:1) (Sigma-Aldrich).

[4-¹⁴C]χοληστερόλη 0.1mCi/mL, ειδική δραστικότητα 50mCi/mmol σε αιθανόλη (ARC). (Σημείωση: Προστίθεται μόνο για τα πειράματα προσδιορισμού δραστικότητας του ενζύμου LCAT).

- Διάλυμα WT ή μεταλλαγμένης αποΑ-Ι σε SB συγκέντρωσης περίπου 2mg/ml.
- Χλωροφόρμιο, CHCl₃ (Riedel de Haen).
- M $\epsilon\theta\alpha\nu\delta\lambda\eta$, CH₃OH (Sigma-Aldrich).
- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- NaCl (Sigma-Aldrich).
- EDTA (Riedel de Haen).

- Ρυθμιστικό διάλυμα, Salt Buffer (SB) 10x (100mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 0,1% EDTA, pH 8).
- SB 1x (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.01% EDTA, pH 8).
- PBS 1x (LONZA, Whittaker).
- Κυκλο-αναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific Industries).
- Γυάλινα σωληνάρια.
- Οβίδα Ο_{2.}
- Μεμβράνη διαπίδυσης πόρων 12kDa (Sigma-Aldrich).

3.16.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου διευκολύνει την αλληλεπίδραση της αποΑ-Ι με μυκήλια φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης. Όταν τα χολικά άλατα και τα μυκήλια λιπιδίων αναμειχθούν, τότε τα χολικά άλατα διαταράσσουν το πλέγμα των λιπιδίων και τα διαλυτοποιούν. Όταν η αναλογία φωσφολιπιδίων και χολικού νατρίου είναι 1:1 (όπως στη μέθοδο που χρησιμοποιείται) τότε το μίγμα λιπιδίων-χολικού νατρίου σχηματίζει δισκοειδείς διπλοστοιβάδες λιπιδίων με τα μόρια του χολικού νατρίου να τοποθετούνται γύρω από τη διπλοστοιβάδα. Με τη διαπίδυση επιτυγχάνεται η σταδιακή απομάκρυνση του χολικού νατρίου από τα λιποσώματα και η αντικατάσταση του με την αποΑ-Ι προς σχηματισμό δισκοειδών HDL σωματιδίων.

3.16.3 Πειραματική διαδικασία

Τα σωματίδια της rHDL παρασκευάζονται με τη μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, με μερικές μικρές τροποποιήσεις ^{19,20}. Η μοριακή rHDL αναλογία στα σωματίδια είναι 100:10:1:100 (egg-ΡC:χοληστερόλη:αποΑ-Ι:χολικό νάτριο). Σε ένα τυπικό πείραμα, χρησιμοποιούνται 0.14g χοληστερόλης (σημασμένη με [¹⁴C]χοληστερόλη, σε αναλογία 5.000-7.000 κρούσεις (cpm) ανά nmole μη σημασμένης χοληστερόλης) και 2.71g egg PC, τα οποία αναμιγνύονται σε γυάλινο σωληνάριο με ήπια ανάδευση και ακολούθως ξηραίνονται σε ατμόσφαιρα N₂. Τα ξηραμένα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 250μL διαλύματος SB 1x, με ήπια ανάδευση (vortex) για περίπου 30sec και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 30sec. Η διαδικασία ανάδευσης σε κυκλο-αναδευτήρα για 30sec και παραμονής στους 4°C για άλλα 30sec επαναλαμβάνονται μέχρι την ομογενοποίηση των λιπιδίων (συνολικό διάστημα περίπου 1 ώρα). Στη συνέχεια, προστίθενται 51μL διαλύματος χολικού νατρίου και ακολουθεί επώαση του μίγματος 1 ώρα στους 4°C. Στο τελικό στάδιο, γίνεται προσθήκη 1mg αποΑ-Ι διαλυμένης σε SB και η επώαση συνεχίζεται για 1 ώρα ακόμα. Κατόπιν, γίνεται διαπίδυση των δειγμάτων έναντι διαλύματος SB 1x, στους 4°C, με χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας μικρότερης των 12-14 kDa. Η διαπίδυση γίνεται για δύο ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων γίνεται 3 φορές αλλαγή του διαλύματος SB 1x. Στα σωματίδια διαβιβάζεται αέριο N₂ για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπιδίων και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

3.17 Προσδιορισμός Χοληστερόλης

3.17.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός: Διάλυμα χοληστερόλης (Cholesterol Cal, Chemelex), συγκέντρωσης 200mg/dL. Για τη μέτρηση της ολικής χοληστερόλης ο Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός αραιώνεται 1 προς 4 με PBS 1x.
- Αντιδραστήριο μέτρησης χοληστερόλης (Chemelex): Οξειδάση χοληστερόλης 300U/L, εστεράση χοληστερόλης 1000U/L, υπεροξειδάση 650U/L, 4-αμινοφαιναζόνη 0.4mmol/L, φαινόλη 26mmol/L, επιφανειοδραστικός παράγοντας pH 6.9 90mmol/L. Το αντιδραστήριο παρέχεται έτοιμο προς χρήση και διατηρείται στους 4 °C, προστατευμένο από το φως μέχρι την ημερομηνία λήξης του.
- SB 1x (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.01% EDTA, pH 8).
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής απορρόφησης-φθορισμού πλακιδίων (TECAN Infinite® M200).

3.17.2 Αρχή της μεθόδου

Η ολική χοληστερόλη του ορού προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως εξής:

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-4εν-3-όνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ αντιδρά με τη φαινόλη και την 4-αμινοφαιναζόνη και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm.

3.17.3 Πειραματική διαδικασία

Φτιάχνεται πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας το Βαθμονομητή Πρότυπο Ορό με βάση τον πίνακα 3.3, και κατόπιν τα πρότυπα και το δείγμα rHDL (10μL δείγματος συμπληρώνονται με 20μL SB 1x) αναμιγνύονται καλά με 300μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά και μέτρηση της απορρόφησης στα 505 nm.

Πίνακας 3.3. Όγκοι (μL) του βαθμονομητή και του SB που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χοληστερόλης.

Πρότυπο	SB
ΟμL	30 µL
1 µL	29 µL
2 µL	28 µL
4 µL	26 µL
6 µL	24 µL
12 µL	18 µL

3.18 Προσδιορισμός Φωσφολιπιδίων^[115]

3.18.1 Αντιδραστήρια, όργανα

- Kit (Sentinel Diagnostics) που περιέχει:
- Αντιδραστήριο R1a: Ν-[Τρι(υδροξυμεθυλ)μεθυλ]-2αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ (TES) 50mmol/l pH 7.6, 4-ύδροξυβενζοϊκό οξύ 12mmol/l, EDTA 1.3mmol/l, νατραζίδιο < 0.1%, Επιφανειοδραστικοί παράγοντες. Διατηρείται στους 4°C μέχρι την ημερομηνία λήξης του.

- Αντιδραστήριο R1b (Λυοφιλιοποιημένο): TES 50mmol/l, Φωσφολιπάση D >1500 U/l, Οξειδάση της χολίνης >7500U/mL, Υπεροξειδάση >7000U/mL, 4-Αμινοαντιπυρίνη 1.2mmol/l. Διατηρείται στους 4°C μέχρι την ημερομηνία λήξης του.
- Διάλυμα R1: 10mL αντιδραστηρίου R1a προσθέτονται σε 1 φιαλίδιο αντιδραστηρίου R1b. Το μείγμα αφήνεται για 10min και στη συνέχεια γίνεται ήπια ανακίνησή του. Διατηρείται στους 4°C για 14 μέρες.
- Πρότυπο διάλυμα: διάλυμα φωσφολιπιδίων (300mg/dl), νατραζίδιο <0.1%, επιφανειοδραστικοί παράγοντες. Το αντιδραστήριο παρέχεται έτοιμο προς χρήση και διατηρείται στους 4°C μέχρι την ημερομηνία λήξης του (4 μήνες σε περίπτωση που ανοιχθεί).
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής απορρόφησης-φθορισμού πλακιδίων (TECAN Infinite® M200).

3.18.2 Αρχή Μεθόδου

Τα φωσφολιπίδια προσδιορίζονται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως εξής: τα φωσφολιπίδια (φωσφατιδυλοχολίνη, σφιγγομυελίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη) υδρολύονται παρουσία της φωσφολιπάσης D σε χολίνη και φωσφατιδικό οξύ ή Ν-άκυλοσφιγγο-φωσφορικό οξύ ή λυσοφωσφατιδικό, αντίστοιχα. Η χολίνη οξειδώνεται από την οξειδάση της χολίνης σε βεταΐνη και H₂O₂. Τελικά, το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδράει με 4-αμινοαντιπυρίνη και 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ σε μία αντίδραση που καταλύεται από υπεροξειδάση και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm.

3.18.3 Πειραματική πορεία

Τα αντιδραστήρια πριν την έναρξη της διαδικασίας θερμαίνονται στους 37°C. Σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη με βάση το πίνακα 3.4, και κατόπιν τα πρότυπα και το δείγμα rHDL (5 μL δείγματος συμπληρώνονται με 5 μL SB) αναμιγνύονται καλά με 300 μL διάλυμα R1. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min και μέτρηση της απορρόφησης μέσα σε 30 min στα 505 nm. Πίνακας 3.4. Όγκοι (μL) του προτύπου διαλύματος και του SB που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον υπολογισμό των φωσφολιπιδίων.

Πρότυπο	SB
0 µL	10 µL
1 µL	9 µL
2 µL	8µL
4 µL	6 µL
6 µL	4 µL
12 µL	0 μL

3.19 Προσδιορισμός δραστικότητας του ενζύμου LCAT^[115;116]

3.19.1 Πειραματικό υλικό, αντιδραστήρια, όργανα

- Σωματίδια rHDL επισημασμένα με [4-¹⁴C]χοληστερόλη.
- $X\lambda\omega\rhoo\phi \delta\rho\mu io, CHCI_3$ (Merck).
- M $\epsilon\theta\alpha\nu\delta\lambda\eta$, CH₃OH(Sigma-Aldrich).
- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem).
- NaCl (Sigma-Aldrich).
- EDTA (Riedel de Haen).
- SB 10x (100mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 0.1% EDTA, pH 8).
- SB 1x (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.01% EDTA, pH 8).
- BSA (Sigma-Aldrich).
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich).
- LCAT (ανασυνδυασμένη LCAT ανθρώπου), σε τέτοια αραίωση η οποία οδηγεί σε 5-10% ολοκλήρωση της αντίδρασης
- Χοληστερόλη (Sigma-Aldrich).
- Ολεϊκός εστέρας χοληστερόλης (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα εσωτερικών προτύπων (carrier solution): (5mg χοληστερόλη και 5mg ολεϊκού εστέρα χοληστερόλης σε 1mL CHCl₃-CH₃OH 2:1 v/v).

- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): 40μL διαλύματος τερματισμού σε 5mL CHCl₃-CH₃OH 2:1 v/v).
- Πετρελαϊκός αιθέρας (Applichem).
- Αιθυλεθέρας (Sigma-Aldrich).
- Οξικό οξύ (Riedel de Haen).
- Ιώδιο (Applichem).
- 2,5-διφαινυλοξαζόλιο, PPO (Sigma-Aldrich).
- 1,4-δι[2-(5-φαινυλοξαζολο)]βενζόλιο, POPOP (Fluka).
- Τολουόλιο (Merck).
- Triton X-100 (Merck).
- Υγρό σπινθηρισμού: 11g PPO, 0,2g POPOP, 1266mL τολουόλιο. Τα τρία αυτά συστατικά επωάζονται όλη τη νύχτα και την επόμενη μέρα προστίθενται 660mL Triton X-100.
- Κυκλο-αναδευτήρας (Rx³ Velp Scientifica).
- Πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου.
- Υδατόλουτρο (Bioline Scientific).
- Οβίδα Ν_{2.}
- Πιπέτες παστέρ.
- Χρωματογραφική πλάκα ITLC (Pall Corporation, polysillica acid gel impregnated glass fiber sheets).
- Απαγωγός.
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).
- Καταγραφέας Epson LX-300+

3.19.2 Αρχή της μεθόδου

Η LCAT είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, μεταφέροντας μακριάς αλυσίδας ελεύθερα λιπαρά οξέα από τη θέση 2 της φωσφατιδυλοχολίνης στην υδροξυλομάδα του μορίου της χοληστερόλης. Αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα κυρίως στην επιφάνεια των HDL και σε μικρότερο βαθμό στις LDL και VLDL.

3.19.3 Πειραματική πορεία

Ο στόχος αυτού του πειράματος είναι να εξετάσουμε την ικανότητα της συνδεδεμένης σε HDL αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της να ενεργοποιούν το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης, LCAT. Τα σωματίδια rHDL προσθέτονται (σε αυξανόμενες ποσότητες 0.0007, 0.001, 0.0015, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032 mg αποΑ-Ι) σε γυάλινα σωληνάρια μαζί με 50μL από διάλυμα 40mg/mL BSA και 20μL από διάλυμα 100 mM βμερκαπτοαιθανόλης. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 500μL με την προσθήκη διαλύματος SB. Το μίγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέτονται 25μL δείγματος LCAT και η επώαση συνεχίζεται για επιπλέον 30 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 5mL διαλύματος τερματισμού. Το μίγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και μεταφέρεται στους 4 °C για τουλάχιστον 40 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν η οργανική από την υδατική φάση. Η πάνω, υδατική φάση απομακρύνεται με πιπέτα παστέρ, και η οργανική φάση, ξηραίνεται υπό αέριο Ν₂. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 500μL χλωροφορμίου, αναμιγνύονται ισχυρά με vortex και κατόπιν ξηραίνονται με αέριο N2. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 70μL χλωροφορμίου και τοποθετείται σε χρωματογραφική πλάκα ITLC που έχει ξηρανθεί στους 110 °C για 30 λεπτά. Η πλάκα αναπτύσσεται για περίπου 5 λεπτά, σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα:αιθυλεθέρα:οξικού οξέος (αναλογία όγκων 85:15:1) σε χρωματογραφικό θάλαμο. Οι ζώνες της εστεροποιημένης χοληστερόλης (CE) και της ελεύθερης χοληστερόλης (FC) εμφανίζονται με έκθεση σε ατμούς ιωδίου για 10-20 sec. Οι θέσεις των FC και CE σημειώνονται με μολύβι και το κίτρινα χρωματισμένο ιώδιο αφήνεται να εξαχνωθεί, μέχρι την πλήρη εξαφάνιση της χρώσης. Τότε, οι ζώνες των FC και CE κόβονται χωριστά και τοποθετούνται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας. Ακολουθεί

91

προσθήκη 10mL υγρού σπινθηρισμού και επώαση 30 λεπτά ώστε τελικά να επιτευχθεί η πλήρης αποσύνδεση των λιπιδίων από το υλικό της χρωματογραφικής πλάκας και ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

Η ταχύτητα της αντίδρασης, που εκφράζεται σε nmol εστέρων χοληστερόλης (CE) που παράγονται ανά ώρα, υπολογίζεται από την εξίσωση

V (nmol CE/h)=((α 0.14/386.7) (cpm CE/cpm (CE + C)) 1000000/ 0.5

Όπου α=mg αποΑ-Ι στην αντίδραση, 0,14=mg χοληστερόλης στις HDL ανά 1 mg αποΑ-Ι, 386,7=μοριακό βάρος (g/mol) της χοληστερόλης, CE=εστέρες χοληστερόλης, C=χοληστερόλη, 0.5=διάρκεια της αντίδρασης σε h

Η ταχύτητα της αντίδρασης παρίσταται γραφικά συναρτήσει της συγκέντρωσης της αποΑ-Ι και τα δεδομένα προσαρμόζονται σε κινητική Michaelis-Menten. Οι φαινόμενες σταθερές Kmapp (σταθερά Michaelis-Menten) και Vmaxapp (η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης) υπολογίζονται από την καμπύλη Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το λογισμικό Graphpad Prism. Η καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: Vmaxapp/Kmapp και εκφράζεται σε nmol CE/h/μM αποΑ-Ι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Καθαρισμός της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ-Ι[L218Α/L219Α/V221Α/L222Α], αποΑ-Ι[F225Α/V227Α/F229Α/L230Α] και αποΑ-Ι[E223Α/K226Α] με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής.

Η αγρίου τύπου αποΑ-Ι και οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] και αποΑ-I[E223A/K226A] εκφράστηκαν στην κυτταρική σειρά αστροκυτώματος ανθρώπου HTB-13 μετά από επιμόλυνση με αδενοϊούς που έφεραν το γονίδιο έκφρασης των αντίστοιχων απολιποπρωτεϊνών. Το μέσο με την εκφρασμένη αποΑ-Ι συλλέγεται, υφίσταται διαπίδυση έναντι 25mM όξινου ανθρακικού αμμωνίου (NH₄HCO₃) και λυοφιλοποιείται (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής).

Για τον καθαρισμό των αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-Ι, το λυοφιλοποιημένο μέσο επαναδιαλύεται σε Tris-HCl 0,01M, pH 8 και υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του ίδιου διαλύματος (διάρκεια διαπίδυσης τουλάχιστον 4h, 3 αλλαγές διαλύματος). Εν συνεχεία, το μέσο φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης εισάγεται στη στήλη ανιοντοανταλλαγής HiTrap Q HP (όγκου στήλης 5mL). Οι πρωτεΐνες εκλούονται με γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης NH₄HCO₃ 1M για 15 όγκους στήλης, όπως περιγράφτηκε στην παράγραφο 3.2.3. Η αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] καθαρίζεται με την ίδια διαδικασία, αλλά κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (ουρία 8M), για να διευκολυνθεί η απόσπαση της αποΑ-Ι από άλλες πρωτεΐνες που συνεκλούονται με τη μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-Ι υπό φυσικές συνθήκες, όπως περιγράφτηκε στην παράγραφο 3.3.3. Όσον αφορά, την πρωτεΐνη αποΑ-I[E223A/K226A] καθαρίστηκε από τους συνεργάτες μας στο Πανεπιστήμιο της Βοστώνης.

Τα κλάσματα που συλλέγονται από τον καθαρισμό με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

93

πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Στα σχήματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται ενδεικτικά οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου από τον καθαρισμό για κάθε πρωτεΐνη. Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζεται ο καθαρισμός της αποΑ-Ι αγρίου τύπου (αποΑ-Ι wt). Στην πηκτή 4.1Α, παρατηρείται πως η αποΑ-Ι περιέχεται σε μεγαλύτερη καθαρότητα στα κλάσματα 24-34. Στην πηκτή 4.1Β, εκτός από τα συλλεχθέντα κλάσματα από τον καθαρισμό, έχει αναλυθεί και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό. Η ζώνη που παρατηρείται στο αρχικό δείγμα πάνω από τη ζώνη της αποΑ-Ι καθώς και στα κλάσματα 18-22 αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη GFP (green fluorescence protein) που συνεκφράζεται με την αποΑ-Ι μέσω του συστήματος αδενοϊού. Η ταυτοποίηση της GFP στα κλάσματα 18-22 γίνεται από το έντονο πράσινο χρώμα στα κλάσματα αυτά, το οποίο και εξαφανίζεται στα επόμενα κλάσματα.



Σχήμα 4.1. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-Ι αγρίου τύπου από τα κλάσματα 10-34 (πηκτή Α) και 36-50 (πηκτή Β) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό. Στην πηκτή 1Β έχει αναλυθεί επίσης, και το αρχικό δείγμα πριν το καθαρισμό (π.κ.). Με την αγκύλη υποδεικνύονται τα πιο καθαρά κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό, εδώ τα κλάσματα 24-34.

Στο σχήμα 4.2 παρουσιάζεται 0 καθαρισμός της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] (αποΑ-Ι mut1). Στην πηκτή 4.2B, παρατηρείται πως η αποΑ-Ι περιέχεται σε μεγαλύτερη καθαρότητα στα κλάσματα 21-26. Στην πηκτή 4.2Γ, εκτός από τα συλλεχθέντα κλάσματα από τον καθαρισμό, έχει αναλυθεί και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό. Ο λόγος που ο καθαρισμός αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] της γίνεται UΠÓ αποδιατακτικές συνθήκες είναι για να επιτύχουμε διαχωρισμό της μεταλλαγμένης αποΑ-Ι από την GFP (ουρία 8M), αλλιώς η μεταλλαγμένη αποΑ-Ι συνεκλούεται με την GFP, όπως φαίνεται στην πηκτή 4.2A, όπου ο καθαρισμός έγινε με γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης NH₄HCO₃ 1M για 15 όγκους στήλης.





Σχήμα 4.2. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A]. Στην πηκτή 4.2Α αναλύονται τα κλάσματα 4-22 που συλλέχθηκαν όταν ακολουθήθηκε η πορεία καθαρισμού που εφαρμόζεται για την WT αποΑ-I (απουσία ουρίας) και παρατηρείται ότι η αποΑ-I συνεκλούεται μαζί με την GFP. Στην πηκτή αναλύεται επίσης και το αρχικό δείγμα πριν το καθαρισμό (π.κ.), ώστε να μπορούν να ταυτοποιηθούν οι ζώνες της αποΑ-I και της GFP. Στις επόμενες δύο πηκτές αναλύονται τα κλάσματα 2-28 (πηκτή B) και 30-50 (πηκτή Γ) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία ουρίας). Στην πηκτή 4.2B αναλύεται επίσης, και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό (π.κ.). Με την αγκύλη υποδεικνύονται τα πιο καθαρά κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό, εδώ τα κλάσματα 21-26.

Στο σχήμα 4.3 παρουσιάζεται ο καθαρισμός της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] (αποΑ-Ι mut2). Όπως φαίνεται και στις πηκτές 4.3A, B ο καθαρισμός για την αποΑ-Ι mut2 δεν ήταν αρκετά ικανοποιητικός. Παρατηρούμε ότι στην πηκτή 4.3A, εκτός από τη μεταλλαγμένη αποΑ-Ι συνεκλούονται μαζί η GFP, καθώς και άλλες πρωτεΐνες.



Σχήμα 4.3. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] από τα κλάσματα 2-28 (πηκτή A) και 30-46 (πηκτή B) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό. Στην πηκτή 4.3B αναλύεται επίσης, και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό (π.κ.). Με την αγκύλη υποδεικνύονται τα πιο καθαρά κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό, εδώ τα κλάσματα 24-29.

Τα κλάσματα (24-29) που συλλέχθηκαν από τον καθαρισμό που απεικονίζεται στις πηκτές 4.3A, B και περιέχουν τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης υποβάλλονται ξανά σε διαπίδυση έναντι Tris-HCl 0,01M, pH 8 και επανακαθαρίζονται με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού με τον αρχικό καθαρισμό της πρωτεΐνης. Ο καθαρισμός απεικονίζεται στις πηκτές 4.4A και 4.4B. Στην πηκτή 4.4A, παρατηρείται πως η αποA-I περιέχεται σε μεγαλύτερη καθαρότητα στα κλάσματα 17-25. Στην πηκτή 4.4B, εκτός από τα συλλεχθέντα κλάσματα από τον καθαρισμό, έχει αναλυθεί και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό.



Σχήμα 4.4. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες δείγματος αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] από τα κλάσματα 2-28 (πηκτή A) και 30-50 (πηκτή B) που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό. Στην πηκτή 4.4B αναλύεται επίσης, και το αρχικό δείγμα πριν τον καθαρισμό (π.κ.). Με την αγκύλη υποδεικνύονται τα πιο καθαρά κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό, εδώ τα κλάσματα 17-25.

Μετά την ανάλυση των συλεχθέντων κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, τα κλάσματα με τη μεγαλύτερη καθαρότητα σε αποΑ-Ι ενώνονται και ακολουθεί διαπίδυση σε NH₄HCO₃ 5mM. Μετά το πέρας της διαπίδυσης τα δείγματα λυοφιλοποιούνται και φυλάσσονται στους -80 °C.

4.2. Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-Ι.

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε πρόσφατα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (βλ. παρ. 3.6.3). Πριν από όλες τις αναλύσεις, η άγριου τύπου ή οι της αποΑ-Ι αποδιατάσσονται με διάλυση των μεταλλαγμένες μορφές λυοφιλοποιημένων δειγμάτων σε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.2mg/ml σε DPBS-GndHCI 8M και στη συνέχεια επαναδιατάσσονται με εκτεταμένη διαπίδυση έναντι DPBS. Τα δείγματα των πρωτεϊνών μετά τη διαπίδυση αναλύονται зц ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου Uπó αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να ελεγχθεί πάλι η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Στο σχήμα 4.5 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ανάλυση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου για τις πρωτεΐνες αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] (αποΑ-Ι mut4) μετά τη διαδικασία αποδιάταξης -

επαναδιάταξης. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.5 η διαδικασία αποδιάταξηςεπαναδιάταξης της αποΑ-Ι οδηγεί σε επιπλέον καθαρισμό της πρωτεΐνης, καθώς σε αντίθεση με την αποΑ-Ι που επαναδιατάσσεται εύκολα, άλλες πρωτεΐνες που έχουν ακολουθήσει μετά τον καθαρισμό δεν επαναδιατάσσονται και απομακρύνονται ως ίζημα με φυγοκέντρηση μετά τη διαπίδυση.



Σχήμα 4.5. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες των αποΑ-Ι, μεταλλαγμένων και μη.

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, παρατηρούμε ότι τα δείγματα είναι καθαρότητας >98%.

4.3 Μελέτη της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] με βιοφυσικές τεχνικές και λειτουργικές δοκιμασίες.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το καρβοξυ-τελικό άκρο της αποΑ-Ι απαιτείται για τη δέσμευση των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών, καθώς και για την επαγόμενη απο το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 εκροή χοληστερόλης^[13;43;109;116]. Απαλοιφή της καρβοξυ-τελικής περιοχής ελαττώνει την πρόσδεση της αποΑ-Ι με το μεταφορέα ABCA1, παρεμποδίζει την εκροή

χοληστερόλης και εμποδίζει το σχηματισμό ώριμων σωματιδίων αHDL^[117]. Για να προσδιορίσουμε τα συγκεκριμένα καρβοξυ-τελικά αμινοξέα της αποΑ-Ι που απαιτούνται για τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις με το μεταφορέα ABCA1 και/ή την LCAT που οδηγούν στο σχηματισμό ώριμων σωματιδίων αHDL, εισήχθησαν δύο σετ μεταλλάξεων στην περιοχή 218-226 της αποΑ-Ι. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε το ρόλο τεσσάρων υδρόφοβων (L218, L219, V221, L222) και δύο φορτισμένων (E223, K226) αμινοξέων που βρίσκονται εντός ή πλησίον της περιοχής 220-231 της αποΑ-Ι, που έχει δειχθεί προηγούμενα ότι απαιτούνται για την εκροή λιπιδίων μέσω ABCA1 και για τη βιογένεση της HDL *in vivo*^[12;13]. *In vivo* μελέτες από τους συναδέλφους μας (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής) έδειξαν ότι η έκφραση της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] σε αποΑ-Ι^{-/-} x αποΕ^{-/-} ποντίκια προάγει την παραγωγή ελαττωματικών προβ σωματιδίων που αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σε αHDL υποπληθυσμούς. Η έκφραση της αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] προκάλεσε ηπιότερες αλλά διακριτές αλλαγές στο φαινότυπο της HDL (βλ. Κεφ. 2). Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στο να μελετήσουμε αν οι παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή και τη διαμόρφωση του μορίου της αποΑ-Ι, καθώς και τη λειτουργία της αποΑ-Ι και συνεπώς και τη βιογένεση της HDL in vivo.

4.3.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού.

Για να υπολογίσουμε το ποσοστό α-έλικας κάθε μορφής της αποΑ-Ι καταγράψαμε το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού κάθε μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην περιοχή του άπω υπεριώδους και το συγκρίναμε με το φάσμα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου (βλ ενότητα 3.7.3), όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.6. Η μορφή του σχήματος κάθε φάσματος στην περιοχή 197-260nm είναι χαρακτηριστική για την αποΑ-Ι (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένη), λόγω του μεγάλου ποσοστού α-έλικας που περιέχει.



Σχήμα 4.6. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A].

Για τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι καθώς για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου υπολογίζεται το ποσοστό της α-έλικας που περιέχουν. Το ποσοστό της α-έλικας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη μοριακή ελλειπτικότητα στα 222nm, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία από τον Greenfield^[105] με βάση την εξίσωση: **% α-helix_{222nm}=([Θ]₂₂₂+3000)/(36000+3000)x100.** Τα περιεχόμενα ποσοστά α-έλικας στα 222nm, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1. Πίνακας 4.1. Εκατοστιαία περιεχόμενα ποσοστά α-έλικας της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και

των μεταλλάξεων, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A]. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	%α-ελικότητα
	222nm
WT	60.0 ± 1.5
L218A/L219A/V221A/L222A	52.7 ± 1.6^{1}
E223A/K226A	55.8 ± 1.1 ²

¹p<0.0001, ²p<0.005 ως προς WT

Από τον πίνακα 4.1 διαπιστώνουμε ότι το ποσοστό της α-έλικας που προέκυψε για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου είναι 60%, τιμή χαρακτηριστική και μέσα στο εύρος τιμών που δίνει η βιβλιογραφία για την πρωτεΐνη αυτή^[118]. Αντίθετα, παρατηρούμε ότι για τις αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της α-έλικας 7% και 4%, αντίστοιχα. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η εισαγωγή των μεταλλάξεων στην περιοχή 218-226 οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών στο χώρο, που μειώνουν την ελικότητά τους.

4.3.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Στη συνέχεια μελετήσαμε αν οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι διαφοροποιούνται ως προς τη θερμοδυναμική τους σταθερότητα σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Παρακολουθήσαμε τη μοριακή ελλειπτικότητα κάθε μορφής της αποΑ-Ι (μεταλλαγμένης και μη) στα 222nm σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας από 20 έως 80°C, με ρυθμό μεταβολής 1°C/min. Οι καμπύλες της θερμικής αποδιάταξης που προέκυψαν προσαρμόστηκαν σε πρότυπη σιγμοειδή καμπύλη Boltzman που περιγράφει τη μετάπτωση μεταξύ δύο καταστάσεων, χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Graphpad Prism[™]. Οι καμπύλες αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 4.7.



Σχήμα 4.7. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Τα πειραματικά σημεία απεικονίζονται ως τελείες. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το προφίλ της αποΑ-Ι αγρίου τύπου, με κόκκινο της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και με πράσινο της αποΑ-Ι[E223A/K226A].

Επίσης, υπολογίσαμε τη θερμοκρασία μετάπτωσης της θερμικής αποδιάταξης, Tm, το δείκτη συνεργιστικότητας, n, και τη φαινόμενη μεταβολή ενθαλπίας της μετάπτωσης, ΔΗ (βλ ενότητα 3.8.3), που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	T _m (°C)	n (δείκτης συνεργιστικότητας)	φαινόμενη ΔΗ (kcal/mol)
WT	55.6 ± 0.4	6.4 ± 0.2	25.9 ± 1.5
L218A/L219A/V221A/L222A	56.1 ± 0.8	9.7 ± 0.6^{1}	46.4 ± 2.4^{1}
E223A/K226A	53.4 ± 0.2^{1}	5.3 ± 0.7^2	21.01 ± 2.2 ³

¹p<0.0001, ²p<0.005, ³p=0.001 ως προς WT

Av και η θερμοκρασία μετάπτωσης της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] ήταν παραπλήσια με αυτή της αγρίου τύπου, η μετάπτωση είναι λιγότερο ομαλή, όπως προκύπτει από την αύξηση στο συντελεστή συνεργιστικότητας (σχήμα 4.7 και πίνακας 4.2). Η αυξημένη συνεργιστικότητα κατά αποδιάταξη тην της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου αντικατοπτρίζεται επίσης στην αύξηση κατά ~20.5kcal/mol της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας της συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] υποδηλώνουν πως η εισαγωγή αυτών των μεταλλάξεων οδηγεί σε μία πιο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης.

Η αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] αποδιατάχθηκε θερμικά σε θερμοκρασία μικρότερη κατά ~2 °C συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Η μετάπτωση για την αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] είναι λιγότερο απότομη σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, όπως προκύπτει από τη μείωση στο συντελεστή συνεργιστικότητας (σχήμα 4.7 και πίνακας 4.2). Η μειωμένη συνεργιστικότητα κατά την αποδιάταξη της αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου αντικατοπτρίζεται επίσης στη μείωση κατά ~5kcal/mol της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας της συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ της αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] υποδηλώνουν πως η εισαγωγή αυτών των μεταλλάξεων οδηγεί σε μία λιγότερο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης.

4.3.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω διαφορές στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου μετά την εισαγωγή των μεταλλάξεων, μελετήσαμε χημικής αποδιάταξης то προφίλ της των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] σε αντιπαραβολή με το προφίλ της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Εκμεταλλευόμενοι τον εγγενή φθορισμό των θρυπτοφανών που βρίσκονται στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου της

103

αποΑ-Ι, κάνουμε τιτλοδότηση με αυξανόμενες ποσότητες της χημικής αποδιατακτικής ουσίας υδροχλωρικής γουανιδίνης και καταγράφουμε τις αλλαγές στο σήμα φθορισμού. Στο σχήμα 4.8 παρουσιάζεται το κλάσμα της αποΑ-Ι που βρίσκεται σε αποδιατεταγμένη κατάσταση σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης.



Σχήμα 4.8. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλάξεων των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I αγρίου τύπου. Η συνεχής γραμμή παριστά μη γραμμική προσαρμογή σε ένα απλό μοντέλο Boltzmann. Τα πειραματικά σημεία απεικονίζονται ως τελείες. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το προφίλ της αποΑ-Ι αγρίου τύπου, με κόκκινο της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και με πράσινο της αποΑ-I[E223A/K226A].

Έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων και με τη χρήση μίας μεθόδου γραμμικής προεκβολής υπολογίζονται η φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs μεταξύ της φυσικά διαταγμένης πρωτεΐνης και της αποδιατεταγμένης μορφής, ΔG_D°, και οι παράμετροι D_{1/2} (η συγκέντρωση της GndHCl, όπου επιτυγχάνεται το μέσο σημείο της χημικής αποδιάταξης) και m (η κλίση στο μέσο της μετάβασης της χημικής αποδιάταξης) (βλ. παρ. 3.9.3), που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3. Πίνακας 4.3. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	ΔG _D ° (kcal/mol)	D _{1/2} (M)	m (kcal mol ⁻²)
WT	6.3 ± 0.4	1.01 ± 0.02	6.3 ± 0.4
L218A/L219A/V221A/L222A	6.6 ± 0.4	1.00 ± 0.03	6.4 ± 0.4
E223A/K226A	2.5 ± 0.2^{1}	0.88 ± 0.02^2	2.8 ± 0.1 ¹

¹p<0.0001, ²p<0.0005 ως προς WT

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.8 και τον πίνακα 4.3 το προφίλ της χημικής αποδιάταξης για την αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] ήταν ταυτόσημο με το προφίλ της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Η αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] παρουσίασε μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs 6.6 ± 0.4kcal/mol, τιμή που δε διαφέρει στατιστικά από τη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs της αποΑ-Ι αγρίου τύπου (6.3 ± 0.4kcal/mol), καθώς και αντίστοιχες τιμές $D_{1/2}$ και m με αυτές αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Αντίθετα, η αποΑ-Ι[E223A/K226A] εμφάνισε μεταβολή ελεύθερης ενέργειας 2.5 ± 0.2kcal/mol, τιμή η οποία είναι μικρότερη κατά ~3.8kcal/mol σε σχέση με τη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας που παρουσίασε η αποΑ-Ι αγρίου τύπου, καθώς και μικρότερες τιμές $D_{1/2}$ και m. Οι διαφορές αυτές δείχνουν ότι η χημική αποδιάταξη της αποΑ-Ι[E223A/K226A] είναι λιγότερο συνεργιστική σε σχέση με αυτή της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Συνολικά, η αποΑ-I[E223A/K226A] εμφανίζεται θερμοδυναμικά αποσταθεροποιημένη και δομικά διαφορετική από την αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A].

4.3.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[E223A/K226A] και αποΑ-Ι αγρίου τύπου στο διαλύτη.

Για να διερευνήσουμε αν οι προς μελέτη μεταλλάξεις επηρεάζουν την έκθεση των υδρόφοβων περιοχών της αποΑ-Ι στο υδατικό διάλυμα, μετρήσαμε τον εγγενή φθορισμό του ιχνηθέτη ANS παρουσία της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της. Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού του ANS απουσία ή παρουσία της αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της.



Σχήμα 4.9. Φάσματα φθορισμού του ελεύθερου ANS και του ANS παρουσία αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών της.

Η πρόσδεση του ANS στην αποΑ-Ι αγρίου τύπου οδήγησε σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, καθώς και σε μετατόπιση του μεγίστου του εκπεμπόμενου φθορισμού σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift) (σχήμα 4.9). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το ANS προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Στον πίνακα 4.4 παρουσιάζονται οι μεταβολές στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS για τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Πίνακας 4.4. Μεταβολή σήματος φθορισμού του ANS παρουσία μεταλλαγμένης ή αγρίου τύπου αποΑ-Ι ως προς το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	Σήμα φθορισμού ANS παρουσία αποΑ- Ι/σήμα φθορισμού απουσία αποΑ-Ι
WT	6.0 ± 0.4
L218A/L219A/V221A/L222A	3.5 ± 0.2^{1}
E223A/K226A	9.6 ± 0.5^{1}

¹p<0.0001 ως προς WT

Η αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] παρουσίασε μείωση του φθορισμού του ANS σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τη φύση των μεταλλαγμένων αμινοξέων, καθώς υδρόφοβα αμινοξέα, λευκίνη (L) και βαλίνη (V), αντικαθίστανται από την αλανίνη, που είναι λιγότερο υδρόφοβο αμινοξύ. Αντίθετα η αποΑ-Ι[E223A/K226A] παρουσίασε αύξηση του φθορισμού του ANS σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τη φύση των μεταλλαγμένων αμινοξέων, καθώς υδρόφιλα αμινοξέα, γλουταμινικό οξύ (E) και λυσίνη (K), αντικαθίστανται από την αλανίνη, που είναι περισσότερο υδρόφοβο αμινοξύ.

4.3.5 Μελέτη της ικανότητας των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Αφού εξετάσαμε εάν οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν τη δομή και τη διαμόρφωση της αποΑ-Ι, θέλαμε να ερευνήσουμε επιπλέον, εάν αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν και τις λειτουργίες της αποΑ-Ι.

Κύριος αποδέκτης της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα λιπιδίων, ABCA1, είναι η μη λιπιδιωμένη αποΑ-Ι και η ελάχιστα λιπιδιωμένη αποΑ-Ι (προβ HDL) και αυτή η διαδικασία αποτελεί το πρώτο βήμα στη βιογένεση της HDL. Μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα της αποΑ-Ι να προάγει ολική εκροή χοληστερόλης ή να αλληλεπιδρά με το μεταφορέα λιπιδίων, ABCA1. Η ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίζεται (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην
ενότητα 3.12) μέσω χρήσης καλλιέργειας μακροφάγων κυττάρων ποντικού J774 (στα οποία η έκφραση του μεταφορέα ABCA1 επάγεται μέσω του αναλόγου του cAMP, cpt-cAMP).

Για τις πρωτεΐνες αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] μελετήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1 από κύτταρα J774 σε αντιπαραβολή με την ικανότητα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1, η οποία ορίζεται ως 100%, όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.10 Στον πίνακα 4.5 παρουσιάζεται η καθαρή εξαρτώμενη από το cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης.



Σχήμα 4.10. Εξαρτώμενη (μέσω ABCA1) και μη εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 κατόπιν επώασης για 4h με 1μM αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A]. Τα αποτελέσματα παριστούν τους μέσους όρους δύο πειραμάτων εις τριπλούν.

Πίνακας 4.5. Εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 παρουσία 1μΜ αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A].

	αποΑ-Ι	αποΑ-	αποΑ-
	WT	I[L218A/L219A/V221A/L222A]	Ι[Ε223Α/Κ226Α]
cpt-cAMP- εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης (% της ολικής χοληστερόλης)	10.2 ± 1.5	2.0 ± 1.2 ¹	12.5 ± 3.0 ²

¹p<0.0001, ²p=0.02 ως προς WT

Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.10 και στον πίνακα 4.5 η ικανότητα της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι 20% σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Αντίθετα, η ικανότητα της αποΑ-I[E223A/K226A] να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι ελαφρά αυξημένη (123%) σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

4.3.6 Προσδιορισμός της ικανότητας των αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Η LCAT είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, μεταφέροντας μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα από τη θέση 2 της φωσφατιδυλοχολίνης στην υδροξυλομάδα του μορίου της χοληστερόλης. Κατά την αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των HDL, η LCAT ενεργοποιείται από την αποΑ-Ι και οδηγεί στη μετατροπή δισκοειδών HDL σωματιδίων σε ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια.

Για το σκοπό αυτό παρασκευάσαμε δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) που περιέχουν αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] ή αποΑ-Ι[E223A/K226A] με τη μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου (βλ. παρ. 3.15.3). Η αρχική μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή rHDL είναι 100:10:1. Στον πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η τελική μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι των σωματιδίων που παρασκευάσαμε. Παρατηρούμε από τον πίνακα ότι η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι είναι παρόμοια.

Πίνακας 4.6. Μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:απο A-I σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) που περιέχουν την αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένες μορφές της απο A-I.

	Φωσφολιπίδια	Χοληστερόλη	αποA-I
αποΑ-Ι WT	110	8	1
αποΑ- I[L218A/L219A/V221A/L222A]	91	7	1
αποΑ-Ι[E223A/K226A]	108	8	1

Αφού παρασκευάσαμε τα σωματίδια rHDL, προσδιορίσαμε την ικανότητα των αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT. Για να υπολογίσουμε την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου, υπολογίζουμε πρώτα την ταχύτητα εστεροποίησης της χοληστερόλης, η οποία εκφράζεται σε nmol εστέρων χοληστερόλης (CE) που παράγονται ανά ώρα. Έπειτα, κάνουμε τη γραφική παράσταση της ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης της αποΑ-Ι και προσαρμόζουμε τα δεδομένα σε κινητική Michaelis-Menten. Από την εξίσωση Michaelis-Menten υπολογίζουμε τις φαινόμενες σταθερές Kmapp και Vmaxapp. Η καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου υπολογίζεται από το λόγο Vmax_{app}/Km_{app} και εκφράζεται σε nmol εστέρων χοληστερόλης (CE) που παράγονται ανά ώρα ανά μΜ αποΑ-Ι (βλ. παρ. 3.18.3). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρουσιάζονται στο σχήμα 4.11 και στον πίνακα 4.7.



Km _{app} (μΜ)	0.45 ± 0.13	0.43 ± 0.08	0.44 ± 0.16
Vmax _{app} (nmol CE/h)	2.41 ± 0.50	1.53 ± 0.31	1.50 ± 0.15

Σχήμα 4.11. Δραστικότητα της LCAT (Vmax_{app}/Km_{app}) παρουσία rHDL που περιέχουν την αποΑ-Ι αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A]. Η ικανότητα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου να ενεργοποιεί την LCAT ορίζεται ως 100%. Στο γράφημα παρουσιάζονται επίσης, η φαινόμενη σταθερή Michaelis-Menden (Km_{app}) καθώς και η φαινόμενη μέγιστη ταχύτητα (Vmax_{app}). Τα αποτελέσματα παριστούν τους μέσους όρους δύο πειραμάτων εις τριπλούν.

Πίνακας 4.7. Δραστικότητα του ενζύμου LCAT.

Δραστικότητα			
LCAT	WT	αποΑ-	αποΑ-
	αποA-I	I[L218A/L219A/V221A/L222A]	I[E223A/K226A]
Vmax _{app} /Km _{app}			
(nmol CE/ h/			
μΜ αποΑ-Ι)			
. ,	5.4 ± 1.1	3.5 ± 0.1^{1}	3.5 ± 0.9^2

¹p=0.01, ²p=0.007 ως προς WT

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.11 και τον πίνακα 4.7 και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι, αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-Ι[E223A/K226A] παρουσιάζουν μέτρια μείωση της ικανότητας τους να ενεργοποιούν την LCAT (65-66%) σε σχέση με την αγρίου τύπου αποΑ-Ι.

4.4 Μελέτη της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με βιοφυσικές τεχνικές και λειτουργικές δοκιμασίες.

Έχοντας μελετήσει τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[E223A/K226A] διαπιστώσαμε ότι οι μεταλλάξεις αυτές, οι οποίες εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, επηρεάζουν τη δομή, τη διαμόρφωση και τις λειτουργίες της πρωτεΐνης, καθώς και τη βιογένεση της HDL. Για να επεκτείνουμε τη μελέτη μας στον προσδιορισμό συγκεκριμένων καρβοξυ-τελικών αμινοξέων της αποΑ-Ι που απαιτούνται για τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις με το μεταφορέα ABCA1 και/ή το ένζυμο LCAT και που οδηγούν στο σχηματισμό ώριμων αHDL σωματιδίων, εισαγάμε ένα άλλο σετ μεταλλάξεων στην καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΑ-Ι. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε το ρόλο άλλων τεσσάρων υδρόφοβων αμινοξέων (F225, V227, F229, L230) που βρίσκονται εντός της περιοχής 220-231 της αποΑ-Ι. Προηγούμενες μελέτες μεταφοράς γονιδίων σε ποντίκια, έδειξαν ότι σε μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι που έχει απαλοιφεί συγκεκριμένα καρβοξυ-τελικό άκρο και то ŋ περιοχή 220-231 παρεμποδίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αποΑ-Ι και ABCA1 και εμποδίζεται η βιογένεση φυσιολογικών αHDL σωματιδίων, αλλά επιτρέπεται ο σχηματισμός προβ HDL σωματιδίων^[12;13]. Μελέτες γονιδιακής μεταφοράς της αποΑ-Ι^{-/-} х αποΕ-/αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230] σε ποντίκια (εκτελέστηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής), έδειξαν ότι αυτή η μετάλλαξη προάγει το σχηματισμό χαμηλών επιπέδων ανώριμων HDL σωματιδίων. Συνεπώς, θελήσαμε να εξετάσουμε αν και αυτό το σετ σημειακών μεταλλάξεων στην αποΑ-Ι, που αφορούν την αντικατάσταση υδρόφοβων αμινοξέων με αλανίνη, επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της αποΑ-Ι και συνεπώς τη βιογένεση της HDL in vivo.

112

4.4.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού.

Για να παρατηρήσουμε τυχόν αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] καταγράψαμε το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους και το συγκρίναμε με το φάσμα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.12 (βλ. παρ. 4.3.1).



Σχήμα 4.12. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]. Με μαύρο απεικονίζεται το φάσμα CD της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και με γαλάζιο το φάσμα CD της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A].

Για τη μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-Ι καθώς για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου υπολογίζεται το ποσοστό της α-έλικας που περιέχουν. Τα περιεχόμενα ποσοστά α-έλικας στα 222nm, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8. Εκατοστιαία περιεχόμενα ποσοστά α-έλικας της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μετάλλαξης αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	%α-ελικότητα
	222nm
wt	59.3 ± 0.5
F225A/V227A/F229A/L230A	51.7 ± 0.3 ¹

¹p<0.0001 ως προς WT

Από τον πίνακα 4.8 διαπιστώνουμε ότι το ποσοστό της α-έλικας που προέκυψε για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου είναι 59.3%, τιμή χαρακτηριστική και μέσα στο εύρος τιμών που δίνει η βιβλιογραφία για την πρωτεΐνη αυτή^[118], καθώς και τιμή παραπλήσια με αυτή που υπολογίστηκε στην παράγραφο 4.3.1. Αντίθετα, παρατηρούμε ότι για την υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της α-έλικας 7%. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η εισαγωγή των μεταλλάξεων στην περιοχή 225-230 οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο, που μειώνει το ποσοστό της ελικότητάς της.

4.4.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Έπειτα, θελήσαμε να εξετάσουμε αν αυτή η μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-Ι διαφοροποιείται ως προς τη θερμική της σταθερότητα σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, όπως συνέβη και με τις προηγούμενες μεταλλάξεις που ερευνήσαμε παραπάνω. Έτσι λοιπόν, παρακολουθήσαμε τη μοριακή ελλειπτικότητα κάθε μορφής της αποΑ-Ι (μεταλλαγμένης και μη) στα 222nm μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία από τους 20 έως τους 80°C, με ρυθμό μεταβολής 1°C/min. Οι καμπυλες της θερμικής αποδιάταξης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.13.



Σχήμα 4.13. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Τα πειραματικά σημεία απεικονίζονται ως τελείες. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το προφίλ της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και με γαλάζιο της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A].

Επίσης, υπολογίσαμε τη θερμοκρασία μετάπτωσης της θερμικής αποδιάταξης, Tm, το δείκτη συνεργιστικότητας, n, και τη φαινόμενη μεταβολή ενθαλπίας της μετάπτωσης, ΔΗ, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.9.

Πίνακας 4.9. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και των μεταλλάξεών της. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	Т _т (°С)	n (δείκτης συνεργιστικότητας)	φαινόμενη ΔΗ (kcal/mol)
WT	56 ± 0.5	6.3 ± 0.4	27.5 ± 0.2
F225A/V227A/F229A/L230A	57.8 ± 0.2 ¹	11.4 ± 0.4^2	53.6 ± 0.2^3

¹p=0.01, ²p<0.0008, ³p<0.0001 ως προς WT

То προφίλ αποδιάταξης της θερμικής της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] παρουσίασε μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με αυτό της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Η θερμοκρασία μετάπτωσης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] είναι υψηλότερη από αυτή για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου κατά 1.8 °C και όπως προκύπτει από τη μεταβολή του συντελεστή συνεργιστικότητας κατά 5.1 μονάδες η μετάπτωση φαίνεται ότι είναι αρκετά πιο απότομη (σχήμα 4.13 και πίνακας 4.9). Η αυξημένη συνεργιστικότητα κατά тη θερμική αποδιάταξη της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου αντικατοπτρίζεται επίσης στην αύξηση κατά ~26.1kcal/mol της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας της συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Οι προφίλ παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] υποδηλώνουν πως οι αντικαταστάσεις των συγκεκριμένων αμινοξέων οδηγούν σε μία πιο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης, η οποία φαίνεται ότι επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα της αποΑ-Ι.

4.4.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε σύγκριση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω διαφορές στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου μετά την εισαγωγή των μεταλλάξεων, μελετήσαμε προφίλ της χημικής αποδιάταξης то της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε αντιπαραβολή με το προφίλ της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Όπως περιγράφεται και στην ενότητα 4.3.3 κάνουμε τιτλοδότηση με αυξανόμενες ποσότητες της χημικής αποδιατακτικής ουσίας υδροχλωρικής γουανιδίνης και καταγράφουμε τις αλλαγές στο σήμα φθορισμού. Στο σχήμα 4.14 παρουσιάζεται το κλάσμα της αποΑ-Ι που βρίσκεται σε αποδιατεταγμένη κατάσταση σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης.



αποδιάταξης Σχήμα 4.14. Προφίλ μετάλλαξης χημικής της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Η συνεχής γραμμή παριστά μη γραμμική προσαρμογή σε ένα απλό μοντέλο Boltzmann. Τα πειραματικά σημεία απεικονίζονται ως τελείες. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το προφίλ αποΑ-Ι αγρίου τύπου γαλάζιο της και Jμ της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A].

Έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων και με τη χρήση μίας μεθόδου γραμμικής προεκβολής υπολογίζονται η φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs μεταξύ της φυσικά διαταγμένης πρωτεΐνης και της αποδιατεταγμένης μορφής, ΔG_D^o, και οι παράμετροι D_{1/2}, m (βλ. παρ. 3.9.3), όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μετάλλαξης αποΑ-Ι [F225A/V227A/F229A/L230A]. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	ΔG _D ° (kcal/mol)	D _{1/2} (M)	m (kcal mol⁻²)
WT	6.5 ± 0.3	1.02 ± 0.06	6.4 ± 0.6
F225A/V227A/F229A/L230A	6.9 ± 0.1	1.01 ± 0.03	6.9 ± 0.2

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.14 και τον πίνακα 4.10 το προφίλ της χημικής αποδιάταξης για την αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] ήταν ταυτόσημο με το προφίλ της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Η αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] παρουσίασε μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs 6.9 ± 0.1kcal/mol, τιμή που δε διαφέρει στατιστικά από τη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs της αποΑ-Ι αγρίου τύπου (6.5 ± 0.3kcal/mol), καθώς και αντίστοιχες τιμές D1/2 και m με αυτές αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

4.4.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] και της αποΑ-Ι αγρίου τύπου στο διαλύτη.

Εν συνεχεία, μετρήσαμε τον εγγενή φθορισμό του ιχνηθέτη ANS παρουσία της αποΑ-Ι αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της, ώστε να διερευνήσουμε αν η προς μελέτη μετάλλαξη επηρεάζει την έκθεση των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στο υδατικό διάλυμα. Στο σχήμα 4.15 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού του ANS απουσία ή παρουσία της αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή της μεταλλαγμένης μορφής της.



Σχήμα 4.15. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία αποΑ-Ι αγρίου τύπου ή της μεταλλαγμένης μορφής της.

Η πρόσδεση του ANS στην αποΑ-Ι αγρίου τύπου οδήγησε σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, καθώς και σε μετατόπιση του μεγίστου του εκπεμπόμενου φθορισμού σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift) (σχήμα 4.15). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το ANS προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Στον πίνακα 4.11 παρουσιάζονται οι μεταβολές στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS για την αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Πίνακας 4.11. Μεταβολή σήματος φθορισμού του ANS παρουσία μεταλλαγμένης ή αγρίου-τύπου αποΑ-Ι ως προς το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών πειραμάτων.

αποΑ-Ι	Σήμα φθορισμού ANS παρουσία αποΑ-
	Ι/σήμα φθορισμού απουσία αποΑ-Ι
WT	6.0 ± 0.3
F225A/V227A/F229A/L230A	3.5 ± 0.3^{1}

¹p<0.0001 ως προς WT

Παρατηρούμε από τα δεδομένα του πίνακα, ότι και η αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] παρουσίασε μείωση του φθορισμού του ANS σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τη φύση των μεταλλαγμένων αμινοξέων, καθώς υδρόφοβα αμινοξέα, φαινυλαλανίνη (F), βαλίνη (V) και λευκίνη (L), αντικαθίστανται από την αλανίνη, που είναι λιγότερο υδρόφοβο αμινοξύ.

4.4.5 Μελέτη της ικανότητας της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Αφού μελετήσαμε εάν η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει τη δομή και τη διαμόρφωση της αποΑ-Ι, θέλαμε να ερευνήσουμε επιπλέον, εάν η μετάλλαξη επηρεάζει και τις λειτουργίες της αποΑ-Ι.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, κύριος αποδέκτης της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα λιπιδίων, ABCA1, είναι η μη λιπιδιωμένη αποΑ-Ι και η λίγο λιπιδιωμένη αποΑ-Ι (προ-β-HDL).Η ABCA1εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίζεται (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.12) μέσω χρήσης μακροφάγων κυττάρων ποντικού J774 (στα οποία η έκφραση του μεταφορέα ABCA1 επάγεται μέσω του αναλόγου του cAMP, cpt-cAMP).

Για την πρωτεΐνη αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] μελετήθηκε η ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1 από κύτταρα J774 σε αντιπαραβολή με την ικανότητα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1, η οποία ορίζεται, όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.16 ως 100%. Στον πίνακα 4.12 παρουσιάζεται η καθαρή εξαρτώμενη από το cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης.



Σχήμα 4.16. Εξαρτώμενη (μέσω ABCA1) και μη εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 κατόπιν επώασης για 4h με 1μM αποA-I αγρίου τύπου και αποA-I[F225A/V227A/F229A/L230A]. Τα αποτελέσματα παριστούν τους μέσους όρους δύο πειραμάτων εις τριπλούν.

Πίνακας 4.12. Εξαρτώμενη από cpt-cAMP εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774 παρουσία 1μΜ αποΑ-Ι αγρίου τύπου και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A].

	αποΑ-Ι WT	αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]
cpt-cAMP- εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης (% της ολικής χοληστερόλης)	10.0 ± 3.1	2.3 ± 2.0 ¹

¹p=0.0003 ως προς WT

Από το σχήμα 4.16 και τον πίνακα 4.12 παρατηρούμε ότι η ικανότητα της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι 23% σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

4.4.6 Προσδιορισμός της ικανότητας της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT συγκριτικά με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

Όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 1.3.5, θελήσαμε να συγκρίνουμε την ικανότητα της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT σε σχέση με την αγρίου τύπου αποΑ-Ι. Για το σκοπό αυτό παρασκευάσαμε δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL αποΑ-Ι (rHDL) που περιέχουν αγρίου τύπου ή αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με τη μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία (βλ. παρ. 3.15.3). Н χολικού νατρίου αρχική μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι που χρησιμοποιείται νια тпу παρασκευή rHDL είναι 100:10:1. Στον πίνακα 4.13 παρουσιάζεται η τελική μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι των σωματιδίων που παρασκευάσαμε. Παρατηρούμε από τον πίνακα ότι η μοριακή αναλογία

φωσφολιπιδιων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αγρίου τύπου ή τη μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-Ι είναι παρόμοια.

	Φωσφολιπίδια	Χοληστερόλη	αποΑ-Ι
αποΑ-Ι WT	90	5	1
αποΑ- I[F225A/V227A/F229A/L230A]	116	6	1

Πίνακας 4.13. Μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων:χοληστερόλης:αποΑ-Ι σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL(rHDL).

Αφού παρασκευάσαμε τα rHDL, προσδιορίσαμε την ικανότητα της αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] στα rHDL να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT. Κάνουμε τη γραφική παράσταση της ταχύτητας εστεροποίησης της χοληστερόλης συναρτήσει της συγκέντρωσης της αποΑ-Ι και προσαρμόζουμε τα δεδομένα σε κινητική Michaelis-Menten. Από την εξίσωση Michaelis-Menten υπολογίζουμε τις φαινόμενες σταθερές Km_{app} και Vmax_{app}. Η καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου υπολογίζεται από το λόγο Vmax_{app}/Km_{app} και εκφράζεται σε nmol εστέρων χοληστερόλης (CE) που παράγονται ανά ώρα ανά μΜ αποΑ-Ι (βλ. παρ. 4.3.6). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρουσιάζονται στο σχήμα 4.17 και στον πίνακα 4.14.



Km _{app} (μM)	0.57 ± 0.17	$\textbf{0.16} \pm \textbf{0.07}$
Vmax _{app} (nmol CE / h)	$\textbf{2.40} \pm \textbf{0.08}$	$\textbf{0.45} \pm \textbf{0.17}$

Σχήμα 4.17. Δραστικότητα της LCAT (Vmax_{app}/Km_{app}) παρουσία rHDL που περιέχουν την αποΑ-Ι αγρίου τύπου και την αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A]. Η ικανότητα της αποΑ-Ι αγρίου τύπου να ενεργοποιεί την LCAT ορίζεται ως 100%. Στο γράφημα παρουσιάζονται επίσης, η φαινόμενη σταθερή Michaelis-Menden (Km_{app}) καθώς και η φαινόμενη μέγιστη ταχύτητα (Vmax_{app}). Τα αποτελέσματα παριστούν τους μέσους όρους δύο πειραμάτων εις τριπλούν.

Πίνακας 4.14. Δραστικότητα του ενζύμου LCAT.

Δραστικότητα LCAT	WT αποΑ-Ι	αποΑ- I[F225A/V227A/F229A/L230A]
Vmax _{app} /Km _{app}	4.40 ± 1.1	2.91 ± 0.21^{1}
(nmol CE/ h/ μΜαποΑ-Ι)		

¹p=0.04 ως προς WT

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.17 και τον πίνακα 4.14 η μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-Ι, αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] παρουσιάζει μέτρια μείωση της ικανότητάς της (66%) να ενεργοποιεί την LCAT σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Αιτιολόγηση της επιλογής για μελέτη των μεταλλάξεων αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-I[E223A/K226A] και αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A].

Η απόφαση για τη μελέτη των συγκεκριμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών βασίζεται σε λειτουργικές και δομικές θεωρήσεις. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το καρβοξυ-τελικό άκρο της αποΑ-Ι απαιτείται για τη δέσμευση των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών, καθώς και για την επαγόμενη απο το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 εκροή χοληστερόλης^[13;43;109;116]. Απαλοιφή της καρβοξυ-τελικής περιοχής ελαττώνει την πρόσδεση της αποΑ-Ι με το μεταφορέα ABCA1 και παρεμποδίζει την εκροή χοληστερόλης^[117;119]. Επιπλέον, ανασυνδυασμένα σωματίδια της HDL που περιέχουν ελλειμματικές μορφές της αποΑ-Ι είναι ασθενείς ενεργοποιητές του ενζύμου LCAT και εμποδίζεται ο σχηματισμός ώριμων σωματιδίων αHDL^[119].

Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες γονιδιακής μεταφοράς σε αποΑ-Ι⁻ ^{/-} ποντίκια έδειξαν ότι όταν εκφράζονται οι ελλειμματικές στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφές της αποΑ-Ι στις οποίες έχει γίνει απαλοιφή της περιοχής 220-231 εμποδίζεται η βιογένεση φυσιολογικών σωματιδίων αHDL, αλλά επιτρέπεται ο σχηματισμός προβ HDL σωματιδίων^[12;13]. Παρόμοια προβ HDL σωματίδια έχουν βρεθεί στο πλάσμα ποντικών με ανεπάρκεια του μεταφορέα ABCA1, καθώς και σε ανθρώπους που φέρουν μεταλλάξεις στον ABCA1 και χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια της HDL^[43;120;121].

Επίσης, δομικά δεδομένα ενισχύουν τη σημασία της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αποΑ-Ι ως προς την ικανότητά της να προάγει το σχηματισμό του μοντέλου «διπλής ζώνης» ("double belt"), όπου δύο μόρια αποΑ-Ι τυλίγονται με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από τα λιπίδια των σωματιδίων της HDL. Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ της δομής της διμερούς ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφής της αποΑ-Ι αποΑ-Ι[Δ(185-243)] δείχνουν ότι η αμινο-τελική περιοχή της αποΑ-Ι σταθεροποιεί το διμερές σε διάλυμα και το ωθεί να σχηματίσει δομή με αντιπαράλληλη διαμόρφωση^[24]. Η διάταξη αυτή είναι παρόμοια με τη διαμόρφωση που καταλαμβάνουν δύο μονομερή της αποΑ-Ι όταν δεσμεύονται στα δισκοειδή σωματίδια της HDL^[23;25;122]. Έχει προταθεί, ότι σε αυτή την αντιπαράλληλη διαμόρφωση, μια «εύκαμπτη θηλιά», η οποία εμπεριέχει τα αμινοξέα 225-227 επιτρέπει στην έλικα 10 του κάθε μονομερούς να εγγράφεται σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό σε σχέση με την αλλη.

5.1.1 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[E223A/K226A] και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΑ-Ι.

Οι αλλαγές που παρατηρηθήκαν στις φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] περιλαμβάνουν μείωση TOU περιεχομένου της α-έλικας κατά 7%, πιο συνεργιστική μετάβαση κατά τη θερμική αποδιάταξη σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, πανομοιότυπο προφίλ κατά τη χημική αποδιάταξη και μείωση κατά 40% της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη. Η αυξημένη συνεργιστικότητα που παρατηρήθηκε κατά тη θερμική αποδιάταξη της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] υποδηλώνει μια πιο συμπαγή και σταθερή δομή, η οποία μπορεί να υφίσταται παρότι δεν παρατηρήθηκε καμία σταθεροποίηση κατά τη χημική αποδιάταξη. Βέβαια, οι δύο μέθοδοι αναφέρονται σε διαφορετικές όψεις της αλλαγής διαμόρφωσης που ακολουθεί η αποδιάταξη της πρωτεΐνης (γενικά κατά τη χημική αποδιάταξη η δευτεροταγής δομή επηρεάζεται από το άμεσο περιβάλλον των καταλοίπων θρυπτοφάνης). Στην αποΑ-Ι, όλα τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης εντοπίζονται στην αμινο-τελική περιοχή, και ως εκ τούτου, η έλλειψη αλλαγών κατά τη χημική αποδιάταξη προτείνει ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα αυτής της περιοχής νзδ επηρεάζεται από тη μετάλλαξη. Αντίστροφα, то διαφοροποιημένο προφίλ της θερμικής αποδιάταξης μπορεί να εξηγηθεί από τις εντοπισμένες αλλαγές στην αναδίπλωση και τη σταθερότητα μόνο της καρβοξυ-τελικής περιοχής της πρωτεΐνης, όπου βρίσκονται τα μεταλλαγμένα κατάλοιπα, ή από τις αλλαγές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της καρβοξυτελικής και της αμινο-τελικής περιοχής που επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τη σταθερότητα της καρβοξυ-τελικής περιοχής. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι δύο μέθοδοι χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης, η πιθανότητα ότι η σταθεροποίηση που παρατηρείται κατά τη θερμική αποδιάταξη εξαρτάται από το συγκεκριμένο μονοπάτι ξεδιπλώματος που λαμβάνει χώρα κατά την αποδιάταξη με θερμότητα δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Επίσης, αν και τα τέσσερα αμινοξέα των μεταλλάξεων στην αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] αντιστοιχούν στο ~5% επί του συνόλου των υδρόφοβων αμινοξέων της πρωτεΐνης, η εισαγωγή των μεταλλάξεων αυτών οδήγησε σε μείωση κατά 40% της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι τα αμινοξέα L218/L219/V221/L222 ευθύνονται σχεδόν για το ήμισυ της έκθεσης των υδρόφοβων θέσεων της αποΑ-Ι. Λαμβάνοντας ως σύνολο αυτά τα ευρήματα, φαίνεται ότι η μετάλλαξη αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] επηρεάζει σημαντικά τη δομική ακεραιότητα και την πλαστικότητα της διαμόρφωσης του μορίου.

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στις φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΑ-I[E223A/K226A] περιλαμβάνουν μείωση του περιεχομένου της α-έλικας κατά 4.2%, λιγότερο συνεργιστική μετάβαση κατά τη θερμική και χημική αποδιάταξη, καθώς και 1.6 φορές αύξηση της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών στο διαλύτη σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Αυτές οι αλλαγές υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη είναι θερμοδυναμικά αποσταθεροποιημένη και διαφορετική από την αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A].

Όσον αφορά την πρωτεΐνη αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A], η φυσικοχημική ανάλυση υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο και τη δομική πλαστικότητα της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μία πιο συμπαγή δομή της καρβοξυ-τελικής περιοχής. Μία σημαντική μείωση της τάξεως του 7.6% στο περιεχόμενο της α-έλικας υποδεικνύει ότι οι δομικές αλλαγές που επέφεραν οι μεταλλάξεις εκτείνονται και εκτός της περιοχής που αυτές εντοπίζονται. Από την ανάλυση που έγινε για να εξεταστεί η θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης διαφαίνεται, ότι οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε θερμοδυναμική σταθεροποίηση και η πρωτεΐνη παρουσιάζει πιο συνεργιστική μετάβαση κατά την αποδιάταξη, καθώς και πιο συμπαγή δομή. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται μόνο από τη θερμική αποδιάταξη και όχι από τη χημική αποδιάταξη. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για την πρωτεΐνη αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], η χημική αποδιάταξη αφορά μόνο το τοπικό περιβάλλον των καταλοίπων θρυπτοφάνης, τα οποία εντοπίζονται στο αμινο-τελικό άκρο. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι δομικές επιπτώσεις που επέφεραν οι μεταλλάξεις, ίσως περιορίζονται μόνο στην καρβοξυ-τελική περιοχή, όπου και εντοπίζονται τα αμινοξέα που έχουν μεταλλαγεί. Σε κάθε περίπτωση, μία πιο συνεργιστική μετάβαση κατά τη θερμική αποδιάταξη σηματοδοτεί μία πιο συμπαγή δομή με μειωμένη διαμορφωτική ευελιξία, μία ιδιότητα που κανονικά είναι αναγκαία για την αποτελεσματική αναδιαμόρφωση των λιπιδίων.

Ένα άλλο πρωτότυπο εύρημα της παρούσης μελέτης είναι ότι, αν και τα αμινοξέα F225/V227/F229/L230 αποτελούν μόνο το 5% του συνόλου των υδρόφοβων αμινοξέων της αποΑ-Ι, η υποκατάτασή τους με αλανίνη συνετέλεσε στην κατά 41% μείωση της εκπομπής φθορισμού του ANS. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι τα κατάλοιπα αυτά αποτελούν μια εκτεθειμένη υδρόφοβη περιοχή της επιφάνειας της αποΑ-Ι, όταν αυτή βρίσκεται στο διαλύτη. Συνολικά τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι τα μεταλλαγμένα αμινοξέα F225/V227/F229/L230 επηρεάζουν σημαντικά τη δομική ακεραιότητα και τη διαμορφωτική ευελιξία της αποΑ-Ι.

Συνολικά, παρατηρούμε ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά τόσο κατά τη θερμική και χημική αποδιάταξη, όσο και κατά την έκθεση των υδρόφοβων περιοχών τους στο διαλύτη. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη φύση των αμινοξέων που έχουν μεταλλαγεί, όπου υδρόφοβα αμινοξέα στο καρβοξυ-τελικό άκρο έχουν αντικατασταθεί από αλανίνη.

5.1.2 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[E223A/K226A] και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] επηρεάζουν τις λειτουργικές ιδιότητες της αποΑ-Ι.

Εξετάστηκαν δύο καλά χαρακτηρισμένες ιδιότητες της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι και της λιπιδιωμένης αποΑ-Ι, οι οποίες είναι η ικανότητά της να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 και να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT, αντίστοιχα^[13;116].

Τα λειτουργικά πειράματα έδειξαν ότι η ικανότητα της αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A], συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 και να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT είναι 20% και 65% αντίστοιχα. Για την αποΑ-Ι[E223A/K226A] βρέθηκε ότι η ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι ελαφρά αυξημένη, ενώ η ικανότητά της να ενεργοποιεί την LCAT είναι 66% συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Όσον αφορά την αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A], η ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι 23% και η ικανότητά της να ενενργοποιεί την LCAT είναι 66% συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Όσον αφορά την αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A], η ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι 23% και η ικανότητά της να ενενργοποιεί την LCAT είναι 66% συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Από τα λειτουργικά πειράματα παρατηρούμε ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] εμφανίζουν παρόμοια μείωση τόσο της ικανότητάς τους να επάγουν εκροή χοληστερόλης, όσο και της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν την LCAT.

Η μειωμένη ικανότητα των μεταλλαγμένων αποΑ-Ι αποΑ-I[L218A/L219A/V221A/L222A] και αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1 αναμένεται να επηρεάσει την ικανότητα αυτών των μεταλλάξεων να σχηματίζουν HDL *in vivo*. Όσον αφορά στην ενεργοποίηση της LCAT, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τις μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι που ενεργοποιούν ελάχιστα την LCAT, εκείνες που επιφέρουν μικρές αλλαγές στην ικανότητα της αποΑ-Ι να ενεργοποιεί την LCAT δεν προβλέπουν καλά πως επηρεάζεται η ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να ενεργοποιούν την LCAT *in vivo*^[123].

5.1.3 Οι μεταλλάξεις αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A], αποΑ-Ι[E223A/K226A] και αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] σχετίζονται με ανωμαλίες στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες της αποΑ-Ι, στις οποίες έχει γίνει απαλοιφή της περιοχής που περιέχει τα αμινοξέα 220-231 εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα να προάγουν εκροή χοληστερόλης, αδυνατούν να συνδεθούν κατάλληλα με το μεταφορέα ABCA1 καθώς και να συνθέσουν ώριμα HDL σωματίδια^[12;13].

In vivo μελέτες από τους συναδέλφούς μας (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Πανεπιστήμιο Βοστώνης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής) έδειξαν ότι η έκφραση της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] σε αποΑ-Ι-- x αποΕ--ποντίκια προάγει την παραγωγή ελαττωματικών προβ HDL σωματιδίων που αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σε υποπληθυσμούς αHDL, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της αποΑ-Ι και της HDL στο πλάσμα να είναι χαμηλά. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι ο φαινότυπος που παρουσιάζεται από τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν μπορεί να διορθωθεί με υπερέκφραση της LCAT, όπως συμβαίνει με άλλες μεταλλάξεις στην αποΑ-Ι^[15;16;123]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα λειτουργικά πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως η ικανότητα της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1, καθώς και η ικανότητά της να ενεργοποιεί την LCAT είναι μειωμένη, συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Παρά το γεγονός ότι περισσότερες από μία αιτίες μπορούν να υπάρχουν, τα *in vivo* και λειτουργικά δεδομένα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] με τον ABCA1 έχουν ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική λιπιδίωση της αποΑ-Ι, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό προβ HDL σωματιδίων, τα οποία δεν αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την LCAT και δεν μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό των ώριμων αHDL σωματιδίων.

Για την πρωτεΐνη αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α], τα *in vivo* πειράματα από τους συναδέλφους μας έδειξαν ότι σχηματίζονται σφαιρικά αHDL σωματίδια, αλλά ο λόγος των προβ σωματιδίων προς τα αHDL σωματίδια είναι αυξημένος, συγκρινόμενος με το λόγο για την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Τα λειτουργικά πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ικανότητα της πρωτεΐνης να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 είναι φυσιολογική, ενώ η ικανότητά της να ενεργοποιεί την LCAT είναι μειωμένη σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου, συμφωνώντας με τα *in vivo* αποτελέσματα. Συνολικά, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η αποΑ-Ι[Ε223Α/Κ226Α] επιφέρει μικρές αλλά διακριτές αλλαγές στις ιδιότητες της αποΑ-Ι και στη βιογένεση της HDL.

Οι in vivo μελέτες από τους συναδέλφους μας, έδειξαν ότι η αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] παρουσιάζει διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα προάγει το σχηματισμό προβ και α4 HDL σωματιδίων. Ωστόσο, η υπερέκφραση της LCAT σε αποΑ-Ι^{-/-} ή σε αποΑ-Ι--- $\alpha \pi o E^{-/-}$ х ποντίκια που υπερεκφράζουν тην αποΑ-I[F225A/V227A/F229A/L230A] διορθώνει то φαινότυπο των HDL υποπληθυσμών. Τα λειτουργικά πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως η ικανότητα της πρωτεΐνης να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1, καθώς και η ικανότητά της να ενεργοποιεί την LCAT είναι μειωμένη, συγκρινόμενη με την αποΑ-Ι αγρίου τύπου. Συνολικά, τα πειραματικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A] με τον ABCA1 έχουν ως αποτέλεσμα την αναποτελεσματική λιπιδίωση της αποΑ-Ι, οδηγώντας στο σχηματισμό προβ και α4 HDL σωματιδίων.

5.1.4 Κλινικές εφαρμογές.

Η αποΑ-Ι[L218A/L219A/V221A/L222A] παρουσιάζει ένα μοναδικό φαινότυπο, ο οποίος δεν έχει παρατηρηθεί προηγούμενα. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτού του φαινοτύπου είναι τα χαμηλά επίπεδα της HDL και ο σχηματισμός προβ και δισκοειδών σωματιδίων της HDL, τα οποία δεν ωριμάζουν περαιτέρω σε σφαιρικά HDL σωματίδια. Αντίθετα, ο φαινότυπος που παρουσιάζει η αποΑ-Ι[F225A/V227A/F229A/L230A], έχει ως κύριο χαρακτηριστικό τα χαμηλά επίπεδα της HDL, που όμως μπορούν να διορθωθούν απο την LCAT.

Έτσι λοιπόν, οι φαινότυποι που προκύπτουν από μεταλλαξιγενέσεις στην αποΑ-Ι, ίσως μπορεί να διευκολύνουν την αναγνώριση παρόμοιων φιανοτύπων που μπορεί να υπάρχουν στον ανθρώπινο πληθυσμό. Τέτοιοι φαινότυποι μπορεί να βοηθήσουν στη διάγνωση, την πρόγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία συγκεκριμένων δυσλιπιδαιμιών. Μελλοντικά φάρμακα, ίσως μπορούν να διορθώσουν τα χαμηλά επίπεδα της HDL στον ανθρώπινο πληθυσμό, που οφείλονται σε μεταλλάξεις της αποΑ-Ι ή άλλες αιτίες, μέσω της LCAT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 6.1. Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
ATP-Binding cassette Transporter A1	Μεταφορέας με Κασέτα Δέσμευσης ΑΤΡ Α1
ATP-Binding cassette Transporter G1	Μεταφορέας με Κασέτα Δέσμευσης ΑΤΡ G1
Cardiovascular Desease	Καρδιαγγειακή Νόσος
Chylomicrons	Χυλομικρά
Cholesterol Esters	Εστέρες Χοληστερόλης
Cholesteryl Ester Transfer Protein	Πρωτεΐνη Μεταφοράς Εστέρων Χοληστερόλης
Control	Άτομο αναφοράς
C-reactive protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
eNOS	Συνθάση ΝΟ του ενδοθηλίου
Free Cholesterol	Ελεύθερη χοληστερόλη
High-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
Intermediate-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Ενδιάμεσης Πυκνότητας
Mitogen-activated protein kinase	Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο
Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase	Ακυλο-Τρανσφεράση Λεκιθίνης: Χοληστερόλης
Lipoprotein Lipase	Λιποπρτεϊνική Λιπάση
Low-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
Matrix Metallopeptidases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
Monocyte Chemotactic Protein 1	Χημειοτακτικός παράγοντας μονοκυττάρων
Nitric Oxide	Μονοξείδιο του Αζώτου
Nucleotide Binding Domain	Περιοχή Πρόσδεσης Νουκλεοτιδίου
OxLDL	οξειδωμένη LDL

3-Κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης Phosphoinositide 3-kinase PhosphoLipid Transfer Protein Πρωτεΐνη Μεταφοράς Φωσφολιπιδίων **Platelet Activating Factor** Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων Platelet-Activating Factor Acetyl Ακετυλοϋδρολάση του Παράγοντα Ενεργο-Hydrolase ποίησης Αιμοπεταλίων PON1 Παραοξονάση 1 Πρωτεϊνική κινάση Β **Protein Kinase B Reactive Oxygen Species** Δραστικές Οξυγονούχες Ενώσεις **Reconstituted HDL** Ανασυγκροτημένα σωματίδια HDL **Reverse Cholesterol Transport** Ανάστροφη Μεταφορά Χοληστερόλης Υποδοχέας Εκκαθαριστής τάξη Β τύπος Ι Scavenger Receptor class B type I Serum Amyloid A Αμυλοειδές Α του Ορού Smooth Muscle Cells Λεία Μυϊκά Κύτταρα Sphingosine-1-phosphate 1-Φωσφο-σφιγγοσίνη Transforming growth factor β_2 Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β2 TriGlycerides Τριγλυκερίδια Very Low Density Lipoprotein Λιποπρωτεΐνη Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας Walker A, B, C Περιπατητής Α, Β, C Wild Type Αγρίου Τύπου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 6.2. Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

αποΑ-Ι	απολιποπρωτεΐνη Α-Ι
ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
ABCG1	ATP-Binding cassette Transporter G1
Akt	Protein kinase B
CE	Cholesterol Esters
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
cpt-cAMP	(8- (4- chlorophenylthio) adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate sodium salt)
CVD:	Cardiovascular Disease
HDL	High-Density Lipoprotein
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MMPs	Matrix Metallopeptidases
NBD	Nucleotide Binding Domain
NK	Natural killers cells
NO	Nitric Oxide
PAF-AH	Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase
РІЗК	Phosphoinositide 3-kinase
РКА	Protein Kinase A
PLTP	PhosphoLipid Transfer Protein
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidyl-Cholines

RCT	Reverse Cholesterol Transport
rHDL	reconstituted HDL
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA	Serum Amyloid A
SMCs	Smooth Muscle Cells
SRA-I	Scavenger Receptor class A type I
SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1P3	Sphingosine-1-phosphate receptor 3
TG	TriGlycerides
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wild Type

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zannis V.I., Kardassis D., Zanni E.E., Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv. Hum. Genet.* 1993, 21: 145-319.
- Zannis V.I., Kypreos K.E., Chroni A., Kardassis D., Zanni E.E., Lipoproteins and atherogenesis. In Molecular Mechanisms of Atherosclerosis. Loscalzo J. Abington, UK: Taylor & Francis, 2004, 111-74.
- 3. Zannis V.I., Chroni A., Krieger M., Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J. Mo.I Med.* 2006, 84: 276-94.
- Tall A.R., Breslow J.L., Rubin E.M., Genetic disorders affecting plasma high-density lipoproteins. In The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, Editors: Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle D., and Sly W.S. New York: McGraw-Hill, 2001, 2915-36.
- Kane J.P. and Havel R.J., Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease,Editors: Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle D., and Sly W.S. New York: McGraw-Hill, 2001, 2717-52.
- Zannis V.I., Koukos G., Drosatos K., Vezeridis A., Zanni E.E., Kypreos K.E., Chroni A., Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann. Med.* 2008, 40 Suppl 1: 14-28.
- von Eckardstein A., Nofer J.R., Assmann G., High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21: 13-27.
- Gagescu R., Demaurex N., Parton R.G., Hunziker W., Huber L.A., Gruenberg J., The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol. Biol. Cell.* 2000, 11: 2775-91.
- 9. Fielding C.J., Caveolae and signaling. Curr. Opin. Lipidol. 2001, 12: 281-7.
- 10. Remaley A.T., Stonik J.A., Demosky S.J., Neufeld E.B., Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Eggerman T.L., Patterson A.P., Duverger N.J., Santamarina-

Fojo S., Brewer H.B., Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCAI transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 280: 818-23.

- Wang N., Silver D.L., Costet P., Tall A.R., Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 33053-8.
- Chroni A., Koukos G. Duka A., Zannis V.I., The carboxy-terminal region of apoA-I is required for the ABCA1-dependent formation of alpha-HDL but not prebeta-HDL particles in vivo. *Biochemistry*. 2007, 46: 5697-708.
- Chroni A., Liu T., Gorshkova I., Kan H.Y., Uehara Y., von Eckardstein A., Zannis V.I., The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type apoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 6719-30.
- Zannis V.I, Kateifides A., Fotakis P., Zanni E., Kardassis D., Pleiotropic Functions of HDL Lead to Protection from Atherosclerosis and Other Diseases. 9, 173-98, 2012, Roya Kelishadi.
- Koukos G., Chroni A., Duka A., Kardassis D., Zannis V.I., LCAT can rescue the abnormal phenotype produced by the natural ApoA-I mutations (Leu141Arg)Pisa and (Leu159Arg)FIN. *Biochemistry*. 2007,46: 10713-21.
- Koukos G., Chroni A., Duka A., Kardassis D., Zannis V.I., Naturally occurring and bioengineered apoA-I mutations that inhibit the conversion of discoidal to spherical HDL: the abnormal HDL phenotypes can be corrected by treatment with LCAT. *Biochem. J.* 2007, 406: 167-74.
- 17. Chroni A., Kan H.Y., Kypreos K.E., Gorshkova I.N., Shkodrani A., Zannis V.I., Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice. *Biochemistry*. 2004, 43: 10442-57.
- Chroni A., Kan H.Y., Shkodrani A., Liu T., Zannis V.I., Deletions of Helices 2 and 3 of Human ApoA-I Are Associated with Severe Dyslipidemia following Adenovirus-Mediated Gene Transfer in ApoA-I-Deficient Mice. *Biochemistry*. 2005, 44: 4108-17.

- Kateifides A.K., Gorshkova I.N., Duka A., Chroni A., Kardassis D., Zannis V.I., Alteration of negatively charged residues in the 89 to 99 domain of ApoA-I affects lipid homeostasis and the maturation of HDL. *J. Lipid Res.* 2011.
- 20. Karathanasis S.K., Zannis V.I., Breslow J.L., Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983, 80: 6147-51.
- Zannis V.I., Karathanasis S.K., Keutmann H.T., Goldberger G., Breslow J.L., Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983, 80: 2574-8.
- 22. Marcel Y.L. and Kiss R.S., Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations. *Curr. Opin. Lipidol.* 2003, 14: 151-7.
- Borhani D.W., Rogers D.P., Engler J.A., Brouillette C.G., Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94: 12291-6.
- 24. Mei X. and Atkinson D., Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J. Biol. Chem.* 2011, 286: 38570-82.
- Borhani D.W., Engler J.A., Brouillette C.G., Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 1999, 55 (Pt 9): 1578-83.
- 26. Nolte R.T. and Atkinson D., Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys. J.* 1992, 63: 1221-39.
- Segrest J.P., Jones M.K., Klon A.E., Sheldahl C.J., Hellinger M., De Loof H., Harvey S.C., A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 31755-8.
- Segrest J.P., Harvey S.C., Zannis V.I., Detailed molecular model of apolipoprotein A-I on the surface of high-density lipoproteins and its functional implications. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000, 10: 246-52.
- Silva R.A., Huang R., Morris J., Fang J., Gracheva E.O., Ren G., Kontush A., Jerome W.G., Rye K.A., Davidson W.S., Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105: 12176-81.

- Huang R., Silva R.A., Jerome W.G., Kontush A., Chapman M.J., Curtiss L.K., Hodges T.J., Davidson W.S., Apolipoprotein A-I structural organization in highdensity lipoproteins isolated from human plasma. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18: 416-22.
- 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. *J. Mol. Biol.* 2013, 425: 1-16.
- 32. Santamarina-Fojo S., Peterson K., Knapper C., Qiu Y., Freeman L., Cheng J.F., Osorio J., Remaley A., Yang X.P., Haudenschild C., Prades C., Chimini G., Blackmon E., Francois T., Duverger N., Rubin E.M., Rosier M., Denefle P., Fredrickson D.S., Brewer H.B., Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97: 7987-92.
- Cavelier C., Lorenzi I., Rohrer L., von Eckardstein A., Lipid efflux by the ATPbinding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006, 1761: 655-66.
- Bungert S., Molday L.L., Molday R.S., Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 23539-46.
- Fitzgerald M.L., Mendez A.J., Moore K.J., Andersson L.P., Panjeton H.A., Freeman M.W., ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH2-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 15137-45.
- 36. Dean M., Hamon Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 2001, 42: 1007-17.
- Cavelier L.B., Qiu Y., Bielicki J.K., Afzal V., Cheng J.F., Rubin E.M., Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 18046-51.
- 38. Kim W.S., Weickert C.S., Garner B., Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J. Neurochem.* 2008, 104: 1145-66.

- Oram J.F. and Heinecke J.W., ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 2005, 85: 1343-72.
- Rigot V., Hamon Y., Chambenoit O., Alibert M., Duverger N., Chimini G., Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. *J. Lipid Res.* 2002, 43: 2077-86.
- Chambenoit O., Hamon Y., Marguet D., Rigneault H., Rosseneu M., Chimini G., Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 9955-60.
- 42. Vaughan A.M. and Oram J.F., ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 2003, 44: 1373-80.
- Panagotopulos S.E., Witting S.R., Horace E.M., Hui D.Y., Maiorano J.N., Davidson W.S., The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 39477-84.
- Fitzgerald M.L., Morris A.L., Chroni A., Mendez A.J., Zannis V.I., Freeman M.W., ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 2004, 45: 287-94.
- Fitzgerald M.L., Morris A.L., Rhee J.S., Andersson L.P., Mendez A.J., Freeman M.W., Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 33178-87.
- 46. Liu Y. and Tang C., Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012, 1821: 522-9.
- Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., Anantharamaiah G.M., The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 1992, 33: 141-66.
- Mendez A.J., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Oram J.F., Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. *J. Clin. Invest.* 1994, 94: 1698-705.
- 49. Remaley A.T., Thomas F., Stonik J.A., Demosky S.J., Bark S.E., Neufeld E.B., Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Patterson A.P., Eggerman T.L., Santamarina-

Fojo S., Brewer H.B., Synthetic amphipathic helical peptide mediated efflux of lipid from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. *J. Lipid Res.* 2003, 44: 828-36.

- Yancey P.G., Bielicki J.K., Johnson W.J., Lund-Katz S., Palgunachari M.N., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Phillips M.C., Rothblat G.H., Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry*. 1995, 34: 7955-65.
- 51. Glomset J.A., The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1962, 65: 128-35.
- 52. Jonas A., Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000, 1529: 245-56.
- Chen C.H. and Albers J.J., Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, 107: 1091-6.
- Peelman F., Vinaimont N., Verhee A., Vanloo B., Verschelde J.L., Labeur C., Seguret-Mace S., Duverger N., Hutchinson G., Vandekerckhove J., Tavernier J., Rosseneu M., A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci.* 1998, 7: 587-99.
- Yang C.Y., Manoogian D., Pao Q., Lee F.S., Knapp R.D., Gotto A.M., Pownall H.J., Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 1987, 262: 3086-91.
- 56. Holleboom A.G., Kuivenhoven J.A., Peelman F., Schimmel A.W., Peter J., Defesche J.C., Kastelein J.J., Hovingh G.K., Stroes E.S., Motazacker M.M., High prevalence of mutations in LCAT in patients with low HDL cholesterol levels in The Netherlands: identification and characterization of eight novel mutations. *Hum. Mutat.* 2011, 32: 1290-8.
- 57. Jonas A., Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog. Lipid Res.* 1998, 37: 209-34.

- Francone O.L. and Fielding C.J., Structure-function relationships in human lecithin:cholesterol acyltransferase. Site-directed mutagenesis at serine residues 181 and 216. *Biochemistry*. 1991, 30: 10074-7.
- Nakamura Y., Kotite L., Gan Y., Spencer T.A., Fielding C.J., Fielding P.E., Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-betamigrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 2004, 43: 14811-20.
- 60. Rye K.A. and Barter P.J., Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipidpoor apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24: 421-8.
- Calabresi L., Simonelli S., Gomaraschi M., Franceschini G., Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2012, 222: 299-306.
- 62. Glomset J.A., The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* 1968, 9: 155-67.
- Matsuura F., Wang N., Chen W., Jiang X.C., Tall A.R., HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 2006, 116: 1435-42.
- Calabresi L. and Franceschini G., Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc. Med.* 2010, 20: 50-3.
- 65. Lusis A.J., Atherosclerosis. Nature. 2000, 407: 233-41.
- 66. Keaney J.F., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 2000, 21: 99-166.
- 67. Eren E., Yilmaz N., Aydin O., High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem. J.* 2012, 6: 78-93.
- Negre-Salvayre A., Dousset N., Ferretti G., Bacchetti T., Curatola G., Salvayre R., Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 41: 1031-40.
- Navab M., Berliner J.A., Subbanagounder G., Hama S., Lusis A.J., Castellani L.W., Reddy S., Shih D., Shi W., Watson A.D., Van Lenten B.J., Vora D., Fogelman A.M., HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21: 481-8.
- Badimon L. and Vilahur G., LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012, 1254: 18-32.
- Marsche G., Saemann M.D., Heinemann A., Holzer M., Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol. Ther.* 2013, 137: 341-51.
- 72. Brewer H.B., High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24: 387-91.
- Bowry V.W., Stanley K.K., Stocker R., High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89: 10316-20.
- Sattler W. and Stocker R., Greater selective uptake by Hep G2 cells of high-density lipoprotein cholesteryl ester hydroperoxides than of unoxidized cholesteryl esters. *Biochem. J.* 1993, 294 (Pt 3): 771-8.
- Watson A.D., Navab M., Hama S.Y., Sevanian A., Prescott S.M., Stafforini D.M., McIntyre T.M., Du B.N., Fogelman A.M., Berliner J.A., Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995, 95: 774-82.
- Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y., La Du B.N., Faull K.F., Fogelman A.M., Navab M., Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 2882-91.
- 77. Glomset J.A. and Verdery R.B., Role of LCAT in cholesterol metabolism. *Expos. Annu. Biochim. Med.* 1977, 33: 137-42.
- Goyal J., Wang K., Liu M., Subbaiah P.V., Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 16231-9.
- Navab M., Hama S.Y., Anantharamaiah G.M., Hassan K., Hough G.P., Watson A.D., Reddy S.T., Sevanian A., Fonarow G.C., Fogelman A.M., Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J. Lipid Res.* 2000, 41: 1495-508.

- 80. Tselepis A.D. and John C.M., Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler. Suppl.* 2002, 3: 57-68.
- 81. Assmann G. and Gotto A.M., HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*. 2004, 109: III8-14.
- Mineo C., Yuhanna I.S., Quon M.J., Shaul P.W., High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 9142-9.
- Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., Marcel Y.L., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Hobbs H.H., Shaul P.W., High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 2001, 7: 853-7.
- Assanasen C., Mineo C., Seetharam D., Yuhanna I.S., Marcel Y.L., Connelly M.A., Williams D.L., Llera-Moya M., Shaul P.W., Silver D.L., Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 969-77.
- Nofer J.R., van der Giet M., Tolle M., Wolinska I., von Wnuck L.K., Baba H.A., Tietge U.J., Godecke A., Ishii I., Kleuser B., Schafers M., Fobker M., Zidek W., Assmann G., Chun J., Levkau B., HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J. Clin. Invest.* 2004, 113: 569-81.
- Spieker L.E., Sudano I., Hurlimann D., Lerch P.G., Lang M.G., Binggeli C., Corti R., Ruschitzka F., Luscher T.F., Noll G., High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation.* 2002, 105: 1399-402.
- Bisoendial R.J., Hovingh G.K., Levels J.H., Lerch P.G., Andresen I., Hayden M.R., Kastelein J.J., Stroes E.S., Restoration of endothelial function by increasing highdensity lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation.* 2003, 107: 2944-8.
- Nofer J.R., Tepel M., Kehrel B., Walter M., Seedorf U., Assmann G., Zidek W., High density lipoproteins enhance the Na+/H+ antiport in human platelets. *Thromb. Haemost.* 1996, 75: 635-41.

- Aviram M., Sirtori C.R., Colli S., Maderna P., Morazzoni G., Tremoli E., Plasma lipoproteins affect platelet malondialdehyde and thromboxane B2 production. *Biochem. Med.* 1985, 34: 29-36.
- Mehta J.L. and Chen L.Y., Reversal by high-density lipoprotein of the effect of oxidized low-density lipoprotein on nitric oxide synthase protein expression in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 1996, 127: 287-95.
- 91. Korporaal S.J. and Akkerman J.W., Platelet activation by low density lipoprotein and high density lipoprotein. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2006, 35: 270-80.
- Li D., Weng S., Yang B., Zander D.S., Saldeen T., Nichols W.W., Khan S., Mehta J.L., Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19: 378-83.
- Vinals M., Martinez-Gonzalez J., Badimon J.J., Badimon L., HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17: 3481-8.
- Vinals M., Martinez-Gonzalez J., Badimon L., Regulatory effects of HDL on smooth muscle cell prostacyclin release. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19: 2405-11.
- 95. Pirich C., Efthimiou Y., O'Grady J., Sinzinger H., Hyperalphalipoproteinemia and prostaglandin I2 stability. *Thromb. Res.* 1997, 88: 41-9.
- Escudero I., Martinez-Gonzalez J., Alonso R., Mata P., Badimon L., Experimental and interventional dietary study in humans on the role of HDL fatty acid composition in PGI2 release and Cox-2 expression by VSMC. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003, 33: 779-86.
- 97. Griffin J.H., Kojima K., Banka C.L., Curtiss L.K., Fernandez J.A., High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 219-27.
- Kopaciewicz W., Rounds M.A., Fausnaugh J., Regnier F.E., Retention Model for High-Performance Ion-Exchange Chromatography. Journal of Chromatography. 1983, 266: 3-21.
- Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 1970, 227: 680-685.

- 100. Georgiadou D., Stamatakis K., Efthimiadou E.K., Kordas G., Gantz D., Chroni A., Stratikos E., Thermodynamic and structural destabilization of apoE3 by hereditary mutations associated with the development of lipoprotein glomerulopathy. *J. Lipid Res.* 2013, 54: 164-76.
- 101. Chroni A., Kan H.Y., Kypreos K.E., Gorshkova I.N., Shkodrani A., Zannis V.I., Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice. *Biochemistry*. 2004, 43: 10442-57.
- 102. Greenfield N.J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols.* 2006, 1: 2876-90.
- Woody R.W., A significant role for high-energy transitions in the ultraviolet circular dichroism spectra of polypeptides and proteins. *Chirality*. 2010, 22 Suppl 1: E22-E29.
- Rosenheck K. and Doty P., The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1961, 47: 1775-85.
- 105. Greenfield N. and Fasman G.D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*. 1969, 8: 4108-16.
- Chroni A., Pyrpassopoulos S., Thanassoulas A., Nounesis G., Zannis V.I., Stratikos E., Biophysical analysis of progressive C-terminal truncations of human apolipoprotein E4: insights into secondary structure and unfolding properties. *Biochemistry.* 2008, 47: 9071-80.
- Gorshkova I.N., Liadaki K., Gursky O., Atkinson D., Zannis V.I., Probing the lipidfree structure and stability of apolipoprotein A-I by mutation. *Biochemistry.* 2000, 39: 15910-9.
- Tanaka M., Vedhachalam C., Sakamoto T., Dhanasekaran P., Phillips M.C., Lund-Katz S., Saito H., Effect of carboxyl-terminal truncation on structure and lipid interaction of human apolipoprotein E4. *Biochemistry*. 2006, 45: 4240-7.
- 109. Saito H., Dhanasekaran P., Nguyen D., Holvoet P., Lund-Katz S., Phillips M.C., Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model 1. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 23227-32.

- 110. Pace C.N. and Vanderburg K.E., Determining globular protein stability: guanidine hydrochloride denaturation of myoglobin. *Biochemistry*. 1979, 18: 288-92.
- 111. Mei X.H. and Atkinson D., Determining the Folding Domain of Lipid Free Apoa-I in Solution by Mutation. *Heart.* 2012, 98: E273-E275.
- 112. Clark J.M.and Switzer R.L. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 1992
- 113. Kobayashi Y. Mandsley D.V., Biological Applications of Liquid Scintillation Counting. 1974. London, Academic Press. Ref Type: Generic.
- 114. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-75.
- 115. Matz C.E. and Jonas A., Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 4535-40.
- 116. Laccotripe M., Makrides S.C., Jonas A., Zannis V.I., The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 17511-22.
- 117. Chroni A., Liu T., Fitzgerald M.L., Freeman M.W., Zannis V.I., Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry*. 2004, 43: 2126-39.
- 118. Gorshkova I.N., Liu T., Kan H.Y., Chroni A., Zannis V.I., Atkinson D., Structure and stability of apolipoprotein a-I in solution and in discoidal high-density lipoprotein probed by double charge ablation and deletion mutation. *Biochemistry*. 2006, 45: 1242-54.
- 119. Zannis V.I., ApoA-I functions and synthesis of HDL: Insights from mouse models of human HDL metabolism. High-Density Lipoproteins. From Basic Biology to Clinical Aspects. 2006, 237-65, Wiley-VCH, Weinheim. Ref Type: Generic.
- 120. Francone O.L., Subbaiah P.V., van Tol A., Royer L., Haghpassand M., Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking Abca1. *Biochemistry*. 2003, 42: 8569-78.
- 121. Asztalos B.F., Brousseau M.E., McNamara J.R., Horvath K.V., Roheim P.S., Schaefer E.J., Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis*. 2001, 156: 217-25.

- 122. Segrest J.P., Li L., Anantharamaiah G.M., Harvey S.C., Liadaki K.N., Zannis V.I., Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000, 11: 105-15.
- 123. Chroni A., Duka A., Kan H.Y., Liu T., Zannis V.I., Point mutations in apolipoprotein A-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochemistry*. 2005, 44: 14353-66.