



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη του ρόλου διαφόρων πρωτεϊνών  
(αποΑ-I, μεταφορείς χοληστερόλης, ένζυμα)  
του μονοπατιού της HDL»**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΑΝΙΗΛ  
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2013**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

«Μελέτη του ρόλου διαφόρων πρωτεϊνών (αποΑ-I, μεταφορείς χοληστερόλης, ένζυμα) του μονοπατιού της HDL»

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΑΝΙΗΛ**

**A.M.: 62719**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ  
Δημόκριτος

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Β', Ι. Βιοεπισημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Κωνσταντίνος Δημόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Τζώρτζης Νομικός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,  
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α', Ι. Βιοεπισημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 18/7/13



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αν και τα χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) έχουν συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι λειτουργίες της HDL καθορίζονται καλύτερα από την ποιότητα παρά από την ποσότητα της. Η HDL αποτελείται από υποπληθυσμούς που διαφέρουν σε μέγεθος, σχήμα και σύσταση. Η κύρια πρωτεΐνη της HDL είναι η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I), που της προσδίδει πολλές από τις ιδιότητες της. Οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL περιλαμβάνουν την ικανότητα απομάκρυνσης χοληστερόλης από κύτταρα, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αγγειοδιασταλτικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Ο στόχος της μελέτης μας ήταν να χαρακτηρίσουμε τις ιδιότητες της HDL σε παθολογικές καταστάσεις, καθώς και να κατανοήσουμε τις πιθανές αλλαγές. Μελετώντας HDL από άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL, δείξαμε ότι μεταλλάξεις στις αποA-I, ABCA1 και LCAT, τρεις κύριες πρωτεΐνες για τη βιοσύνθεση της HDL, επηρεάζουν τη σύσταση της HDL με αποτέλεσμα τη μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα της και οδηγούν σε ευκρινώς διαφορετικές κατανομές HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποA-I. Τέτοιες αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφορική διάγνωση οικογενών συνδρόμων χαμηλής HDL. Επιπλέον, μελετήσαμε το ρόλο της αποA-I στην ικανότητα της HDL να προάγει κυτταρική εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1, ένα μεταφορέα χοληστερόλης που εμπλέκεται στην παρεμπόδιση συσσώρευσης χοληστερόλης στα μακροφάγα διαφόρων ιστών. Δείξαμε ότι η μέσω ABCG1 εκροή χοληστερόλης μειώνεται απουσία του καρβοξυ-τελικού άκρου από την πλήρους μήκους αποA-I της ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) ή ύστερα από περιορισμένη πρωτεόλυση της αποA-I της rHDL από πλασμίνη, μια πρωτεάση που βρίσκεται στον υπο-ενδοθηλιακό αρτηριακό χώρο. Συνεπώς, αυξημένη πρωτεόλυση της αποA-I της HDL σε παθολογικές καταστάσεις in vivo μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της HDL να προάγει εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα. Τα αποτελέσματά μας συνολικά, παρέχουν νέες πληροφορίες για το πώς επηρεάζονται οι ιδιότητες της HDL σε παθολογικές καταστάσεις. Πλήρης κατανόηση των (δυσ)λειτουργιών της HDL θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε νέους στόχους για τη διάγνωση και θεραπεία της χαμηλής HDL και της αθηροσκλήρωσης.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Βιοχημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** HDL, αποA-I, αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL, υποπληθυσμοί HDL, εκροή χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης μέσω ABCG1

## ABSTRACT

Although low levels of high-density lipoprotein (HDL) -cholesterol have been associated with increased risk factor for cardiovascular disease, recent studies suggested that HDL functions are determined by the quality rather than by the quantity of HDL. HDL exists in multiple subpopulations that differ in size, shape, and composition. The main protein constituent of HDL is apolipoprotein A-I (apoA-I) that confers many of HDL functions. HDL antiatherogenic properties include its ability to remove cholesterol from cells, such as macrophages in the artery wall, as well as anti-inflammatory, anti-oxidant, vasodilatory, and antithrombotic properties. The aim of the current study was to characterize the HDL properties under pathologic conditions, as well as understand the pathways that affect the HDL properties. Analysis of HDL in families with monogenic low HDL disorders showed that mutations in apoA-I, ABCA1 or LCAT, three proteins that are involved in the HDL biogenesis pathway, affect HDL composition that leads to reduced antioxidant/anti-inflammatory capacity of HDL and result to distinctly different apoA-I-containing HDL subpopulation profiles. These types of analyses could prove valuable in differential diagnosis of familial low HDL syndromes. In addition, we studied the role of apoA-I in the ability of HDL to promote cellular cholesterol efflux mediated by ABCG1, a cholesterol transporter associated with the prevention of cholesterol accumulation in macrophages within multiple tissues. Our findings showed that ABCG1-mediated efflux of cholesterol and to a much lesser effect of 7-ketocholesterol is decreased by deletion of the carboxyl-terminal domain from full-length apoA-I bound to reconstituted HDL (rHDL). The capacity of rHDL containing wild-type apoA-I to promote ABCG1-dependent cholesterol efflux was also significantly reduced following limited proteolysis of rHDL by plasmin, a protease found in the arterial intima. Therefore, our findings may have physiological significance since increased proteolysis, under pathologic conditions, of HDL-associated apoA-I *in vivo* may affect the capacity of HDL to promote cholesterol efflux from macrophages. Our results, taken as whole, provide new knowledge on how HDL properties can be affected under pathologic conditions. An improved understanding of HDL function and dysfunction will help us identify new targets for diagnosis, prognosis, therapy and prevention of low HDL cholesterol and atherosclerosis.

**SUBJECT AREA:** Biochemistry

**KEYWORDS:** HDL, apoA-I, antioxidant/anti-inflammatory properties of HDL, HDL subpopulations, ABCG1-mediated cholesterol and 7-keto-cholesterol efflux

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	20
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
1.1 Λιποπρωτεΐνες .....	20
1.2 Το μονοπάτι βιογένεσης και καταβολισμού της HDL.....	21
1.3 Απολιποπρωτεΐνη A-I (αποΑ-I) .....	22
1.3.1 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I .....	22
1.3.2 Η δομή της λιπιδιωμένης αποΑ-I .....	24
1.4 Ο Μεταφορέας ABCA1 .....	32
1.4.1 Η δομή του ABCA1.....	32
1.4.2 ABCA1 & εκροή χοληστερόλης.....	32
1.4.3 ABCA1 & φλεγμονή .....	35
1.5 LCAT .....	36
1.5.1 Η δομή της LCAT.....	36
1.5.2 Η λειτουργία της LCAT στο μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης.....	38
1.6 Μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL .....	39
1.7 Ο Μεταφορέας ABCG1 .....	39
1.7.1 Η δομή του ABCG1 .....	39
1.7.2 Ο ρόλος του ABCG1 στην εκροή στερολών .....	41
1.7.3 Κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργία του ABCG1.....	41
1.7.4 Ο ρόλος του ABCG1 στην φλεγμονή .....	42
1.8 Κυκλοφορικό σύστημα και Αθηροσκλήρωση .....	43
1.8.1 Το κυκλοφορικό σύστημα και ο ρόλος του.....	43
1.8.2 Η δομή μιας μεγάλης αρτηρίας .....	44

1.8.3 Αθηροσκλήρωση, η πάθηση των μεγάλων αρτηριών .....	44
1.9 HDL: Σύσταση και λειτουργία .....	47
1.9.1 Η σύσταση της HDL .....	47
1.9.2 Υποπληθυσμοί της HDL .....	47
1.9.3 Οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL.....	49
1.9.3.1 Η HDL και το μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης .....	50
1.9.3.2 Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL .....	50
1.9.3.3 Οι ενδοθηλιο-προστατευτικές ιδιότητες της HDL.....	53
1.9.3.4 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL .....	54
1.9.4 Τροποποίηση της HDL σε παθολογικές καταστάσεις .....	55
1.9.5 Θεραπείες που στοχεύουν την HDL .....	57
1.9.5.1 Χορήγηση δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) .....	58
1.9.5.2 Χορήγηση αποΑ-I .....	58
1.9.5.3 Χορήγηση μιμητικών πεπτιδίων της αποΑ-I.....	59
1.9.5.4 Στοχεύοντας την HDL μέσω της Μυελοϋπεροξειδάσης (MPO).....	59
1.9.5.5 Αναστολείς CETP.....	59
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>61</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>61</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>64</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ .....</b>	<b>64</b>
3.1 Απομόνωση της HDL από τον ορό του αίματος.....	64
3.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των HDL με την δοκιμασία μέτρησης 2,7 διχλωροφθοροσκεΐνης (DCF) .....	65
3.3 Προσδιορισμός της δραστικότητας ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF-AH: PAF-acetylhydrolase) στην HDL .....	66
3.4 Προσδιορισμός δραστικότητας παραοξονάσης του ενζύμου PON1 .....	67
3.5 Προσδιορισμός των επιπέδων του αμυλοειδούς Α του ορού (SAA: Serum Amyloid A), του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF: Platelet Activating	

Factor) και της λιποπρωτεΐνης a [Lp(a): Lipoprotein (a)] στην HDL μέσω της ένζυμο- σύνδετης ανοσοπροσοροφητικής δοκιμασίας τύπου «sandwich» (ELISA sandwich: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay sandwich).....	68
3.6 Προσδιορισμός των επιπέδων μηλονικής-διαλδεΐδης (MDA: malondialdehyde).	70
3.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και μη αποδιατακτικές συνθήκες .....	71
3.8 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων .....	74
3.9 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά western .....	76
3.10 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL: reconstituted HDL).....	78
3.11 Προσδιορισμός Φωσφολιπιδίων .....	79
3.12 Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης.....	80
3.13 Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry .....	82
3.14 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών J774, RAW 264.7 και HEK293 .....	82
3.15 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης από μακροφάγα J774 .....	85
3.16 Επιμόλυνση κυτάρων θηλαστικού .....	88
3.17 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1.....	89
3.18 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών.....	91
3.19 Μελέτη της πλευρικής διάχυσης των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη κυτάρων HEK293 .....	91
3.20 Πρωτεόλυση rHDL σωματιδίων.....	93
3.21 Διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNA interfering) σε κύτταρα RAW264.7 .....	94
3.22 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα HEK293 και RAW264.7 .....	95
3.23 Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού RNA και πλασμιδιακού DNA .....	97



3.24 Ηλεκτροφόρηση RNA.....	98
3.25 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) .....	99
3.26 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)	101
3.27 Επώαση HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1 παρουσία ή απουσία αναστολεων για τον JAK2, την STAT3 και PI3K.....	104
3.28 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων E.coli XL1-Blue και BL21(DE3) .....	106
3.29 Παραγωγή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων E.coli XL1-Blue μικρής έκτασης (mini prep).....	108
3.30 Παραγωγή ανασυγκροτημένης πρωτεάσης rTEV (reconstituted Tobacco Etched Viral) σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της <i>Escherichia coli</i> . .....	109
3.31 Καθαρισμός ανασυγκροτημένης πρωτεάσης rTEV (reconstituted Tobacco Etched Viral) σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της <i>Escherichia coli</i> . .....	110
3.32 Πληθυσμός ασθενών .....	112
3.32.1 Άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL .....	112
3.32.2 Άτομα με στεφανιαία νόσο.....	112
3.33 Στατιστική ανάλυση.....	113
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b> .....	114
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	114
4.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HDL από άτομα με συγκεκριμένες διαταραχές του μεταβολισμού της HDL ή από άτομα με στεφανιαία νόσο.....	114
4.1.1 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και των υποπληθυσμών της που περιέχουν apoA-I από άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL.....	114
4.1.1.1 Ετεροζυγώτες για την apoA-I[ρ.L202P] και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών.....	115
4.1.1.2 Φορείς μεταλλάξεων στον ABCA1, καθώς και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών.....	119

4.1.1.3 Φορείς μεταλλάξεων στην LCAT, καθώς και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών.....	124
4.1.2 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από μεγάλο αριθμό ατόμων με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT .....	127
4.1.3 Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από άτομα με στεφανιαία νόσο και της ικανότητας της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1.....	131
4.2 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I στην αλληλεπίδραση μεταξύ της HDL και του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 που οδηγεί στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Μελέτη του ρόλου του ABCG1 σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις.....	136
4.2.1 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I αγρίου τύπου (WT) και διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της ως απαραίτητο συστατικό των ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL) στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή στερολών .....	136
4.2.1.1 Προετοιμασία των απολιποπρωτεϊνών (αποΑ-I) πριν την παρασκευή ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL) .....	137
4.2.1.2 Μελέτη της ικανότητας των rHDL να προάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1: Η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I ελλειματικών στο αμινο-τελικό άκρο, καρβοξυ-τελικό άκρο, σε εσωτερικές περιοχές ή με σημειακές μεταλλάξεις .....	142
4.2.1.3 Η επίδραση της ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποΑ-I αποΑ-I[Δ(185–243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μύς J774 .....	148
4.2.1.4 Η επίδραση της ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποΑ-I αποΑ-I[Δ(185–243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 και από μακροφάγα μύς J774.....	149
4.2.1.5 Η επίδραση της χοληστερόλης και της 7-κετο-χοληστερόλης στην ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης από HEK293 που εκφράζουν τον ABCG1 και έχουν σημειωθεί με 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ.....	152
4.2.1.6 Η επίδραση της πρωτεόλυσης της αποΑ-I στην ικανότητα των rHDL να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.....	154

4.2.2 Σχέση ABCG1 και φλεγμονής - ABCG1 & φλεγμονώδεις – αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες .....	156
4.2.2.1 Μελέτη των επιπέδων mRNA διαφόρων κυτταροκινών σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία rHDL που περιέχει την WT αποΑ-I .....	156
4.2.2.2 Μελέτη των επιπέδων mRNA του TNF-α σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία του αναστολέα της STAT3.....	162
4.2.2.3 Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης pSTAT3 σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία του αναστολέα της JAK2 και της PI3K .....	163
4.2.2.4 Μελέτη των επιπέδων mRNA του TNFα σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ύστερα από τη διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNAi).....	167
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....</b>	<b>172</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>172</b>
5.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HDL από άτομα με συγκεκριμένες διαταραχές του μεταβολισμού της HDL ή από άτομα με στεφανιαία νόσο (ΣΝ). .....	172
5.1.1 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και των υποπληθυσμών της που περιέχουν αποΑ-I από άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL.....	172
5.1.2 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από μεγάλο αριθμό ατόμων με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT .....	176
5.1.3 Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από άτομα με στεφανιαία νόσο και της ικανότητας της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1 .....	180
5.2 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I στην αλληλεπίδραση μεταξύ της HDL και του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 που οδηγεί στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Μελέτη του ρόλου του ABCG1 σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις.....	181

5.2.1 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I αγρίου τύπου (WT) και διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της ως απαραίτητο συστατικό των ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL) στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή στερολών .....	181
5.2.2 Σχέση ABCG1 και φλεγμονής - ABCG1 & φλεγμονώδεις – αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες.....	187
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....</b>	<b>190</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>190</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>193</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>195</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού της HDL.....	22
Εικόνα 1.2. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της αποΑ-I στο αμινο-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(1-43)].....	23
Εικόνα 1.3. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της αποΑ-I στο καρβοξυ-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(185-243)].....	25
Εικόνα 1.4. Η δευτεροταγής δομή της αποΑ-I του ανθρώπου βασισμένη σε κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ διαφορετικών ελλειματικών μορφών της αποΑ-I.....	26
Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου “ricket fence” της δισκοειδούς HDL.....	26
Εικόνα 1.6. Το μοντέλο «double belt» της δισκοειδούς HDL.....	27
Εικόνα 1.7. Το μοντέλο “Looped belt” της αποΑ-I σε δισκοειδή rHDL.....	28
Εικόνα 1.8. Σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των μορίων της αποΑ-I σε ένα δισκοειδές σωματίδιο “double belt” και σε ένα σφαιρικό σωματίδιο.....	28
Εικόνα 1.9. Μοριακή περιστροφή απαιτείται να επιτύχει η αποΑ-I της HDL που περιέχει αποΑ-I (LpA-I) για να διαμορφώσει το μέγεθος της.....	29
Εικόνα 1.10. Αναγέννηση του μοντέλου σφαιροειδών HDL σωματιδίων.....	30
Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-I πλήρους μήκους στο μοντέλο “double belt” (Γ-Δ) βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της αποΑ-I(Δ185-243). .....	31
Εικόνα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-I πλήρους μήκους σε δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια (μετά την δράση του ενζύμου LCAT), καθώς αυτά μεγαλώνουν σε μέγεθος με την πρόσληψη χοληστερόλης στο μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. P (προλίνη), G (γλυκίνη)....	33
Εικόνα 1.13. Σχηματική παράσταση της δομής του ABCA1 μεταφορέα.....	33
Εικόνα 1.14. Η κεντρική περιοχή του ενζύμου LCAT.....	37
Εικόνα 1.15. Ο ρόλος της LCAT στον μεταβολισμό της HDL.....	37
Εικόνα 1.16. Α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής μέλους της οικογένειας των ABCG ημι-μεταφορέων που περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (ABC) και μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD), αποτελούμενη από 6 εναλλασσόμενες α-έλικες.....	40
Εικόνα 1.17. Η δομή μιας μεγάλης φυσιολογικής αρτηρίας.....	45
Εικόνα 1.18. Α-Γ. Ανάλυση της HDL ανθρώπινου πλάσματος που περιέχει αποΑ-I, σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων, με βάση το φορτίο και το μέγεθος των σωματιδίων. ....	49
Εικόνα 1.19. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. ....	51

Εικόνα 1.20. Η οδοί πρόσληψης φυσιολογικής και τροποποιημένης LDL από μακροφάγα κύτταρα. ....	53
Εικόνα 3.1. Καμπύλη ενίσχυσης (φθορισμός ως προς αριθμό κύκλων) των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου της GAPDH σε κύτταρα HEK293.....	103
Εικόνα 4.1. Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών για την αποA-I[r.L202P] (αποA-I Het) καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	117
Εικόνα 4.2. Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και ανάλυση των υποπληθυσμών της HDL ετεροζυγωτών για την αποA-I[r.L202P] (αποA-I Het) καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	120
Εικόνα 4.3. Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για τον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	121
Εικόνα 4.4. Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για τον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	123
Εικόνα 4.5. Ανάλυση των υποπληθυσμών της ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για μεταλλάξει στον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	124
Εικόνα 4.6. Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για την LCAT (Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	125
Εικόνα 4.7. Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για την LCAT (Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	127
Εικόνα 4.8. Ανάλυση των υποπληθυσμών της ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για μεταλλάξεις στην LCAT (Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	127
Εικόνα 4.9. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την LCAT (LCAT Het, LCAT Hom), καθώς και των ατόμων αναφοράς με την δοκιμασία του DCF.....	128
Εικόνα 4.10. Δραστικότητα A) του ενζύμου PON1 και B) του ενζύμου PAF-AH της HDL ετεροζυγωτών, και ομοζυγωτών για την LCAT (Het LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς .....	130
Εικόνα 4.11. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease), καθώς και των ατόμων αναφοράς με την δοκιμασία του DCF.....	132
Εικόνα 4.12. Ολική και εξαρτώμενη από ABCA1 (net) εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μύς J774 παρουσία 10μg/mL HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	

(ACS: Acute Coronary Syndrome) (n=10), ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease) (n=10) και ατόμων αναφοράς (n=10).....133

Εικόνα 4.13. Εξαρτώμενη από ABCG1 (net) εκροή χοληστερόλης από HEK 293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1 παρουσία 1μM HDL ατόμων αναφοράς (n=10) και HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome) (n=10) και ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease) (n=10).....135

Εικόνα 4.14. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) της *Escherichia Coli* που λήφθηκαν 2h μετά την επαγωγή έκφρασης της rTEV με IPTG συγκέντρωσης (1) 0mM, (2) 0,1mM και (3) 1mM και 4h μετά την επαγωγή έκφρασης της rTEV με IPTG συγκέντρωσης (5) 1mM, (6) 0,1mM και(7) 0Mm, (4) πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.....138

Εικόνα 4.15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% από δείγμα καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) της *Escherichia Coli* (1) πριν την επαγωγή με IPTG, (2) μετά την λύση και φυγοκέντρηση των κυττάρων, (3) δείγμα από τα κύτταρα πριν λυθούν, (4) πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, (5) δείγμα από το λύμα που δεν προσδένεται στην ρητίνη νικελίου, (6) δείγμα από την έκπλυση της ρητίνης νικελίου με διάλυμα, πριν την έκλουση του ενζύμου, (7) δείγμα από έκλουσμα rTEV πριν την συμπύκνωση του διαλύματος (φορτώθηκε το 0,77% της συνολικής πρωτεΐνης), (8) δείγμα από έκλουσμα rTEV μετά την συμπύκνωση του διαλύματος (φορτώθηκε το 0,68% της συνολικής πρωτεΐνης).....139

Εικόνα 4.16. Ανοσοαποτύπωση κατά western δείγματος από έκλουσμα rTEV (2) πριν την συμπύκνωση του διαλύματος και (3) μετά την συμπύκνωση του διαλύματος με χρήση αντισώματος έναντι 5 καταλοίπων ιστιδίνης. (1) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. ....139

Εικόνα 4.17. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων A) από πέψεις WT αποA-I 125μg με ολονύχτια επώαση στους 4°C (διαδρομές 1-3), με ολονύχτια επώαση στους 4°C και μετά επώαση στους 16 °C για 1h (διαδρομές 6-8), με ολονύχτια επώαση στους 4°C, επώαση στους 16°C για 1h και επώαση στους 30°C για ακόμα 1h (διαδρομές 9-11) με 0,02μg (διαδρομές 1, 6, 9) 0,2μg (διαδρομές 2, 7, 10) και 2μg rTEV (διαδρομές 3, 8, 11). Στην διαδρομή 5 υπάρχει δείγμα από άκοπη αποA-I και στην διαδρομή 4 είναι πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. B) από τον καθαρισμό της αποA-I σε στήλη ρητίνης νικελίου ύστερα από πέψη της με rTEV (διαδρομή 3), από άκοπη αποA-I (διαδρομή 2) και από πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (διαδρομή 1). ....141

Εικόνα 4.18. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I ελλειματικές σε εσωτερικές περιοχές ή αποA-I με σημειακές μεταλλάξεις στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.....143

Εικόνα 4.19A-Γ. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I ελλειματικές στο αμινο-τελικό άκρο, στο καρβοξυ-τελικό άκρο ή στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1).....145

Εικόνα 4.20A-B. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I ελλειματικές στο καρβοξυ-τελικό άκρο στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1).....	147
Εικόνα 4.21. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I WT ή την ελλειματική στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποΑ-I αποΑ-I[Δ(185-243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης J774 μακροφάγα μυός.....	150
Εικόνα 4.22A-Γ. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I WT ή την ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποΑ-I αποΑ-I[Δ(185-243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και από J774 μακροφάγα κύτταρα μυός.....	151
Εικόνα 4.23. Η ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης των HEK293 κυττάρων που επώαστηκαν με χοληστερόλη και 7-κετοχοληστερόλη μελετήθηκε με 1-πυρενο-δωδεκανοϊκό οξύ.....	153
Εικόνα 4.24. Επίδραση της πλασμίνης στην ικανότητα των rHDL που περιέχουν την WT αποΑ-I να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.....	155
Εικόνα 4.25. Ηλεκτροφορήματα RNA κυττάρων HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), επώαστηκαν παρουσία και απουσία 1 μM rHDL WT αποΑ-I για 24 ώρες σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) ύστερα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.....	157
Εικόνα 4.26. Πρόγραμμα PCR σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων του TNFα, της IL-1β, της IL-10 και της GAPDH στα κύτταρα HEK293.....	159
Εικόνα 4.27. Επίδραση της έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία rHDL-αποΑ-I WT στα επίπεδα του mRNA του TNFα (Α), της IL-1β (Β) και της IL-10 (Γ), σε κύτταρα HEK293.....	161
Εικόνα 4.28. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα του STAT3 στα επίπεδα του mRNA του TNFα σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.....	163
Εικόνα 4.29. Επίδραση 30 μM αναστολέα του JAK2 (AG490) στα επίπεδα της πρωτεΐνης pSTAT3 σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.....	165
Εικόνα 4.30. Επίδραση 100 μM αναστολέα του JAK2 (AG490) ή 0,1 μM αναστολέα της PI3K (Βορτμανίνη) στα επίπεδα της πρωτεΐνης pSTAT3 σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.....	166
Εικόνα 4.31. Φωτογραφία από μικροσκόπιο φθορισμού κυττάρων RAW 264.7 6h μετά την ταυτόχρονη επιμόλυνση τους με BLOCK-iT™ φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, μαζί με RNAi έναντι του ABCG1 μυός Α) με ανοιχτή τη λάμπα φθορισμού και Β) με κλειστή τη λάμπα φθορισμού.....	168



Εικόνα 4.32. Πρόγραμμα PCR σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων του $\alpha$ ABCG1, $\beta$ TNF $\alpha$ και $\alpha$ GAPDH στα κύτταρα RAW264.7. ....	170
Εικόνα 4.33. Επίδραση της διαδικασίας παρεμπόδισης του ABCG1 (ABCG1 RNAi) στα επίπεδα του mRNA του ABCG1 και του TNF $\alpha$ σε κύτταρα RAW 264.7.....	171

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Ιδιότητες και σύσταση των κυριότερων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος...21	
Πίνακας 4.1. Συγκεντρώσεις των λιπιδίων και των απολιποπρωτεϊνών του ορού ατόμων με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL και ατόμων αναφοράς των οικογενειών των ασθενών.....	116
Πίνακας 4.2. Η αλληλουχία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και το μήκος των τμημάτων επί των γονιδίων που περικλείουν ανά ζεύγη.....	158
Πίνακας 4.3. Η ποσότητα cDNA και η συγκέντρωση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια στόχους και τη GAPDH των κυττάρων HEK293.....	159
Πίνακας 4.4. Η αλληλουχία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και το μήκος των τμημάτων επί των γονιδίων που περικλείουν ανά ζεύγη.....	169
Πίνακας 4.5. Η ποσότητα cDNA και η συγκέντρωση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια στόχους και τη GAPDH των κυττάρων RAW 264.7.....	170
Πίνακας 5.1. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην HDL σε φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια της apoA-I, ABCA1 και LCAT και αφορούν τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και την κατανομή των υποπληθυσμών της.....	177
Πίνακας 6.1. Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	190
Πίνακας 6.2. Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	193

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2009-2013 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 μου έδωσε την ευκαιρία να συνεχίσω την έρευνα στο εργαστήριο της στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» που είχα ξεκινήσει κατά την διάρκεια της διατριβής μου για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία. Την ευχαριστώ για την ανέναη καθοδήγηση, υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Η συμβολή της ήταν πραγματικά σημαντική για μένα στην εμβάθυνση στον τομέα της αθηροσκλήρωσης και στην τελική διαμόρφωση αυτής της διατριβής. Μου έδωσε την δυνατότητα να παρουσιάσω τα αποτελέσματα μας σε πανελλήνια και διεθνή συνέδρια και workshops, κάτι το οποίο μου έδωσε μεγάλη χαρά και ευχαρίστηση.

Είμαι επίσης ευγνώμων στην Αν. Καθ. Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, γιατί δέχτηκε να επιβλέψει τη διδακτορική μου διατριβή. Την ευχαριστώ, γιατί ήταν ιδιαίτερα συνεργάσιμη καθ' όλη την διάρκεια αυτής της διατριβής, ήταν πάντα πρόθυμη στον έλεγχο της προόδου και της ολοκλήρωσης της διατριβής και συνέβαλλε με τις χρήσιμες συμβουλές της στην βελτίωση της παρούσας εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής γιατί με τις διορθώσεις και τις παρατηρήσεις τους συνέβαλλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τον Dr. Jan Albert Kuivenhoven, Ερευνητή στο Τμήμα Αγγειακής Ιατρικής, του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ μέχρι πρόσφατα και Καθηγητή πλέον στο Κέντρο Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Γκρόνινγκεν, Τμήμα Παθολογίας και Ιατρικής Βιολογίας, της Ολλανδίας,, για την συλλογή και αποστολή των δειγμάτων από ασθενείς με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL που χρησιμοποιήσαμε για το μελέτη αλλαγών στις αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε και που οδήγησε στην δημοσίευση δυο εργασιών. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ulf Landmesser, από το Καρδιαγγειακό Κέντρο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της

Ζυρίχης στην Ελβετία για την συλλογή και αποστολή δειγμάτων από ασθενείς με στεφανιαία νόσο, δίνοντας μας την ευκαιρία να συμμετάσχουμε σε μια εκτενή εργασία κατανόησης των μηχανισμών διαταραχής των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL από ασθενείς με στεφανιαία νόσο, η οποία επίσης δημοσιεύτηκε.

Ήταν πολύ εποικοδομητική επίσης και η δίμηνη παραμονή μου στο εργαστήριο του Καθηγητή Arnold von Eckardstein, στο Ινστιτούτο Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης στην Ελβετία. Ήταν πολύ ενδιαφέρουσα εμπειρία και χαίρομαι πολύ που μπόρεσα εκεί να μάθω νέες τεχνικές και να συνεργαστώ με άτομα από πολλά διαφορετικά μέρη του κόσμου που εργάζονται πάνω στον τομέα της αθηροσκλήρωσης. Θα ήθελα για αυτό το λόγο να ευχαριστήσω τον Καθ. Arnold von Eckardstein που με δέχτηκε στο εργαστήριο του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα και τον Δρ. Ευστράτιο Στρατίκο για τις χρήσιμες συμβουλές του όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι της διατριβής μου, αλλά και για την πορεία μου στον χώρο της έρευνας που θέλω να συνεχίσω. Φυσικά, δεν θα πρέπει να παραλείψω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, Δρ. Ιωάννη Δάφνη, Λέττα Αργύρη, Χριστίνα Γκολφινόπουλου και Alexia Aurora Pauline Phedonos. Η συμβολή τους ήταν ανεκτίμητη εντός και εκτός εργαστηρίου. Κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα ευχάριστο και εποικοδομητικό εργασιακό κλίμα, ιδανικό για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν, ανταλλάσαμε άμεσα απόψεις και συνεργαστήκαμε 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.

Η διατριβή αυτή δεν θα είχε ποτέ πραγματοποιηθεί χωρίς την οικονομική ενίσχυση από το πρόγραμμα υποτροφιών προς μεταπτυχιακούς υποψήφιους διδάκτορες του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Λιποπρωτεΐνες

Η μεταφορά ελεύθερης χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και άλλων λιπιδίων μέσω της κυκλοφορίας επιτυγχάνεται με το πακετάρισμά τους σε μακρομοριακά, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα, τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι είτε σφαιρικά είτε δισκοειδή σωματίδια. Τα σφαιρικά σωματίδια έχουν πυρήνα από ουδέτερα μή πολικά λιπίδια που αποτελείται από εστέρες χοληστερόλης (CE: Cholesterol Esters,) και τριγλυκερίδια (TG: TriGlycerides), και περιβάλλεται από σχετικά πολικά μόρια όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες, που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες [1]. Τα δισκοειδή σωματίδια αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες και σχηματίζουν διπλοστοιβάδες (bilayer) [1,2].

Οι λιποπρωτεΐνες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες βασιζόμενες στην επίπλευση τους κατά την υπερφυγοκέντρωση που εξαρτάται από την πυκνότητα τους. Οι κατηγορίες 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**) [3]. Οι λιποπρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω βάσει του μεγέθους των σωματιδίων, την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα ή την χρωματογραφία συγγένειας. Οι διάφορες κατηγορίες έχουν και διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες [4].

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 εξωκυτταρικά [5-7]. Στην συνέχεια θα γίνει αναφορά μόνο στο μονοπάτι της HDL.

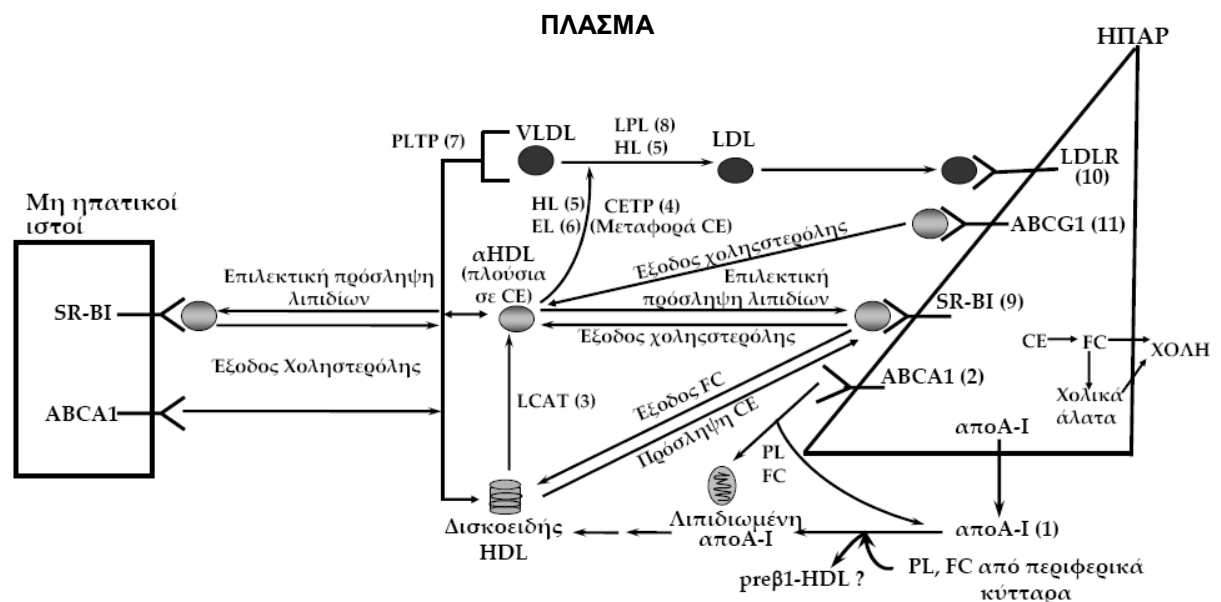
Πίνακας 1.1. Ιδιότητες και σύσταση των κυριότερων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος [3].

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 (%ατόμων αναφοράς)	80-95	45-65	4-8	2-7
Φωσφολιπίδια (%ατόμων αναφοράς)	3-6	15-20	18-24	26-32
Ελεύθερη Χοληστερόλη (%ατόμων αναφοράς)	1-3	4-8	6-8	3-5
Εστεροποιημένη Χοληστερόλη (%ατόμων αναφοράς)	2-4	16-22	45-50	15-20
Πρωτεΐνες (%ατόμων αναφοράς)	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

## 1.2 Το μονοπάτι βιογένεσης και καταβολισμού της HDL

Η HDL συντίθεται και καταβολίζεται μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού (ανασκόπηση στο [5]). Στα αρχικά βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL (**Εικόνα 1.1**), η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I), η οποία είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL, εκκρίνεται κυρίως ελεύθερη λιπιδίων από το ήπαρ και δεσμεύει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη μέσω της αλληλεπίδρασης με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1). Στη συνέχεια, μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων βημάτων τα οποία δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί, η αποA-I λιπιδιώνεται περαιτέρω σταδιακά και μετατρέπεται σε δισκοειδές σωματίδιο. Η αποA-I στα δισκοειδή σωματίδια ενεργοποιεί το ένζυμο ακυλο-τρανσφεράση της λεκιθίνης:χοληστερόλης (LCAT: Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase) οδηγώντας στην μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων της HDL σε σφαιρικά. Στη συνέχεια, η HDL αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) και αυτή η αλληλεπίδραση επάγει την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων από το κύτταρο, καθώς και μεταφορά δυο

κατευθύνσεων μη εστεροποιημένης χοληστερόλης. Η χοληστερόλη του κυττάρου μπορεί επίσης να εξαχθεί από το κύτταρο προς την HDL μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 (ATP-Binding Cassette Transporter G1). Τελικά, υδρόλυση των λιπιδίων της HDL πραγματοποιείται από διάφορες λιπάσες (λιποπρωτεϊνική λιπάση, ηπατική λιπάση και ενδοθηλιακή λιπάση) και ανταλλαγή των λιπιδίων από την πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων PLTP (PhosphoLipid Transfer Protein) και από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) [5]. Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες που επηρεάζουν την βιογένεση, ανασύσταση και καταβολισμό της HDL, προσδιορίζουν την συγκέντρωση της στο πλάσμα, την σύσταση, το σχήμα και το μέγεθος της.



**Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού της HDL.** Οι αριθμοί 1 ως 11 αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες-κλειδιά της μεμβράνης ή του πλάσματος οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα ή την σύνθεση της HDL. (1) Η απολιποπρωτεΐνη A-I, (2) ο μεταφορέας χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων ABCA1, (3) το ένζυμο εστεροποίησης χοληστερόλης LCAT, (4) η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP, (5) η ηπατική λιπάση, (6) η ενδοθηλιακή λιπάση, (7) η πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων PLTP, (8) η λιποπρωτεϊνική λιπάση, (9) ο υποδοχέας SR-BI, (10) ο υποδοχέας της LDL και (11) ο μεταφορέας χοληστερόλης ABCG1. (Όπου PL:φωσφολιπίδια, FC: ελεύθερη χοληστερόλη, CE: εστέρες χοληστερόλης.).

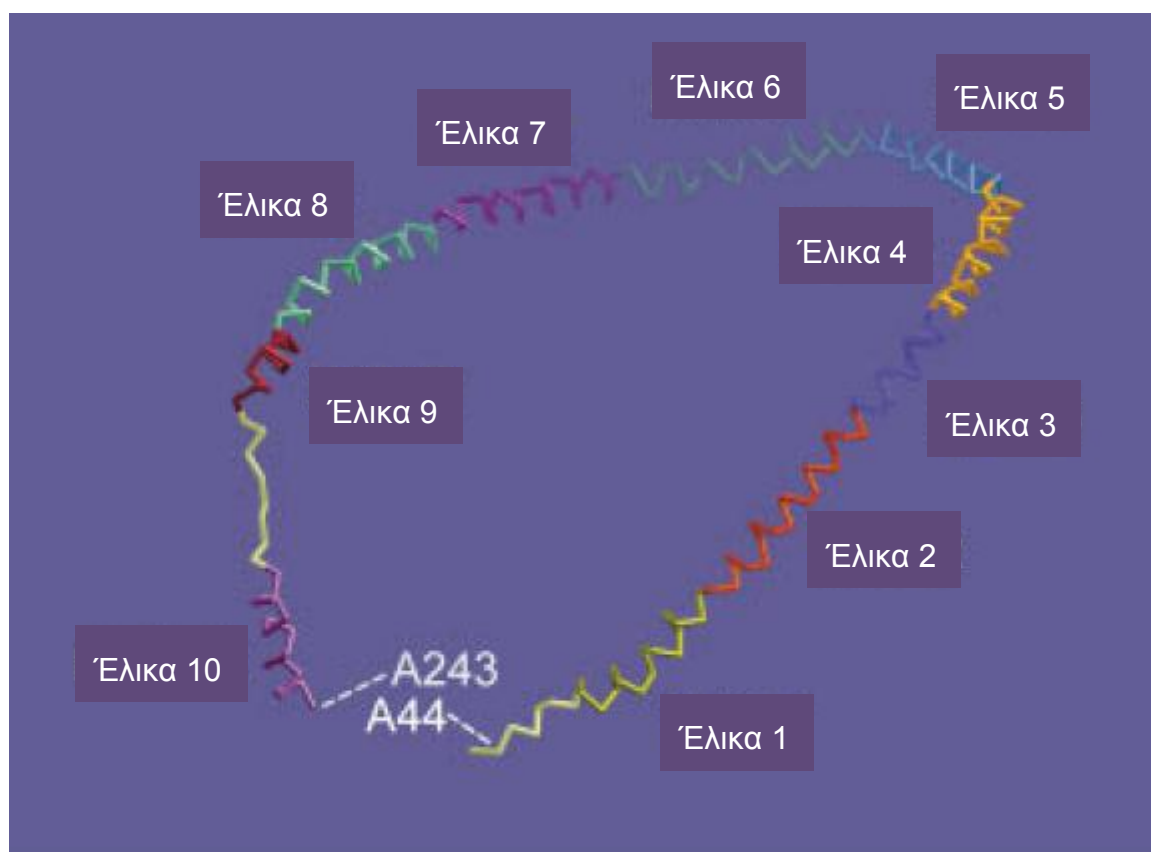
### 1.3 Απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I)

#### 1.3.1 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I

Το γονίδιο της ανθρώπινης αποA-I έχει μέγεθος 1863 ζευγών βάσεων (bp: base pairs) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια [8]. Η αποA-I εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ

και λιγότερο στο λεπτό έντερο ως μια προ-προ-πρωτεΐνη 267 αμινοξέων. Έπειτα από ενδομεμβρανικό κόψιμο του πεπτιδίου σήματος 18 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο, η προ-αποΑ-I εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου μια πρωτεάση πέπτει το προπεπτίδιο 6 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η ώριμη αποΑ-I είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 243 αμινοξέων, με μοριακή μάζα 28 kDa [9]. Η αποΑ-I είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL [5]. Η αποΑ-I αποτελείται από επαναλήψεις 22- και 11-αμινοξέων που με βάση την ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ οργανώνονται σε αμφιπαθείς α-έλικες [10,11]. Η αποΑ-I παίζει απαραίτητο ρόλο στη βιογένεση, δομή, λειτουργία και στην συγκέντρωση της HDL του πλάσματος [5].

Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της αποΑ-I στο αμινο-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(1-43)], έδειξε ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 44-243 (εξόνιο 4) της αποΑ-I εκτός της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 220 και 227, αποτελείται από μια σχεδόν συνεχή αμφιπαθή α-έλικα. Αυτή η δομή επιτρέπει την διαμόρφωση του μορίου σε σχήμα πετάλου με διαστάσεις 125x80x40 Å [10,12] (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της αποΑ-I στο αμινο-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(1-43)] [10].

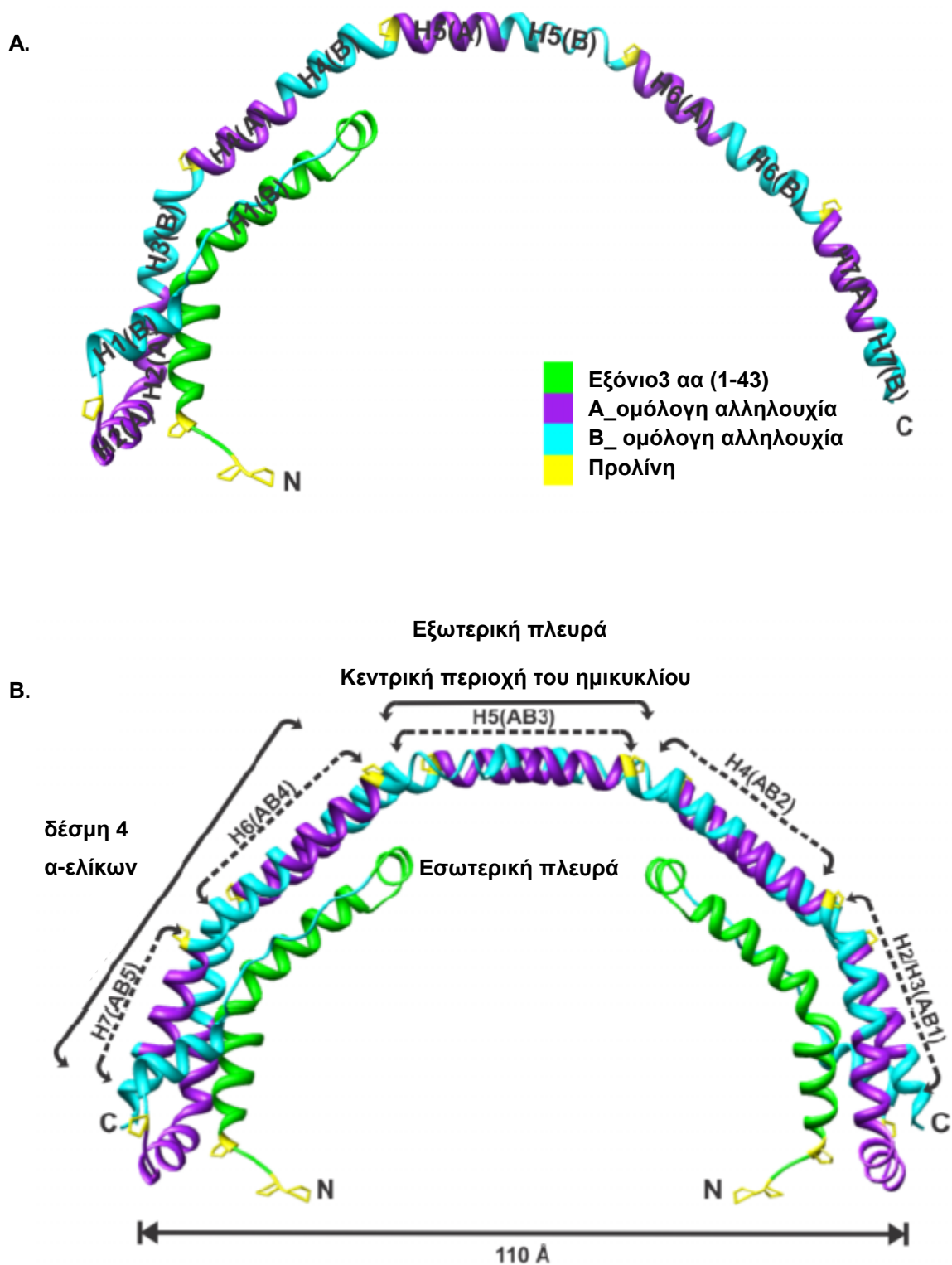
Επίσης, η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της αποΑ-I στο καρβοξυ-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(185-243)], σχηματίζει ημικύκλιο (**Εικόνα 1.3A**). Κάθε μονομερές αλληλεπιδρά με ένα συμμετρικό μόριο και σχηματίζει ένα ομοδιμερές (**Εικόνα 1.3B**). Το διμερές έχει μια σχετικά ημικυκλική αρχιτεκτονική με ύψος ~17Å και διάμετρο ~110Å. Ο σκελετός του διμερούς αποτελείται από δυο ευέλικτες μακριές αντιπαράλληλες έλικες αποτελούμενες από επαναλήψεις αλληλουχιών σε σειρά που χωρίζονται μεταξύ τους με προλίνες. Το αμινο-τελικό άκρο κάθε μονομερούς σχηματίζει μια δέσμη 4 α-ελίκων με το καρβοξυ-τελικό άκρο του συμμετρικού μονομερούς [11]. Στην **Εικόνα 1.4** παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγής δομής της αποΑ-I του ανθρώπου ύστερα από τις πληροφορίες που αντλήθηκαν από τις κρυσταλλικές δομές των ελλειματικών μορφών της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό της άκρο (αποΑ-I[Δ(1-43)] και αποΑ-I[Δ(185-243)]) αντίστοιχα.

### 1.3.2 Η δομή της λιπιδιωμένης αποΑ-I

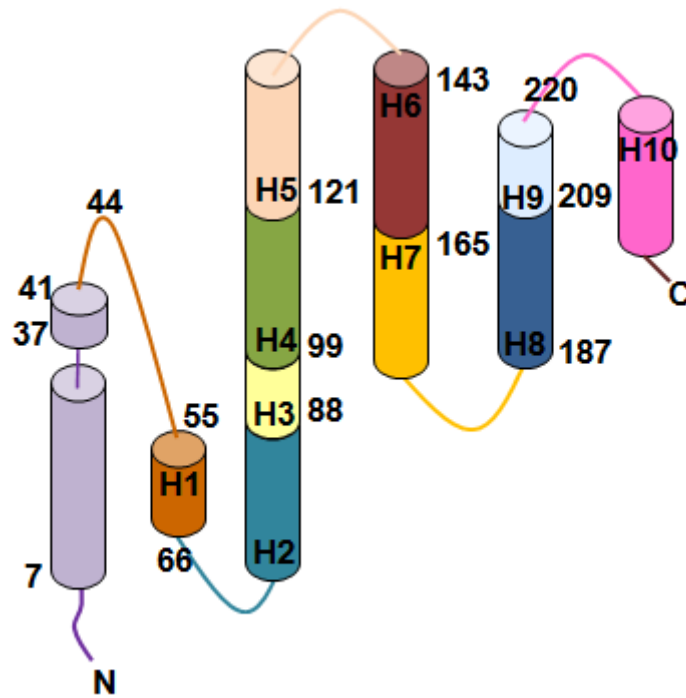
Η αποΑ-I εκκρίνεται από το ήπαρ και το έντερο φτωχή σε λιπίδια. Με βάση τη δομή της αποΑ-I και φυσικοχημικές μελέτες, έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την οργάνωση των λιπιδίων και της αποΑ-I σε δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια. Το μοντέλο “ricket fence” αποτελείται από μια σειρά αμφιπαθών α-ελίκων μήκους 22 αμινοξέων, χωρισμένων με ανάστροφες στροφές από κατάλοιπα προλίνης. Στο μοντέλο αυτό οι αμφιπαθείς έλικες στοιχίζονται παράλληλα με τις ακυλικές λιπαρές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων σε δίσκο διπλής στοιβάδας [13,14] (**Εικόνα 1.5**).

Το 1999 ο Segrest και οι συνεργάτες του παρουσίασαν το μοντέλο “double belt”, όπου δύο μόρια αποΑ-I τυλίγονται με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μια δισκοειδή διπλοστοιβάδα που αποτελείται από 160 μόρια λιπιδίων (**Εικόνα 1.6A**). Έχει προταθεί ότι ο προσανατολισμός των δύο μορίων είναι τέτοιος που να μεγιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις δεσμών άλατος (salt bridges) μέσα στο κάθε μόριο (**Εικόνα 1.6B**). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι αμφιπαθείς α-έλικες έχουν κατά μέσο όρο 3.67 αμινοξικά κατάλοιπα (residues) ανά στροφή έλικας με την υδρόφοβη επιφάνεια να «βλέπει» εσωτερικά προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μια τέτοια έλικα, ονομάζεται «11/3» και κάνει 3 πλήρεις στροφές κάθε 11 αμινοξέα. Έχει προταθεί ότι ο μετασχηματισμός των δισκοειδών σωματιδίων σε σφαιρική HDL, που γίνεται μέσω της δράσης της LCAT, περιλαμβάνει την μετατροπή της 11/3 έλικας σε πραγματική α-έλικα με 3.6 αμινοξικά κατάλοιπα ανά στροφή [15].

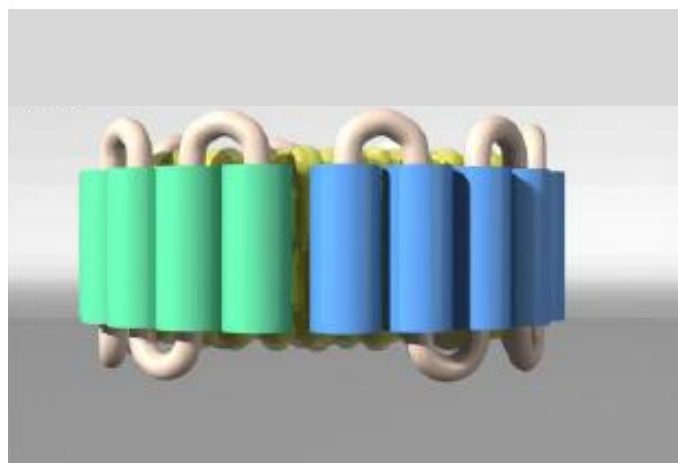




Εικόνα 1.3. Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειματικής μορφής της apoA-I στο καρβοξυ-τελικό της άκρο apoA-I[Δ(185-243)]. Α) Ένα μονομερές Β) Ένα μονομερές αλληλεπιδρά με ένα σχετικά συμμετρικό μόριο και να σχηματίσει ένα ομοδιμερές. Κάθε μονομερές αποτελείται από 5 AB επαναλήψεις. Το αμινο-τελικό άκρο κάθε μονομερούς σχηματίζει μια δέσμη 4 α-ελίκων με το καρβοξυ-τελικό άκρο του συμμετρικού μονομερούς [11].

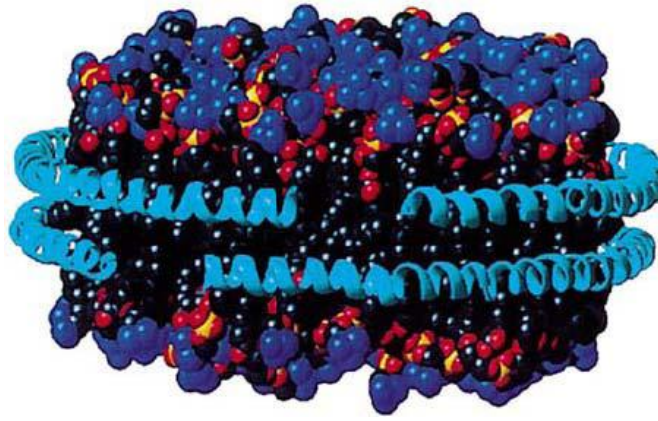


Εικόνα 1.4. Η δευτεροταγής δομή της apoA-I του ανθρώπου βασισμένη σε κρυσταλλογραφία ακτίνων X διαφορετικών ελλειματικών μορφών της apoA-I (ανασκόπηση στο [16]).

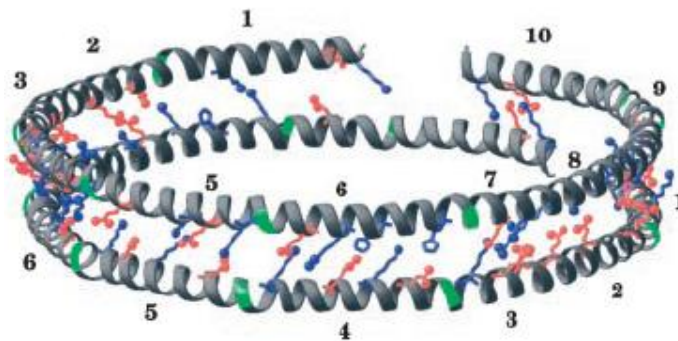


Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου “picket fence” της δισκοειδούς HDL. Η HDL αποτελείται από δυο μόρια apoA-I (το ένα με μπλε και το άλλο με πράσινο), τα οποία περιβάλλουν την διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων (με κίτρινο) [17].

A.



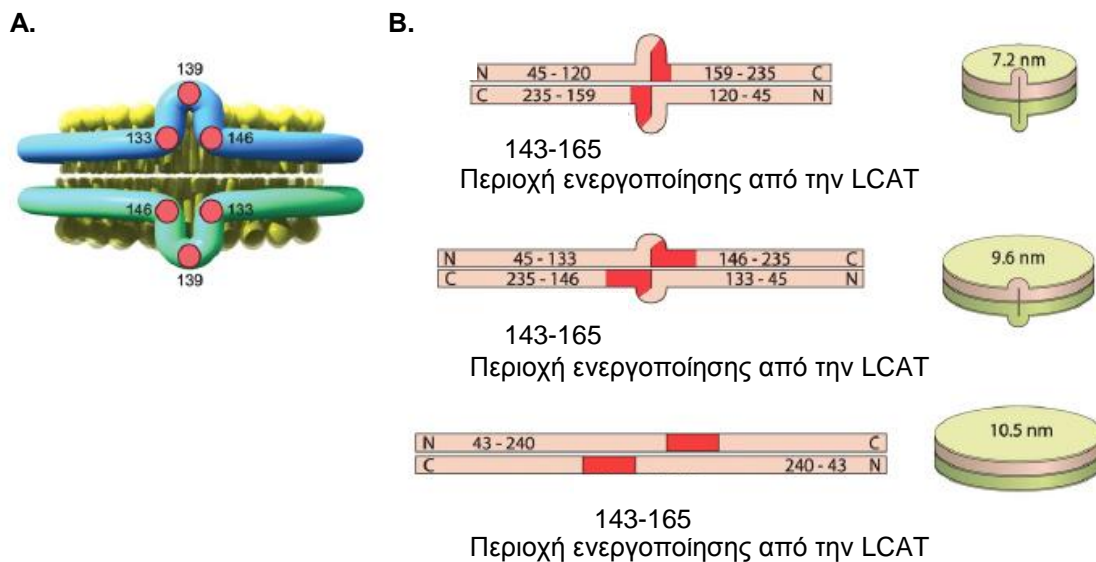
B.



**Εικόνα 1.6.** Το μοντέλο «double belt» της δισκοειδούς HDL. A. Δύο μόρια apoA-I- $\Delta(1-43)$  (έλικες σε γαλάζιο χρώμα) σε αντιπαράλληλη διάταξη γύρω από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων διαμέτρου 85Å, B. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών άλατος (salt bridges) που θεωρείται ότι σχηματίζονται μεταξύ των δύο μορίων apoA-I- $\Delta(1-43)$  [15].

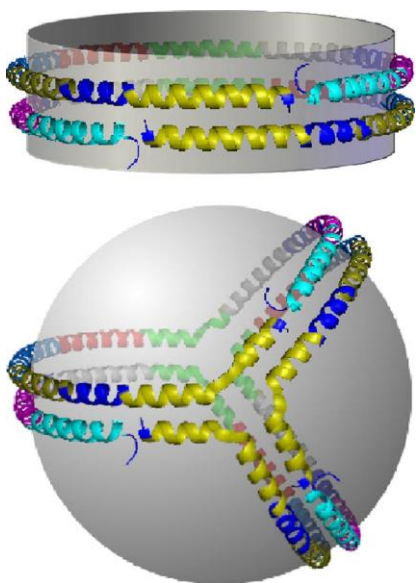
Το 2006 ο Martin και οι συνεργάτες του πρότειναν το μοντέλο “looped belt”, στο οποίο τα αμινοξέα 133-146 σχηματίζουν μια ευλύγιστη θηλιά που προσδίδει στην apoA-I την ικανότητα να προσαρμόζει την δομή της ώστε να εξυπηρετεί την μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα των σωματιδίων σε λιπίδια. Στο μοντέλο αυτό το ένα μόριο apoA-I ευθυγραμμίζεται με το άλλο σε δομή έλικα 5- έλικα 5 (helix 5- helix 5 registry) που φέρει την έλικα 5 του ενός μορίου apoA-I απέναντι από την έλικα 5 του άλλου μορίου apoA-I [17] (**Εικόνα 1.7**).

Μέχρι το 2008 υπήρχαν λίγες πληροφορίες για την δομή της apoA-I στην σφαιρική HDL συγκριτικά με την δισκοειδή. Ο Silva και οι συνεργάτες του το 2008 παρήγαγαν σφαιρικές HDL διαφορετικού μεγέθους από δισκοειδείς και σύγκριναν τις δομές της apoA-I στα σφαιρικά και τα δισκοειδή σωματίδια. Χρησιμοποιώντας μεθόδους διασύνδεσης (cross-linking) και φασματομετρίας μάζας, βρήκαν ότι η οργάνωση της δομής της apoA-I και στα δυο είδη σωματιδίων ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από το μέγεθος των σωματιδίων και του γεγονότος ότι στα σφαιρικά σωματίδια 93 Å υπήρχαν



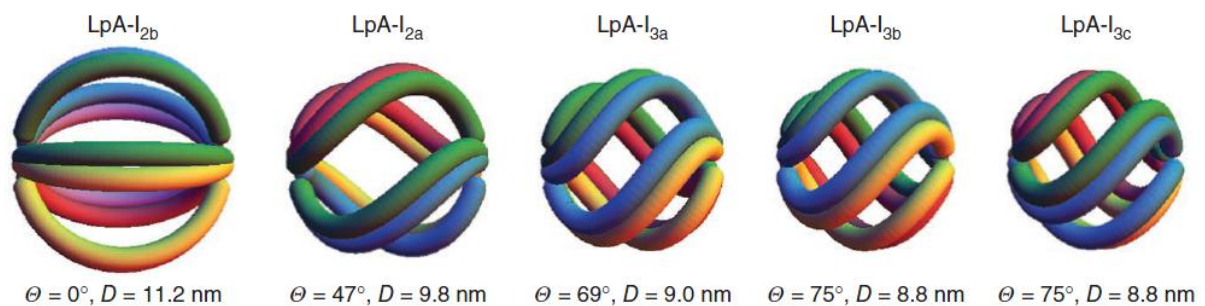
**Εικόνα 1.7. Το μοντέλο “Looped belt” της apoA-I σε δισκοειδή rHDL.** A, αποτελείται από μόρια της apoA-I σε αντιπαράλληλη διάταξη με μια κεντρική θηλιά στην θέση 139 με όρια τα κατάλοιπα 133 και 146. B, το μοντέλο αυτό προβλέπει ότι η κεντρική θηλιά είναι διαφορετικού μήκους σε rHDL διαφορετικών διαμέτρων (7.2, 9.6, και 10.5 nm), με την θηλιά να είναι μεγαλύτερη (στο δίσκο 7.2-nm) ή ανύπαρκτη (στο δίσκο 10.5-nm) σε σχέση με το δίσκο των 9.6-nm. Τα αμινοξέα που θεωρούνται σημαντικά για την ενεργοποίηση της LCAT (αμινοξέα 143-165) αντιπροσωπεύονται από την κόκκινη περιοχή [17].

3 μόρια apoA-I αντί για 2 που υπήρχαν στα δισκοειδή (**Εικόνα 1.8**) [18]. Παρόμοια αποτελέσματα εξήχθησαν και σε HDL σωματίδια που απομονώθηκαν από ανθρώπινο ορό.



**Εικόνα 1.8. Σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των μορίων της apoA-I σε ένα δισκοειδές σωματίδιο “double belt” και σε ένα σφαιρικό σωματίδιο.** Κάθε α-έλικα έχει και διαφορετικό χρώμα [18].

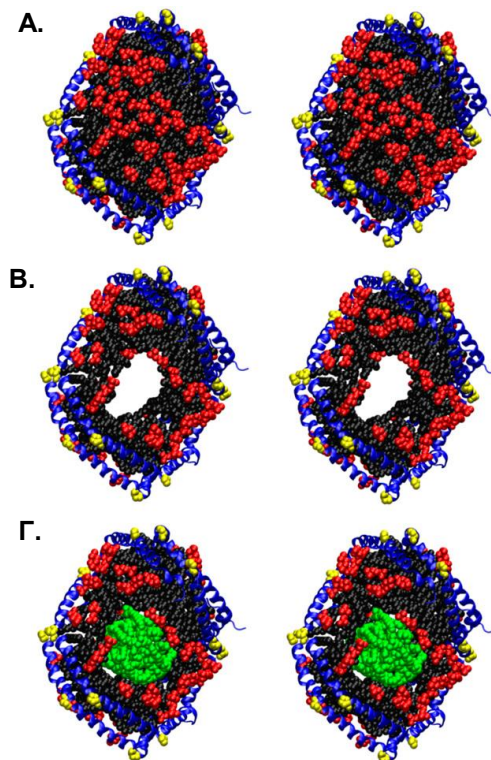
Ο Huang και οι συνεργάτες του 2011 διαχώρισαν HDL ανθρώπου σε πέντε διαφορετικές πυκνότητες υποπληθυσμών (ενότητα 1.9.2) και στην συνέχεια απομόνωσαν αυτές που περιείχαν την apoA-I (LpA-I) [19]. Χρησιμοποιώντας μεθόδους χημικής διασύνδεσης (cross-linking) και φασματομετρίας μάζας, βρήκαν ότι η apoA-I 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 apoA-I υιοθετεί συμμετρική δομή που ομοιάζει με κλουβί. Τα μοντέλα υποδεικνύουν ότι το μέγεθος της HDL διαμορφώνεται με περιστροφική κίνηση των είδη υπαρχόντων μορίων της apoA-I (**Εικόνα 1.9**). Αυτή η κατανόηση προσφέρει βαθιά γνώση για το πως η δομή της apoA-I διαμορφώνει την λειτουργία της HDL και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες απολιποπρωτεΐνες.



**Εικόνα 1.9. Μοριακή περιστροφή απαιτείται να επιτύχει η apoA-I της HDL που περιέχει apoA-I (LpA-I) για να διαμορφώσει το μέγεθος της.** Οι α-έλικες της apoA-I αναπαρίστανται ως εκτεταμένοι σωλήνες κατά μήκος της επιφάνειας της HDL, όπου κάθε μόριο apoA-I έχει διαφορετικό χρώμα. Η LpA-I<sub>2b</sub> αποτελείται από 5 μόρια apoA-I και εκτείνονται στο μέγιστο βαθμό. Τα μικρότερα σωματίδια περιέχουν τέσσερα μόρια apoA-I και κάθε μόριο έχει περιστραφεί με γωνία  $\theta$  [19].

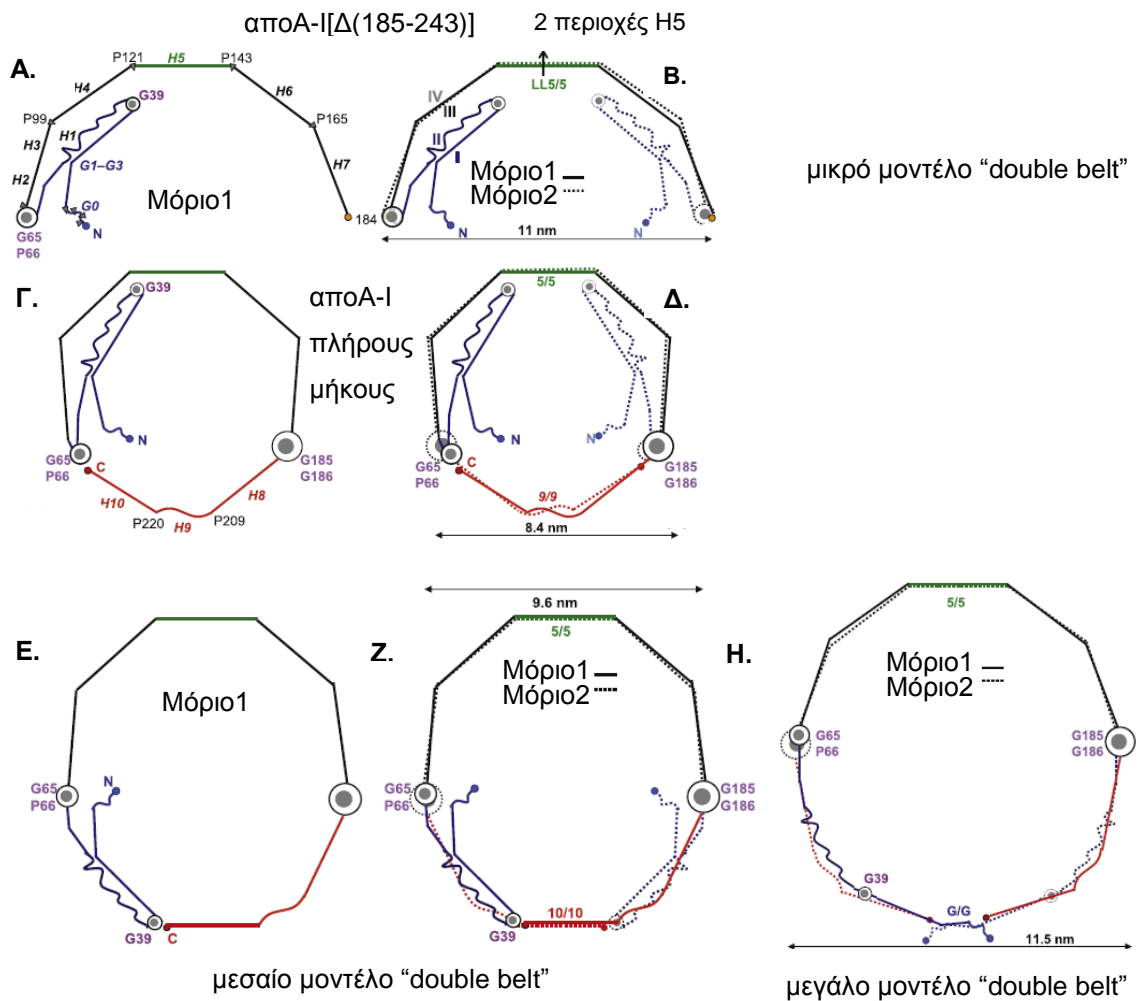
Ο Catte και οι συνεργάτες του το 2008 πρότειναν ότι η αλληλεπίδραση των δακτυλιοειδών μορίων ελαϊκών εστέρων χοληστερόλης (CO: cholesteryl esters) συνεισφέρει στην ακαμψία της apoA-I σταθεροποιώντας και ρυθμίζοντας την δομή και τη λειτουργία των μοντέλων σφαιροειδών ms-HDL σωματιδίων (model spheroidal HDL particles). Χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις ατομικών και μοριακών δυναμικών βρήκαν ότι τα ms-HDL σωματίδια σχηματίζουν επιμήκεις ελλειψοειδείς δομές με τα μόρια POPC (palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-cholines) και τα μόρια της apoA-I να περιβάλλουν τον υδρόφοβο πυρήνα των μορίων ελαϊκών εστέρων χοληστερόλης [20] (**Εικόνα 1.10**).





**Εικόνα 1.10. Αναγέννηση του μοντέλου σφαιροειδών HDL σωματιδίων.** Α) Ένα δισκοειδές σωματίδιο “double belt” με αναλογίες αποΑ-I[Δ(1-40)] και POPC 2:80, στο οποίο Β) απομακρύνονται 24 POPC και η μοριακή αναλογία αποΑ-I[Δ(1-40)] και POPC γίνεται 2:56 και Γ) ύστερα από προσθήκη 16 CO (μοριακή αναλογία POPC: CO; αποΑ-I 56:16:2). ΑποΑ-I: μπλε, POPC: μαύρες οι ακυλικές αλυσίδες και κόκκινες οι πολικές κεφαλές. CO: πράσινο, Προλίνη κίτρινο CO: cholesteryl esters, POPC palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-cholines [20].

Τελευταία, φαίνεται να υπερισχύει το μοντέλο του “double belt”. Μάλιστα έχει προταθεί ένας μοριακός μηχανισμός για την διαμόρφωση της αποΑ-I πλήρους μήκους καθώς προσλαμβάνει χοληστερόλη [16]. Η διαμόρφωση της αποΑ-I σε μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους HDL σωματιδίων που έχει προταθεί είναι βασισμένη στην αλληλουχία επαναλήψεων α-ελίκων και της κρυσταλλικής δομής της αποΑ-I[Δ(185-243)] και επιβεβαιώνονται από εκτεταμένα δεδομένα βιοφυσικής που έχουν δημοσιευτεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Στον μηχανισμό αυτό, η κεντρική αλληλουχία της αποΑ-I 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) αναδιαμορφώνονται καθώς το σωματίδιο της HDL μεγαλώνει (**Εικόνα 1.11**). Στο αμινο-τελικό άκρο της αποΑ-I υπάρχουν 2 εύκαμπτες περιοχές (65-39, 39-1), όπου περιστρέφονται γύρω από τον άξονα τους (G65-P66 και G39), προκειμένου η αποΑ-I να «αγκαλιάζει» συνέχεια τον πυρήνα λιπιδίων, καθώς μεγαλώνει το σωματίδιο της HDL.



**Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της apoA-I πλήρους μήκους στο μοντέλο "double belt" (Γ-Δ) βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της apoA-I(Δ185-243) [16] (A-B), Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της apoA-I(Δ185-243) ενός μονομερούς (A) και ενός κρυσταλλογραφικού διμερούς δυο αντιπαράλληλων μοριών apoA-I, έχοντας ως άξονα συμμετρίας το μέσον της έλικας 5. Οι ευθείες γραμμές αντιπροσωπεύουν τμήματα α-ελίκων, ενώ οι κυματιστές γραμμές όχι, όπως παρατηρήθηκαν στις κρυσταλλικές δομές των ελλειματικών μορφών της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό της άκρο (apoA-I[Δ(1-43)], apoA-I[Δ(185-243)]). G0–G3 (αμινοξέα 1–43), H1–H7 (αμινοξέα 44–184), P (προλίνη), G (γλυκίνη). Στο B, παρουσιάζονται οι περιοχές I–IV που σχηματίζουν την δέσμη 4 α-ελίκων. Προτεινόμενη διαμόρφωση της πλήρους μήκους apoA-I (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 (Z) διμερούς, (H) σε ένα μεγάλο μοντέλο "double belt" διαμέτρου 11,5 nm διμερούς. Μπλε: αμινο-τελική μεταβλητή περιοχή (G και H1), Μαύρο: σταθερή περιοχή (H2–H7) εκτός από τις κεντρικές επαναλήψεις, Πράσινο: περιοχή H5, Κόκκινο: καρβοξυ-τελική περιοχή (H8–H10), η οποία είναι απών από την apoA-I[Δ(185–243)]**

Επίσης στην συγκεκριμένη εργασία προτείνεται και πως αλλάζει και η διαμόρφωση της αποΑ-I, καθώς το δισκοειδές σωματίδιο της HDL μετατρέπεται σε σφαιρικό. Ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι ο ίδιος, με την διαφορά ότι στα σφαιρικά σωματίδια αυξάνεται ο αριθμός της αποΑ-I και ότι ενώ στα δισκοειδή σωματίδια δεν υπάρχει κλίση ανάμεσα στην σταθερή και μεταβλητή περιοχή της ίδιας αποΑ-I, στα σφαιρικά υπάρχει και εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων της αποΑ-I (**Εικόνα 1.12**).

## **1.4 Ο Μεταφορέας ABCA1**

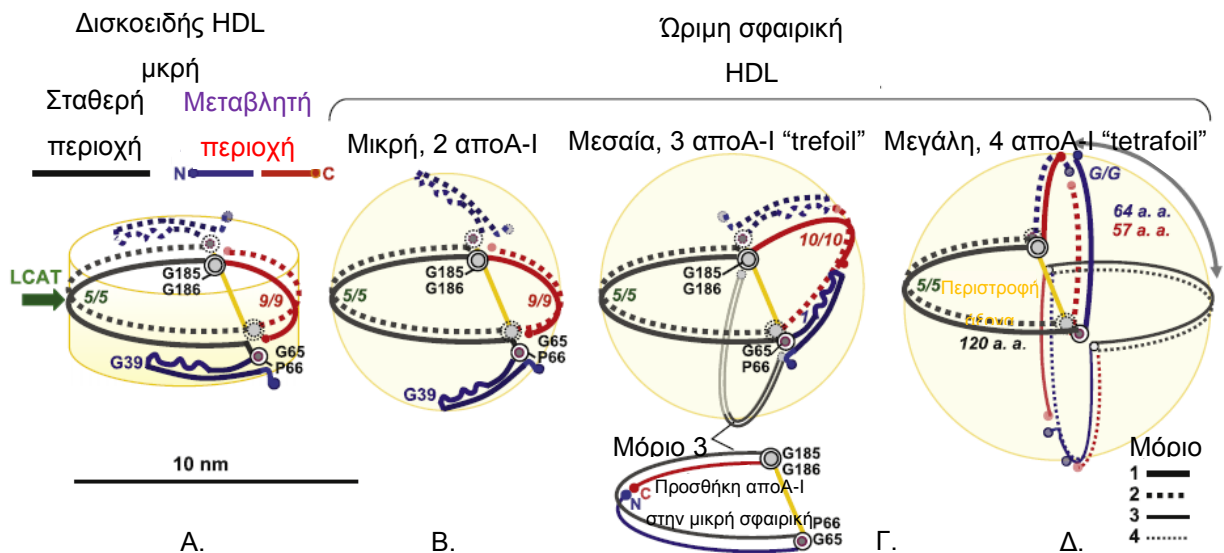
### **1.4.1 Η δομή του ABCA1**

Ο ABCA1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 2261 αμινοξέων που αποτελείται από δυο όμοια ήμισυ δομικών περιοχών [21] (**Εικόνα 1.13**). Κάθε ήμισυ έχει μια διαμεμβρανική περιοχή που απαρτίζεται από 6 α-έλικες και μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD: Nucleotide Binding Domain) μήκους 180 αμινοξέων, η οποία περιέχει α) 2 συντηρημένα πεπτιδικά μοτίβα γνωστά ως «Περιπατητής A» (Walker A, P-loop, 12 αμινοξέα) και «Περιπατητής B» (Walker B, 5 αμινοξέα), τα οποία είναι παρόντα σε όλους του ABC μεταφορείς και πολλές άλλες πρωτεΐνες που δεσμεύουν ATP, καθώς και β) έναν Περιπατητή C ή υπογραφή-μοτίβο (Walker C ή S, 5 αμινοξέα) που είναι μοναδικός σε κάθε ABC μεταφορέα [22]. Ο ABCA1 έχει την αμινο-τελική περιοχή του στην πλευρά του κυτταροπλάσματος και περιέχει 2 μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους που είναι ισχυρά γλυκοζυλιωμένοι και συνδέονται μέσω ενός ή περισσότερων δισουλφιδικών δεσμών [21,23].

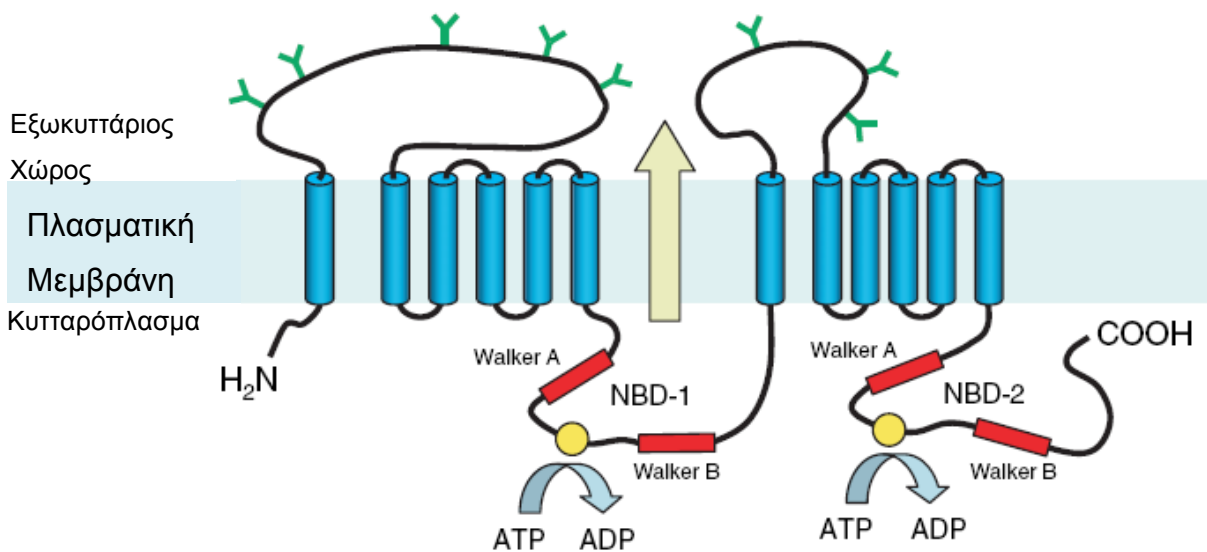
### **1.4.2 ABCA1 & εκροή χοληστερόλης**

Ο ABCA1 επάγει την μεταφορά χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης από το κύτταρο στην ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I ή στην φτωχή λιπιδίων HDL [24]. Είναι πιθανόν ο ABCA1 να σχηματίζει ένα κανάλι στην κυτταρική μεμβράνη όπου προωθεί την μετατόπιση “flipping” των λιπιδίων από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μέσω μιας εξαρτώμενης από δράση ATPάσης διαδικασίας [24]. Αν και υπάρχουν αντιφατικά στοιχεία, ωστόσο τα περισσότερα έως τώρα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη πως ο ABCA1 ταυτοχρόνως μεταφέρει χοληστερόλη και φωσφολιπίδια στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, έτσι ώστε να παραχθούν λιπιδικές περιοχές που είναι επιδεκτικές για διαλυτοποίηση από απολιποπρωτεΐνες.





**Εικόνα 1.12.** Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της apoA-I πλήρους μήκους σε δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια (μετά την δράση του ενζύμου LCAT), καθώς αυτά μεγαλώνουν σε μέγεθος με την πρόσληψη χοληστερόλης στο μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. P (προλίνη), G (γλυκίνη) [16].



**Εικόνα 1.13.** Σχηματική παράσταση 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 προσδέεται το ATP που απαιτείται για την λειτουργία του μεταφορέα, ενώ τέλος περιέχει και δυο μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους που είναι ισχυρά γλυκοζυλιωμένοι [25].

Ο ABCA1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα [26-28], όπου και δυνητικά μπορεί να διευκολύνει την μεταφορά των λιπιδίων είτε στην κυτταρική επιφάνεια είτε εσωτερικεύοντας απολιποπρωτεΐνες.

Ο ABCA1 εμφανίζεται να στοχεύει συγκεκριμένες μεμβρανικές δομές για έκκριση λιπιδίων. Αυτές πιθανόν να είναι περιοχές που γίνεται συσσώρευση χοληστερόλης και δρα το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης, ακυλο-συνένζυμο A:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση (ACAT: acyl-coenzyme A (acyl-coA):cholesterol acyltransferase [29,30]). Επειδή ο ABCA1 εξάγει μόνο ελεύθερη χοληστερόλη, οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται από ουδέτερες υδρολάσες. Έτσι, ο ABCA1 μεταφέρει χοληστερόλη που αλλιώς θα συσσωρευόταν ως εστέρας χοληστερόλης σε κυτταροπλασματικά λιπιδικά σταγονίδια.

Δυο μοντέλα έχουν προταθεί σχετικά με την ικανότητα του ABCA1 να οδηγεί σε εκροή λιπιδίων [31]. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, ο ABCA1 οδηγεί στη συσσώρευση χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές στην πλασματική μεμβράνη, και ακολούθως η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια μεταφέρονται στις απολιποπρωτεΐνες που συνδέονται στον ABCA1 της κυτταρικής επιφάνειας [32,33]. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, κυστίδια που περιέχουν ABCA1 και αποA-I μεταφέρονται προς ενδοκυτταρικές αποθήκες λιπιδίων, από όπου ο ABCA1 αντλεί λιπίδια στην κοιλότητα του κυστιδίου, για να απελευθερωθούν στην συνέχεια μέσω εξωκύτωσης [34,35]. Υπάρχουν στοιχεία που δέχονται την ταυτόχρονη ύπαρξη και των δυο μηχανισμών στο ίδιο κύτταρο [27].

Ο ABCA1 αλληλεπιδρά με πολλές απολιποπρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων, περιλαμβανομένων των αποA-I, -A-II, -E, -C-I, -C-II, -C-III και -A-IV [36-38]. Έγιναν πειράματα εκροής φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης σε συνθετικά πεπτιδία μήκους 18 αμινοξέων, τα οποία ήταν ανάλογα της κλάσης A αμφιπαθών α-ελίκων και βρέθηκε ότι τα διμερή τους μιμούσαν την αποA-I στην εκροή χοληστερόλης [29,37,39-42]. Οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν ότι η αμφιπαθής α-έλικα είναι το κύριο δομικό μοτίβο για την μεταφορά λιπιδίων μέσω του ABCA1.

Μελέτες έδειξαν ότι οι απολιποπρωτεΐνες συνδέονται απευθείας στον ABCA1, ακολουθούν καμπύλη κορεσμού και έχουν υψηλή συγγένεια ( $K_d < 10^{-7}$  mol/L) [37,43]. Ωστόσο έχει προταθεί και το μοντέλο έμμεσης αλληλεπίδρασης, σύμφωνα με το οποίο, η αποA-I 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-I, ακολουθεί λιπιδίωση των αμφιπαθών ελίκων της αποΑ-I [44,45].

Νεώτερες μελέτες του Phillips και των συνεργατών του προτείνουν το μοντέλο δύο θέσεων αλληλεπίδρασης της αποΑ-I, με τα κύτταρα, για την εκροή λιπιδίων [46]. Στην μελέτη αυτή, οι ερευνητές προσπάθησαν να χαρακτηρίσουν τις θέσεις πρόσδεσης της αποΑ-I στα κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι, ο μεταφορέας ABCA1 δημιουργεί δύο ξεχωριστές θέσεις αλληλεπίδρασης του κυττάρου με την αποΑ-I. Η πρώτη είναι χαμηλής απόδοσης και αφορά άμεση αλληλεπίδραση της αποΑ-I με τον ABCA1, ενώ η δεύτερη θέση είναι υψηλής απόδοσης και αφορά αλληλεπίδραση της αποΑ-I με λιπίδια οργανωμένα στην κυτταρική μεμβράνη από την δράση του ABCA1 [47].

### 1.4.3 ABCA1 & φλεγμονή

Μια σειρά από αναφορές προτείνουν ότι ο ABCA1 έχει αποτελεσματικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι Francone et al πρώτοι ανέφεραν ότι όταν έγινε ενδοπεριτόνια ένεση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών (LPS) σε *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Abca1*<sup>-/-</sup> επίμυες, τα επίπεδα της κυκλοφορίας της MCP-1, TNF-α και IL-6 αυξήθηκαν 8 φορές, συγκριτικά με τους *Ldlr*<sup>-/-</sup> επίμυες αναφοράς, στους οποίους είχε εισαχθεί επίσης LPS [48]. Μετ'έπειτα μελέτες από τους Koseki et al έδειξαν ότι σε καλλιέργειες *Abca1*<sup>-/-</sup> μακροφάγων εκκρίνονται μεγαλύτερες ποσότητες TNF-α σε απόκριση στον LPS και ότι αυτή η απόκριση σχετιζόταν με τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης των λιπιδικών σχεδίων της κυτταρικής επιφάνειας [49]. Επιπλέον, οι Zhu et al ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα και βρήκαν ότι η υπερ-ευαισθησία σε LPS που βρήκαν σε *Abca1*<sup>-/-</sup> μακροφάγα απαιτεί την έκφραση του MyD88, μιας πρωτεΐνης προσαρμογέα που επάγει την σηματοδότηση του LPS μέσω του υποδοχέα που ομοιάζει με τον Toll 4 (TLR-4: Toll Like Receptor 4) [50].

Οι παραπάνω μελέτες υποστηρίζουν ότι οι αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες του ABCA1 οφείλονται στην ικανότητα του να συντονίζει την μεταφορά της ελεύθερης χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη και την συγκρότηση λιπιδικών σχεδίων. Παρόλα αυτά, πρόσφατη μελέτη από τους Tang et al. προτείνει ότι όλες οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ABCA1 δεν είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας του στην μεταφορά λιπιδίων [51]. Οι Tang et al. έδειξαν ότι ο ABCA1 αλληλεπιδρά άμεσα με την Κινάση Ιανός 2 (JAK2) και ότι η δεσμευμένη JAK2 φωσφορυλιώνεται ύστερα από την επώαση των κυττάρων με την αποΑ-I. Η φωσφορυλιωμένη STAT3, ένας μεταγραφικός παράγοντας που προάγει την σηματοδότηση από την JAK2, βρέθηκε επίσης να δεσμεύεται με τον ABCA1 με έναν αποΑ-I εξαρτώμενο τρόπο. Μεταλλάξεις στον ABCA1 που επηρεάζουν

τον σχηματισμό του συμπλόκου ABCA1/STAT3, δεν επηρέασε την μέσω ABCA1 εκροή χοληστερόλης, αλλά εμπόδισε την ικανότητα του ABCA1 να καταστείλει την έκκριση κυτταροκινών σε απόκριση του LPS. Έτσι, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι εκτός από την ικανότητα του ABCA1 να επηρεάζει τα μονοπάτια φλεγμονώδους σηματοδότησης έμμεσα τροποποιώντας τις λιπιδικές δομές της κυτταρικής μεμβράνης, δρα άμεσα ως ένας αντιφλεγμονώδης υποδοχέας επάγοντας σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού JAK2/STAT3 σε απόκριση της σύνδεσης του σε αυτόν της φτωχής λιπιδίων αποΑ-I. Αυτό το εύρημα παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα μπορούσε να δώσει μια λογική εξήγηση σε περιπτώσεις ανασυγκρότησης της HDL σε απόκριση οξείας φλεγμονής όταν το αμυλοειδές Α του ορού (SAA) αντικαθιστά την αποΑ-I στα HDL σωματίδια [51,52]. Ο σκοπός της απελευθέρωσης της αποΑ-I θα μπορούσε να είναι η αναστολή της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω του μονοπατιού JAK2/STAT3 σε περίπτωση μόλυνσης.

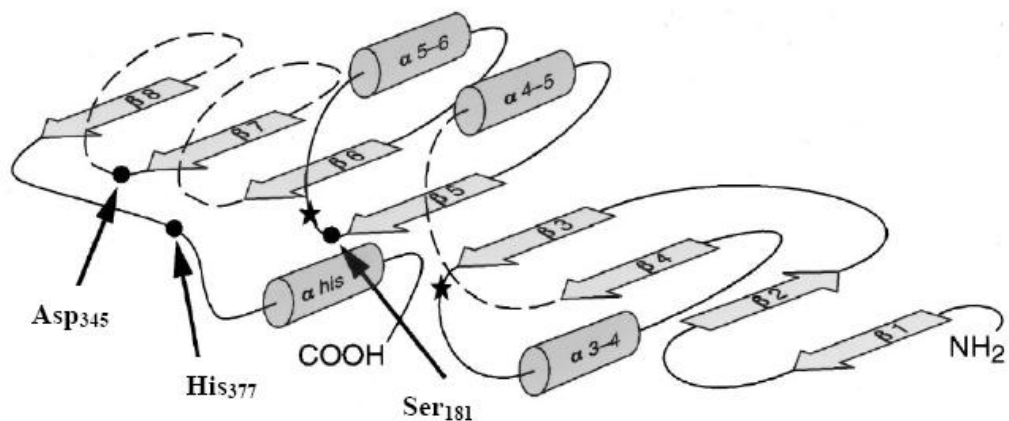
## 1.5 LCAT

### 1.5.1 Η δομή της LCAT

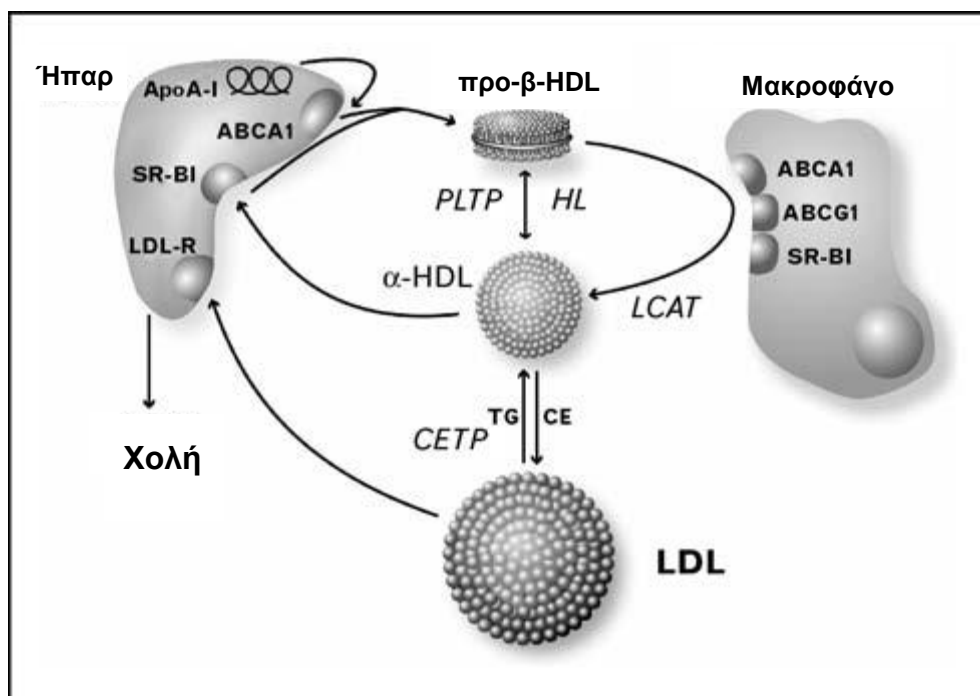
Η LCAT, που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1962 από τον Glomset [53], είναι ένα ένζυμο κλειδί για την παραγωγή εστέρων χοληστερόλης στο πλάσμα και προάγει τον σχηματισμό της HDL. Έχοντας ως ενεργοποιητή της την αποΑ-I [54] η LCAT καταλύει την εστεροποίηση των μορίων της χοληστερόλης της HDL και της LDL και αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την ωρίμανση των δισκοειδών σωματιδίων της HDL σε σφαιρικά σωματίδια.

Λίγο μετά την ανακάλυψη της LCAT προτάθηκε από τον ίδιο τον Glomset [55] ότι η LCAT συμμετέχει στην πορεία ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (RCT: Reverse Cholesterol Transport), έναν μηχανισμό αντιαθηρογένεσης μέσω του οποίου περίσσεια χοληστερόλης μεταφέρεται από τα κύτταρα σε σωματίδια HDL και στην συνέχεια στο ήπαρ για απέκκριση μέσω της χολής (ενότητα 1.9.3.1) [56,57]. Αν και ο ρόλος της LCAT στον σχηματισμό της HDL έχει επιβεβαιωθεί, ο συνολικός της ρόλος στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός.

Η ώριμη πρωτεΐνη περιέχει 416 αμινοξέα και η πρωτοταγής αμινοξική αλληλουχία της LCAT είναι σχετικά συντηρημένη [58-62]. Όσον αφορά την τεταρτοταγή δομή της, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες, καθώς μόνο ένα δομικό μοντέλο έχει περιγραφεί για την LCAT βασισμένο στην ομολογία της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας με δομή  $\alpha/\beta$  υδρολασών, όπως οι λιπάσες [63], (**Εικόνα 1.14**). Το μοντέλο



**Εικόνα 1.14.** Η κεντρική περιοχή του ενζύμου LCAT. Οι τελείες παριστάνουν τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, ενώ τα αστέρια τα αμινοξέα Phe<sub>103</sub> και Leu<sub>182</sub> [64].



**Εικόνα 1.15.** Ο ρόλος της LCAT στον μεταβολισμό της HDL. Η LCAT πέπτει το λιπαρό οξύ (R2) από την θέση sn-2 της φωσφατιδυλοχολίνης και στην συνέχεια το τρανσ-εστεροποιεί στον A δακτύλιο της χοληστερόλης, παράγοντας μια λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και έναν εστέρα χοληστερόλης. CE: Εστέρας χοληστερόλης, CETP: πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, HDL: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, TG: τριγλυκερίδια, SR-BI: ο υποδοχέας της HDL [65] (Για την προ-β-HDL αναλυτικά στην ενότητα 1.9.2).

προβλέπει τη διαμόρφωση της γνωστής καταλυτικής τριάδας του ενζύμου, η οποία σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Ser181, Asp345, and His377. Τα αμινοξέα Phe103 και Leu182 συμμετέχουν και αυτά στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου. Δυο δισουλφιδικοί δεσμοί έχουν περιγραφεί στην LCAT [66]. Στο τμήμα 53-71, στο οποίο περιέχεται ο δισουλφιδικός δεσμός των καταλοίπων Cys50-Cys74, σχηματίζεται τμήμα της περιοχής επικάλυψης (lid-region) και μια περιοχή σύνδεσης λιπιδίων [67-69], οι οποίες εν μέρει καλύπτουν την ενεργή περιοχή του ενζύμου [70]. Η LCAT περιέχει επίσης δυο ελεύθερες κυστεΐνες (Cys31, Cys184), οι οποίες επηρεάζουν την ευαισθησία του ενζύμου σε αναστολή από δραστικούς παράγοντες σουλφυδρυλίου [71]. Η πλήρως ώριμη πρωτεΐνη έχει μοριακή μάζα περίπου 63 kDa, η οποία είναι μεγαλύτερη κατά 20% από την προβλεπόμενη μοριακή μάζα. Ο κύριος λόγος της μεγαλύτερης μοριακής μάζας είναι η παρουσία N-γλυκοζυλίωσης [72,73], η οποία είναι σημαντική για την βιολογική δραστικότητα της LCAT [74-77].

### **1.5.2 Η λειτουργία της LCAT στο μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης**

Στην **Εικόνα 1.15** φαίνεται η συμμετοχή της LCAT στο μονοπάτι της RCT (ενότητα 1.9.3.1) [56], στο οποίο η LCAT παίζει δυο σημαντικούς ρόλους. Πρώτον, όπως είχε αναφέρει ο Glomset το 1968 [56], η LCAT φαίνεται ότι προάγει την εκροή χοληστερόλης από τα περιφερικά κύτταρα [78]. Η εστεροποίηση της χοληστερόλης στην HDL αυξάνει την κλίση συγκέντρωσης για την ελεύθερη χοληστερόλη μεταξύ κυτταρικής μεμβράνης και HDL. Χωρίς την αυξανόμενη εστεροποίηση της χοληστερόλης, η ικανότητα της HDL να απομακρύνει και να συνδέσει επιπρόσθετη χοληστερόλη θα ελαττώνονταν με το πέρασμα του χρόνου. Η CETP συνεχίζει την πορεία του μεταβολισμού της HDL. Δεύτερον, με την εστεροποίηση της χοληστερόλης προάγεται η μετατροπή της δισκοειδούς HDL, η οποία έχει προ-β ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτή αгарόζης, σε σφαιρική HDL, η οποία λέγεται α-HDL που έχει αθηροπροστατευτικές ιδιότητες (ενότητα 1.9.2) [3]. Επειδή οι εστέρες χοληστερόλης είναι πιο υδρόφοβοι από την χοληστερόλη, η LCAT προστατεύει από αυθόρμητη αντίστροφη ανταλλαγή της χοληστερόλης από την HDL στα κύτταρα και επομένως προάγει την δικτυακή κυτταρική απομάκρυνση χοληστερόλης. Οι εστέρες χοληστερόλης στην HDL και στην LDL είναι καλά πακεταρισμένοι σε αυτές τις λιποπρωτεΐνες μέχρι να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία μέσω του ήπατος.

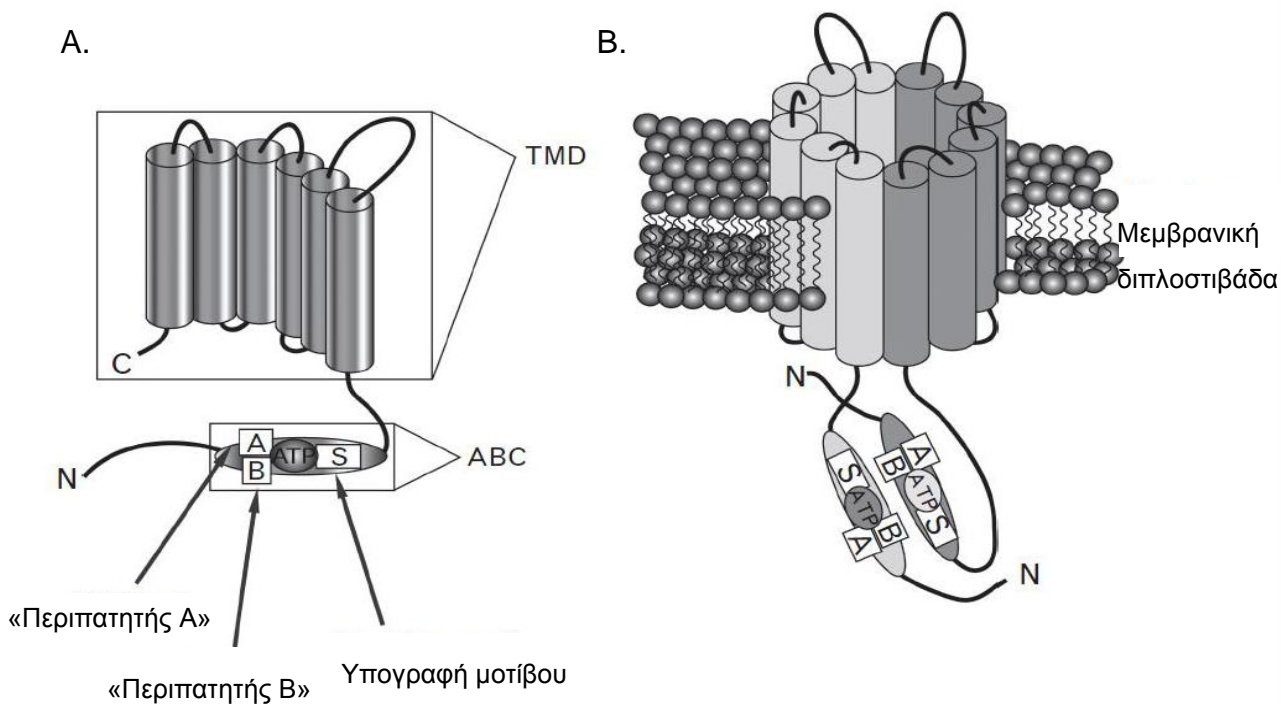
## 1.6 Μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για την apoA-I, τον ABCA1 και την LCAT, που είναι ζωτικής σημασίας για την βιογένεση της HDL, προκαλούν μείωση της HDL. Ένας αριθμός από μεταλλάξεις στο γονίδιο της ανθρώπινης apoA-I, συμπεριλαμβανομένων διάσπασης γονιδίου, μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου, μεταλλάξεων λάθους νοήματος, χρωμοσωμικών προσθηκών ή ελλείψεων, έχει βρεθεί να οδηγούν σε προβλήματα σχηματισμού της HDL και να προκαλούν μειώσεις των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης (HDL-c) και μάλιστα οι μειώσεις είναι ανάλογες του αριθμού των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων [79-81]. Στο γονίδιο του ανθρώπινου ABCA1, πάνω από 100 διαφορετικές μεταλλάξεις περιλαμβανομένου μεταλλάξεων λάθους νοήματος, μεταλλάξεων χωρίς νόημα, χρωμοσωμικών προσθηκών ή ελλείψεων έχουν περιγραφεί [80,81]. Πλήρης έλλειψη της λειτουργίας του ABCA1 προκαλεί την νόσο την Τανγκέρης, η οποία χαρακτηρίζεται από μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ή εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα HDL-c. Ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στον ABCA1 τυπικά παρουσιάζουν το 50–60% των φυσιολογικών επιπέδων της HDL-c [80,81]. Μεταλλάξεις του γονιδίου της LCAT μπορεί να οδηγήσει είτε στην οικογενή έλλειψη της LCAT (FLD: Familial LCAT Deficiency) είτε στη νόσο το μάτι του ψαριού (FED: Fish-Eye Disease) [80-82]. Στους ασθενείς με FLD οι μεταλλάξεις στην LCAT αποτρέπουν την εστεροποίηση της χοληστερόλης και της HDL και της LDL, ενώ οι μεταλλάξεις στους ασθενείς με FED προκαλούν μόνο έλλειψη της δραστηριότητας στην HDL. Και ενώ οι ασθενείς με FLD και FED παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη έλλειψη της HDL, οι ετεροζυγώτες για την LCAT, τυπικά παρουσιάζουν 35–50% μείωση των επιπέδων της HDL-c [80-82].

## 1.7 Ο Μεταφορέας ABCG1

### 1.7.1 Η δομή του ABCG1

Σε αντίθεση με τον ABCA1 που είναι ένας ολόκληρος μεταφορέας (περιέχει δυο όμοια ήμισυ δομικών περιοχών), ο ABCG1 είναι ένας ημι-μεταφορέας (περιέχει το ένα ήμισυ). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ABCG περιέχει μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD) και μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (ABC) (**Εικόνα 1.16Α**). Τα μέλη της οικογένειας των ABCG (ανάμεσα τους οι ABCG1, 2, 4, 5, 8, και στην *Drosophila* οι white, brown και scarlet) από ένα σύνολο 250 μελών ABC μεταφορέων (σε διάφορα φύλα, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ψαριών, πτηνών και θηλαστικών) είναι οι



**Εικόνα 1.16. Α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής μέλους της οικογένειας των ABCG ημι-μεταφορέων που περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (ABC) και μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD), αποτελούμενη από 6 εναλλασσόμενες α-έλικες. Η ABC περιοχή περιέχει τρεις υψηλά συντηρημένες περιοχές (μαύρα βέλη): (1) Ο «Περιπατητής Α» (Walker A, P-loop, 12 αμινοξέα), (2) Ο «Περιπατητής Β» (Walker B, 5 αμινοξέα) και (3) Ο Περιπατητής C ή υπογραφή-μοτίβο (Walker C ή S, 5 αμινοξέα). Β) σχηματική αναπαράσταση ομοδιμερούς σε μια μεμβρανική διπλοστιβάδα. Το μοντέλο βασίζεται στην κρυσταλλική δομή του βακτηριακού ημι-μεταφορέα Sav1866 του *Staphylococcus aureus* σε διακριτότητα 3 Å. Οι περιοχές-μοτίβα του Περιπατητή Α και του Περιπατητή Β του ενός ημι-μεταφορέα αλληλεπιδρούν με την υπογραφή-μοτίβο S του άλλου ημι-μεταφορέα (ανασκόπηση στο [83]).**

μοναδικοί ABC μεταφορείς, στους οποίους η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο της διαμεμβρανικής περιοχής (ανασκόπηση στο [83]). Όλα τα υπόλοιπα μέλη (ABCA-F) έχουν δομικές τους περιοχές ως εξής: N-τελικό άκρο-TMD1- ABC1 (ημι-μεταφορείς), N-τελικό άκρο-TMD1- ABC1- TMD2- ABC2 (μεταφορείς). Ο λόγος αυτής της διαφοράς στους ABCG μεταφορείς προς το παρόν δεν έχει διευκρινιστεί (ανασκόπηση στο [83]). Επειδή ένας ενεργός μεταφορέας χρειάζεται δυο περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίου και δυο διαμεμβρανικές δεσμίδες 6 α-ελίκων, τα μέλη της οικογένειας ABCG πρέπει να σχηματίζουν έτερο- ή ομοδιμερή για να γίνουν λειτουργικά (**Εικόνα 1.16B**). Ο ABCG1 πιστεύεται πως λειτουργεί ως ομοδιμερές στα μακροφάγα [84-87].



### 1.7.2 Ο ρόλος του ABCG1 στην εκροή στερολών

Υπερέκφραση του ABCG1 έχει δείχθει ότι προάγει την εκροή κυτταρικής χοληστερόλης σε HDL σωματίδια και άλλα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, αλλά όχι στην ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I [84-89]. Μελέτες σε *abcg1* *-/-* επίμυες επίσης έδειξαν ότι παρουσία HDL ο ABCG1 παίζει κρίσιμο ρόλο στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης [87], ενώ μια μελέτη έδειξε ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην εκροή ακόμη και φωσφολιπιδίων [90]. Επιπλέον, προτάθηκε ότι ο ABCG1 παίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από μακροφάγα *in vivo* [91]. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίχθηκε κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης σε επίμυες σημασμένων με [<sup>3</sup>H]χοληστερόλη μακροφάγων J774 που είχαν αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ABCG1, καθώς και πρωτογενών καλλιιεργειών μακροφάγων που στερούνταν την έκφραση του ABCG1 και μέτρησης των επιπέδων [<sup>3</sup>H]χοληστερόλης του πλάσματος και των περιττωμάτων των επίμυων (6). Παρ' όλα αυτά, έχει δείχθει ότι τα λιπιδικά και λιποπρωτεϊνικά επίπεδα του πλάσματος δεν επηρεάστηκαν σε *abcg1* *-/-* επίμυες ή διαγονιδιακούς για τον ABCG1 επίμυες, υποδεικνύοντας ότι ο ABCG1 αν και προάγει την εκροή χοληστερόλης, μπορεί να μην επηρεάζει τα επίπεδα της HDL του πλάσματος [87,92,93]. Επιπρόσθετα, προτάθηκε ότι η έλλειψη του *abcg1* σε ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα την μαζική συσσώρευση λιπιδίων σε ηπατοκύτταρα και μακροφάγα διαφόρων ιστών, και ιδιαίτερα σε μακροφάγα του πνεύμονα [87,92-97]. Επιπλέον έχει δείχθει ότι ο ABCG1 προάγει την εκροή της 7-κετοχοληστερόλης και σχετιζόμενων οξυστερολών από μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα προς την HDL, προστατεύοντας τα κύτταρα από δυσλειτουργία και απόπτωση [98,99]. Σε πρόσφατες γενετικές μελέτες σε ανθρώπους εντοπίστηκαν λειτουργικά εναλλακτικά μετάγραφα του ABCG1 που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου [100,101], υποστηρίζοντας έναν σημαντικό ρόλο του ABCG1 στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, η HDL από άτομα με έλλειψη στην CETP ή από ασθενείς στους οποίους έχει χορηγηθεί ο αναστολέας του CETP torcetrapib ή anacetrapib, φαίνεται να έχει αυξημένη ικανότητα να προάγει εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μέσω ABCG1 [102-104], υποδηλώνοντας ότι ο ABCG1 μπορεί να συμμετέχει στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL συμπεριλαμβανομένη την επαγωγή της εκροής της κυτταρικής χοληστερόλης.

### 1.7.3 Κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργία του ABCG1

Αρχικές μελέτες είχαν δείξει ότι ο ABCG1 εκφράζεται και στην κυτταρική επιφάνεια και σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα [85,89]. Είχε εκφραστεί η άποψη ότι τόσο ο ABCA1 όσο

και ο ABCG1 φαίνεται να έχουν την εγγενή ικανότητα να μεταφέρουν χοληστερόλη σε περιοχές της κυτταρικής επιφάνειας που να είναι προσβάσιμες από εξωκυτταρικά μόρια [33,85]. Είχε υποστηριχθεί ότι σε αντίθεση με την ABCA1-εξαρτώμενη λιπιδική εκροή, η ABCG1-εξαρτώμενη εκροής χοληστερόλης δεν φαίνεται να απαιτεί άμεση αλληλεπίδραση με λιποπρωτεΐνες [86] και ότι είναι πιθανό ο ABCG1 να σχηματίζει στην κυτταρική επιφάνεια λιπιδικές δομές που να επιτρέπουν στην χοληστερόλη να μεταφέρεται εκεί και να μπορεί να δεσμευτεί από τις λιποπρωτεΐνες. Αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο ABCG1 διευκολύνει την εκροή στερολών παραμένει άγνωστος, πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο ABCG1 εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια / ενδοσώματα, ενώ είναι οριακά ή καθόλου ανιχνεύσιμος στην κυτταρική μεμβράνη [105,106].

Δυο ερευνητικές ομάδες έχουν παράξει μεταλλάξεις αλανίνης προκειμένου να αναγνωρίσουν κρίσιμα αμινοξέα και περιοχές που σχετίζονται με την λειτουργία και μεμβρανικό εντοπισμό του ABCG1 [105,107]. Ο Gao et al. μετάλλαξαν μια από τις 16 κυστεΐνες του ABCG1 (C514A) και έδειξε ότι αυτή η μετάλλαξη είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί η εξαρτώμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης [107]. Αυτή η μετάλλαξη δεν επηρέασε τον εντοπισμό ή την σταθερότητα του μεταφορέα, αλλά ούτε και τον διμερισμό του [107]. Αντίθετα, οι Tarling και Edwards σύγκριναν τις αμινοξικές αλληλουχίες των διαμεμβρανικών α-ελίκων των ABCG1, ABCG4, SCAP (sterol cleavage-activating protein) και INSIG (insulin-induced gene 2) [105]. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση ενός αριθμού αμινοξέων που ήταν συντηρημένα σε αυτές τις πρωτεΐνες. Κάποια από αυτά τα συντηρημένα αμινοξέα είχε δειχθεί νωρίτερα να είναι κρίσιμα για την λειτουργία του INSIG και την πρόσδεση οξυστερολών [108]. Η αλλαγή της αλανίνης σε αυτά τα συντηρημένα αμινοξέα του ABCG1 επηρέασε την εκροή χοληστερόλης, αλλά ο μεταφορέας εντοπιζόταν κανονικά σε ενδοκυτταρικά ενδοσώματα και σχηματιζόταν ομοδιμερή [105]. Μελέτες υβριδικών πρωτεϊνών που περιείχαν τις TMD του ABCG1 και τις κυτταροπλασματικές περιοχές του μη μεταφορέα στερολών ABCG2, επιβεβαίωνε ότι οι TMD του ABCG1 ήταν αρκετές για την εκροή χοληστερόλης και σωστό ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης [105].

#### **1.7.4 Ο ρόλος του ABCG1 στην φλεγμονή**

Στους πνεύμονες από *Abcg1*<sup>-/-</sup> επίμυες έχει παρατηρηθεί μαζική διείσδυση λεμφοκυττάρων και μακροφάγων, καθώς και αυξημένη φλεγμονή. Έχει βρεθεί σε μια σειρά από μελέτες αύξηση διαφόρων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, καθώς επίσης αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων σε πνεύμονες *Abcg1*<sup>-/-</sup> επίμυων. Τέτοιες

προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις μπορούν να επαληθευτούν *in vitro* επωάζοντας wild type (WT) ή *Abcg1*<sup>-/-</sup> μακροφάγα με οξυστερόλες, οι οποίες έχουν δειχθεί να συσσωρεύονται σε πνεύμονες *Abcg1*<sup>-/-</sup> επίμυων. Μάλιστα, τα *Abcg1*<sup>-/-</sup> μακροφάγα προερχόμενα από τον μυελό των οστών είναι πιο ευαίσθητα σε αυτές τις οξυστερόλες και παράγουν πιο πολλές προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συγκριτικά με WT μακροφάγα προερχόμενα επίσης από τον μυελό των οστών. Σε *Abca1*<sup>-/-</sup> x *Abcg1*<sup>-/-</sup>, *Abcg1*<sup>-/-</sup>, *Abca1*<sup>-/-</sup> και WT επίμυες, οι οποίοι είχαν επωαστεί με LPS, απομονώθηκαν μακροφάγα από το περιτόναιο και βρέθηκε η έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων να έχει την εξής σειρά: *Abca1*<sup>-/-</sup> x *Abcg1*<sup>-/-</sup> > *Abcg1*<sup>-/-</sup> > *Abca1*<sup>-/-</sup> > WT, τα επίπεδα του TLR4 είχαν την ίδια σειρά, ενώ η εκροή χοληστερόλης εξαρτώταν από τα επίπεδα του TLR4. Φαίνεται πως η προ-φλεγμονώδης κατάσταση θα μπορούσε να είναι ένα δευτερογενές φαινόμενο, το οποίο να εξαρτάται από την ενδοκυτταρική συσσώρευση συγκεκριμένων οξυστερολών ή/και λιπιδίων και μάλιστα το φαινόμενο να οξύνεται απουσία ABCG1 και σε μικρότερο βαθμό απουσία ABCA1 (ανασκόπηση στο [109]).

## **1.8 Κυκλοφορικό σύστημα και Αθηροσκλήρωση**

### **1.8.1 Το κυκλοφορικό σύστημα και ο ρόλος του**

Το κυκλοφορικό σύστημα αποτελείται από διάφορους κοίλους χώρους και σωλήνες (μέσα στο οποίο διακινείται το αίμα και η λέμφος), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους και απλώνονται σε όλο το σώμα. Χάρη στο κυκλοφορικό σύστημα εξασφαλίζεται η θρέψη και η λειτουργία διαφόρων οργάνων, διότι με αυτό διακινούνται α) τα αναπνευστικά αέρια O<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> μεταξύ των πνευμόνων και των ιστών, β) οι θρεπτικές ουσίες και γ) τα περιττά προϊόντα του μεταβολισμού, καθώς και όλες οι άχρηστες ουσίες για τον οργανισμό. Το κυκλοφορικό σύστημα συμβάλλει επίσης με την λειτουργία του δ) στη θερμορρύθμιση (μεταφοράς θερμότητας), ε) στην διατήρηση της ομοιοστασίας (διακίνηση ύδατος και ηλεκτρολυτών), ζ) στη ρύθμιση της λειτουργίας διαφόρων κυττάρων ή οργάνων πχ ενδοκρινών αδένων (μεταφορά ορμονών) και η) στην άμυνα του οργανισμού (μεταφορά αντισωμάτων, λευκών αιμοσφαιρίων κτλ). Το κυκλοφορικό σύστημα χωρίζεται σε δυο τμήματα: α) το καρδιαγγειακό ή αιματικό ή κυρίως κυκλοφορικό σύστημα (κυκλοφορία αίματος) και β) στο λεμφικό σύστημα (κυκλοφορία λέμφου). Όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα, είναι ένα κλειστό σύστημα μέσα στο οποίο το αίμα κινείται κυκλικά και επανέρχεται περιοδικά στο σημείο εκκινήσεως του. Το σύστημα αυτό αποτελείται από: α) την καρδιά, η οποία λειτουργεί ως αντλία και προωθεί το αίμα και β) τα αγγεία, που μεταφέρουν το αίμα από την καρδιά στα διάφορα

όργανα του σώματος (αρτηρίες) και το επιστρέφουν πάλι στην καρδιά (φλέβες). Μεταξύ αρτηριών και φλεβών παρεμβάλλονται τα τριχοειδή [110].

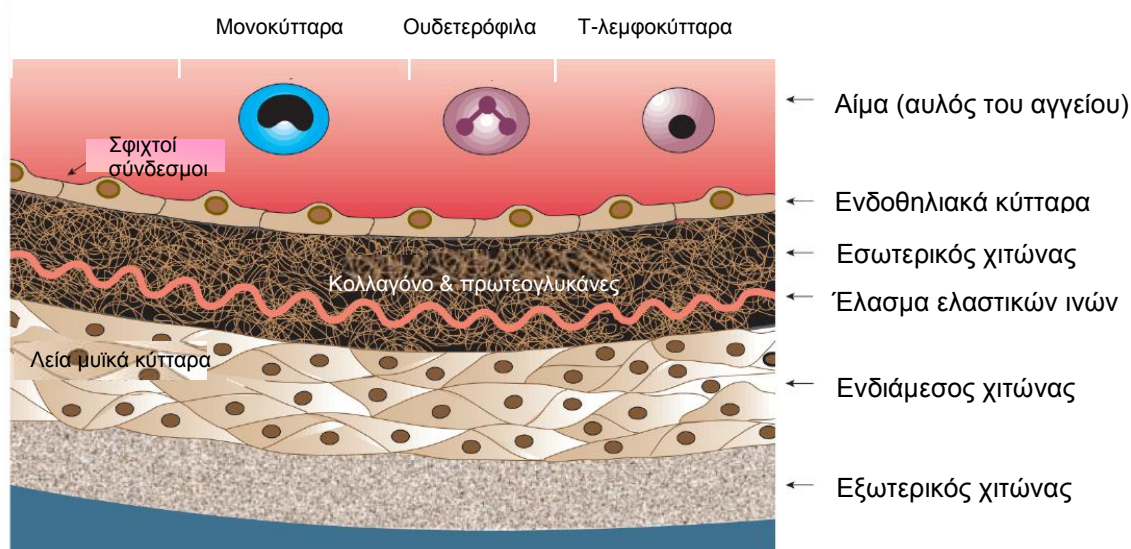
### 1.8.2 Η δομή μιας μεγάλης αρτηρίας

Ένα μεγάλο αγγείο αποτελείται από 3 ξεχωριστά μορφολογικά στρώματα, τον εσωτερικό, τον ενδιάμεσο και τον εξωτερικό χιτώνα (**Εικόνα 1.17**). Ο εσωτερικός χιτώνας οριοθετείται εσωτερικά από ένα μονό στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που έρχεται σε επαφή με τον αυλό του αγγείου και εξωτερικά από ένα έλασμα ελαστικών ινών. Ένας φυσιολογικός εσωτερικός χιτώνας είναι μια πολύ λεπτή περιοχή (στην **Εικόνα 1.17** το μέγεθος του είναι μεγενθυμένο) και αποτελείται από εξωκυττάριο συνδετικό ιστό θεμέλιας ουσίας, κυρίως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο. Ο ενδιάμεσος χιτώνας, ο οποίος περιβάλλει τον εσωτερικό, αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs: Smooth muscle Cells), ενώ ο εξωτερικός χιτώνας που με την σειρά του περιβάλλει τον ενδιάμεσο, αποτελείται από συνδετικούς ιστούς με διασπαρμένους ινοβλάστες και SMCs (ανασκόπηση στο [111]).

### 1.8.3 Αθηροσκλήρωση, η πάθηση των μεγάλων αρτηριών

Η αθηροσκλήρωση είναι πάθηση των αγγείων του εγκεφάλου, της αορτής και των στεφανιαίων αρτηριών και αφορά τον σχηματισμό μιας αργά αναπτυσσόμενης πλάκας (αθηρωματικής πλάκας) στον εσωτερικό χιτώνα της αρτηρίας και το στένωμα του αυλού της αρτηρίας (ανασκόπηση στο [112]). Στους ανθρώπους, η αθηρωματική πλάκα μπορεί να βρεθεί στην αορτή την 1η δεκαετία της ζωής μας, στις στεφανιαίες αρτηρίες την 2<sup>η</sup> δεκαετία και στα αγγεία του εγκεφάλου την 3<sup>η</sup>-4<sup>η</sup> δεκαετία. Κατά τη ρήξη της πλάκας και την δημιουργία θρόμβου, οι πιο κοινές μορφές καρδιαγγειακών ασθενειών είναι το οξυ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό [111]. Η βασική παθολογία της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζεται ως μια χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία των αρτηριακών τοιχωμάτων που συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές με διαταραχές στην ροή του αυλού των αρτηριών, όπως σε περιοχές διακλάδωσης. Ξεκινάει από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και δομικές αλλαγές του αγγείου, έλλειψη σε κάποια σημεία της ελαστικότητας του στρώματος του αγγείου που περιβάλλει τον αυλό και έκθεση των πρωτεογλυκανών, που επιτρέπει την συγκέντρωση των LDL στον ύπο-ενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών). Τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης της κυκλοφορίας που μεταφέρεται από τις LDL που περιέχουν την αποB100 προάγουν την αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η πρόσδεση της αποB100 στις αρνητικά φορτισμένες

πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας οδηγεί στην διατήρηση των LDL στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο, όπου είναι επιδεκτικές στην οξειδωτική τροποποίηση από δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS: Reactive Oxygen Species) ή ένζυμα όπως η μυελοπεροξειδάση ή λιποξιγενάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα.



**Εικόνα 1.17. Η δομή μιας μεγάλης φυσιολογικής αρτηρίας.** Μια μεγάλη αρτηρία αποτελείται από τρεις χιτώνες, τον εσωτερικό, τον ενδιάμεσο και τον εξωτερικό χιτώνα [111].

Τα οξειδωμένα λιπίδια και οι οξειδωμένες LDL (oxLDL) οδηγούν στην έκφραση προσκολλητικών μορίων (ICAM-1: IntraCellular Adhesion Molecule 1, P-σελεκτίνης, E-σελεκτίνης, PCAM-1: Platelet Cell Adhesion Molecule 1 and VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1) και την έκκριση χημειοτακτικών πρωτεϊνών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1), και αυξητικών παραγόντων, όπως ο διεγερτικός παράγοντας των αποικιών των μακροφάγων (M-CSF: Monocyte-Colony Stimulating Factor), τα οποία μαζί με την εναπόθεση χυμοκινών προερχόμενων από αιμοπετάλια, οδηγούν σε διείσδυση κυττάρων του ανοσοποιητικού στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Οι oxLDL επιδρούν επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλοντας την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO: Nitric Oxide), έναν σημαντικό παράγοντα αγγειοδιαστολής και έκφρασης προσκολλητικών μορίων του ενδοθηλίου για τα λευκοκύτταρα. (ELAMS: Endothelial Leukocyte Adhesion MoleculeS). Οι πρώιμες πλάκες λιπαρών εναποθέσεων αποτελούνται από T λεμφοκύτταρα και προερχόμενα από μονοκύτταρα-αφρώδη μακροφάγα κύτταρα φορτωμένα με λιπίδια (ανασκόπηση στο [111,112]). Όσον αφορά τον σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, σημαντικό ρόλο παίζουν οι oxLDL. Οι

oxLDL, οι οποίες συγκεντρώνονται στον ύπο-ενδοθηλιακό χώρο, αναγνωρίζονται από υποδοχείς-εκκαθαριστές των μακροφάγων, όπως SR-A, CD36 και CD68. Η έκφραση των υποδοχέων-εκκαθαριστών επάγεται από κυτταροκίνες όπως ο νεκρωτικός παράγοντας του όγκου (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) και η ιντερφερόνη  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Ο θάνατος των αφρωδών κυττάρων αφήνει πίσω έναν αυξανόμενο όγκο εξωκυττάρων λιπιδίων και άλλων κυτταρικών θραυσμάτων. Διαδοχική συσσώρευση αποπτωτικών κυττάρων, θραυσμάτων και κρυστάλλων χοληστερόλης σχηματίζουν ένα νεκρωτικό πυρήνα. Οι ινοαθηρωματικές πλάκες καλύπτονται από έναν ινώδη μανδύα αποτελούμενο από κολλαγόνο και λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία αντικαθίστανται από μακροφάγα στον συνεχώς λεπτότερο φλεγμονώδη μανδύα που είναι επιρρεπής στην ρήξη. Ένας αριθμός από παράγοντες κινδύνου όπως τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης και αγγειοτενσίνης II (παράγεται από την δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, ACE: Angiotensin-Converting Enzyme ) ενεργοποιεί την μετανάστευση ή πολλαπλασιασμό SMCs. Τα οιστρογόνα ασκούν ευεργετικές δράσεις στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και επίσης διεγείρουν την παραγωγή NO και προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση του CD40 με προσδέτη του, διεγείρει τα T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα να εκφράσουν κυτταροκίνες όπως η INF- $\gamma$  που επηρεάζουν την φλεγμονή, την αύξηση των SMCs και την συσσώρευση της θεμέλιας ουσίας. Τα SMCs του εσωτερικού χιτώνα εκκρίνουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που οδηγεί στην ανάπτυξη ινώδους μανδύα. Στις περιοχές γύρω από τον νεκρωτικό πυρήνα υπάρχει μεγάλη διείσδυση T-λεμφοκυττάρων και ιστοκυττάρων (mast cells), που παράγουν ένζυμα και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, που συνεισφέρουν στην φλεγμονή κοντά στις αναπτυσσόμενες πλάκες. Ευπαθείς πλάκες με λεπτούς ινώδεις μανδύες είναι το αποτέλεσμα της αποικοδόμησης της θεμέλιας ουσίας από διάφορες πρωτεάσες όπως κολλαγονάσες, ζελατινάσες, στρομολυσίνη, καθεψίνες και την αναστολή της έκκρισης θεμέλιας ουσίας. Ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες που μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τις πλάκες και να προάγουν την θρόμβωση είναι η μόλυνση, η οποία μπορεί να έχει συστημικές δράσεις, όπως η επαγωγή πρωτεϊνών οξειάς φάσης, αλλά και τοπικές δράσεις, όπως η αυξημένη έκφραση του παράγοντα του ιστού και μειωμένης έκφρασης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PA). Η ασβεστοποίηση των πλακών φαίνεται να είναι μια ενεργή ρυθμιζόμενη λειτουργία που σχετίζεται με την έκκριση από περικυτταρικά ομοιάζοντα κύτταρα (pericyte-like cells) του εσωτερικού χιτώνα ενός πλαισίου στήριξης για την εναπόθεση φωσφορικού ασβεστίου. Ο σχηματισμός του θρόμβου, που

αποτελείται από προσκολλημένα αιμοπετάλια και ινώδεις διασυνδέσεις, συνήθως είναι αποτέλεσμα της ρήξης της πλάκας [111,112].

## **1.9 HDL: Σύσταση και λειτουργία**

### **1.9.1 Η σύσταση της HDL**

Η επιφάνεια της HDL περιέχει ένα αμφιπαθητικό στρώμα ελεύθερης χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων, και αρκετών απολιποπρωτεϊνών (κυρίως αποA-I, αλλά επίσης και αποA-II, αποAIV, αποAV, αποCI, αποCII, αποCIV, αποD, αποE, αποF, αποH, αποJ, αποL, αποM) (ανασκόπηση στο [113]). Επίσης περιέχει διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, όπως την παραοξονάση 1 (PON1), την ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF-AH (Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase), την LCAT, σεληνοπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSPx) και την CETP (ανασκόπηση στο [113]). Μεταξύ των δράσεων τους τα παραπάνω ένζυμα υποστηρίζεται ότι τροποποιούν δυνητικά αθηρογόνες ROS στην LDL, στα αγγειακά τοιχώματα, ακόμα και στην ίδια την HDL [114]. Επιπρόσθετα η HDL είναι γνωστό ότι αποτελεί μεγάλο αποθηκευτικό χώρο λιπιδικών υδροπεροξειδίων [115]. Ακόμα, η χρήση ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων έδειξε ότι στην HDL υπάρχουν τόσες πρωτεΐνες με αντιφλεγμονώδεις/ανοσολογικές λειτουργίες (23/48), όσες και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και την μεταφορά λιπιδίων (22/48) [116], ενώ τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η HDL αποτελεί επίσης μεταφορέα microRNA προς κύτταρα αποδέκτες [117]. Τα microRNA είναι κοντά σε μήκος μη-κωδικά ρυθμιστικά RNA που διαμορφώνουν την βιολογική ομοιότητα ρυθμίζοντας την έκφραση ενός γονιδίου μέσω της στόχευσης του mRNA και την καταστολή της μετάφρασης [118-120]. Η πρόσληψη microRNA από την HDL ρυθμίζεται από την ουδέτερη σφιγγομυελινάση και επιτυγχάνεται και μέσω του ABCA1, ενώ η μεταφορά τους από την HDL στα κύτταρα αποδέκτες επιτυγχάνεται με SR-BI εξαρτώμενο τρόπο.

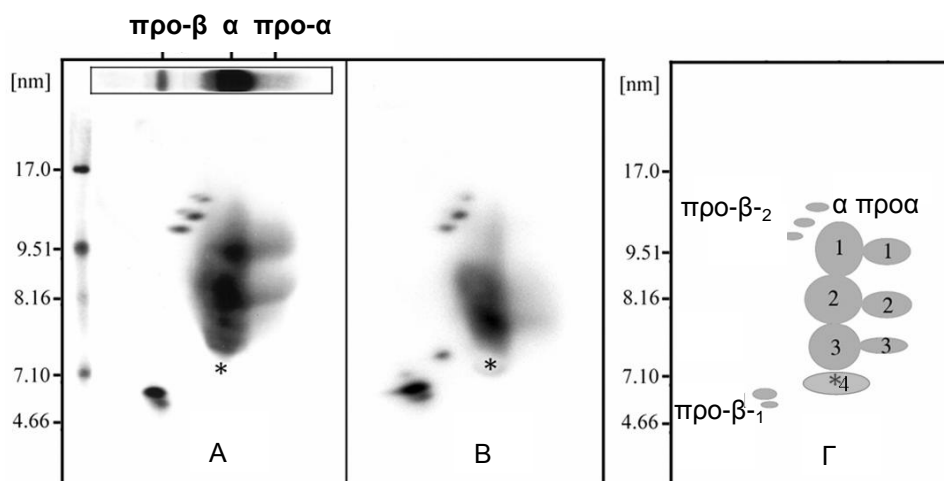
### **1.9.2 Υποπληθυσμοί της HDL**

Η HDL βρίσκεται στο πλάσμα σε διάφορες μορφές με βάση την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Έτσι, οι υποπληθυσμοί της HDL διαφέρουν, εκτός από την πυκνότητά και το μέγεθός τους, και ως προς το φορτίο τους. Αναλόγως της επιλεγμένης εργαστηριακής μεθόδου, μπορούν να διαχωριστούν διαφορετικοί HDL υποπληθυσμοί. Η υπερφυγοκέντρωση διαβαθμισμένης πυκνότητας διαχωρίζει την HDL σε HDL2 και HDL3 υποπληθυσμούς [121]. Όταν η HDL κλασματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

διαβαθμισμένης πυκνότητας, διαχωρίζεται σε 5 ξεχωριστούς υποπληθυσμούς μειωμένου μεγέθους HDL2b, 2a, 3a, 3b, and 3c [122]. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων, οι HDL υποπληθυσμοί μπορούν να διαχωριστούν σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό υπο-κλασμάτων [123].

Η ανάλυση των σωματιδίων της HDL του πλάσματος σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων μπορεί να διαχωρίσει την HDL με βάση το φορτίο και το μέγεθός της. Οι υποκατηγορίες αυτές χαρακτηρίζονται στην πρώτη διάσταση, με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα και σε σχέση με την αλβουμίνη σε προ-β- (μεταναστεύουν με πιο αργό ρυθμό), α- (με παρόμοια κινητικότητα) και προ-α- (με μεγαλύτερη κινητικότητα), ενώ στη δεύτερη διάσταση, με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους, οι κατηγορίες χωρίζονται σε προ-β<sub>-1</sub> και β<sub>-2</sub>, σε α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub> και α<sub>4</sub> και σε προα<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub> (**Εικόνα 1.18 Γ**). Υπό κανονικές συνθήκες το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει 3-5% προ-β-HDL σωματίδια και 95-97% α-HDL σωματίδια [124,125]. Ο Asztalos και οι συνεργάτες του μελέτησαν τους πληθυσμούς των σωματιδίων που σχηματίζονται στο πλάσμα υγιών ανθρώπων και ασθενών με ΣΝ χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D). Στους ασθενείς με ΣΝ τα βασικά συστατικά της HDL, η αποΑ-I και η HDL-c, δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τα υγιή άτομα. Είναι όμως ενδιαφέρον ότι, όπως αναφέρουν οι ερευνητές, η εικόνα των υποπληθυσμών της HDL που περιέχει αποΑ-I, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, και χαρακτηρίζεται από σημαντική διαταραχή στη συγκέντρωση των HDL σωματιδίων που περιέχουν αποΑ-I. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των υποπληθυσμών της α<sub>1</sub>-HDL καθώς και της προ-α-HDL ήταν σημαντικά μειωμένα σε ασθενείς με ΣΝ, σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ το ποσοστό των προ-β σωματιδίων εμφανίστηκε αυξημένο [126] (**Εικόνα 1.18 Α-Β**). Φαίνεται δηλαδή, ότι στα άτομα αυτά η ωρίμανση των φτωχών σε λιπίδια προ-β<sub>1</sub>- HDL σωματιδίων σε μεγαλύτερα σωματίδια της HDL είναι ελαττωματική. Η ίδια ομάδα ερευνητών, σε μετα-ανάλυση των ευρημάτων της κλινικής δοκιμής VA-HIT (Veterans Affairs HDL Intervention Trial), και χρησιμοποιώντας ανάλυση του πλάσματος σε δύο διαστάσεις, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένοι πληθυσμοί HDL, καθώς και η αναλογία α-/προβ- HDL σωματιδίων, αποτελούν πιο ακριβείς δείκτες επανεμφάνισης ΣΝ από ότι τα απόλυτα επίπεδα HDL-c. Συγκεκριμένα, υποστηρίζουν ότι σημαντικότεροι δείκτες είναι οι πληθυσμοί των α<sub>1</sub>- και α<sub>2</sub>-HDL σωματιδίων, έλλειψη των οποίων παρατηρείται στους ασθενείς με ΣΝ [127].





**Εικόνα 1.18. Α-Γ. Ανάλυση της HDL ανθρώπινου πλάσματος που περιέχει αποΑ-I, σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων, με βάση το φορτίο και το μέγεθος των σωματιδίων. Α) δείγμα από φυσιολογικό άτομο. Το ένθετο σχήμα στο επάνω μέρος απεικονίζει την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1η διάσταση) η οποία διαχωρίζει την HDL με βάση το φορτίο σε προ-β-, α- και προ-α- ηλεκτροφορητικές κινητικότητες. Ο αστερίσκος (\*) αντιπροσωπεύει την θέση της ανθρώπινη αλβουμίνης του πλάσματος (α-κινητικότητα), Β) δείγμα από ασθενή με στεφανιαία νόσο [128]. Γ) σχηματική επεικόνιση των HDL σωματιδίων που περιέχουν αποΑ-I [128].**

### 1.9.3 Οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL

Μελέτες επιδημιολογικές, γενετικές, καθώς και σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα της HDL στο πλάσμα προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση, ενώ αντίθετα τα μειωμένα επίπεδα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [129]. Μελέτες όμως των τελευταίων χρόνων έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα της HDL δεν αρκούν για τον αθηροπροστατευτικό της ρόλο. Η σωστή σύσταση και η λειτουργία της HDL παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο.

Η HDL φυσιολογικά εξυπηρετεί μια σειρά από σημαντικές αντιαθηρογόνες λειτουργίες, περιλαμβανομένων της προαγωγής της RCT [130], της αναστολής της οξειδωσης φωσφολιπιδίων στις LDL [131], της ρύθμισης των σχετιζόμενων με φλεγμονή κυτταροκινών και μορίων πρόσδεσης στα αγγειακά κύτταρα [132], αρκετών σημαντικών αντιθρομβωτικών και αντιαθηρογόνων επιδράσεων στο ενδοθήλιο [133], όπως της διέγερσης της παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [134,135] και προαγωγή των μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου [136,137].

### **1.9.3.1 Η HDL και το μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης**

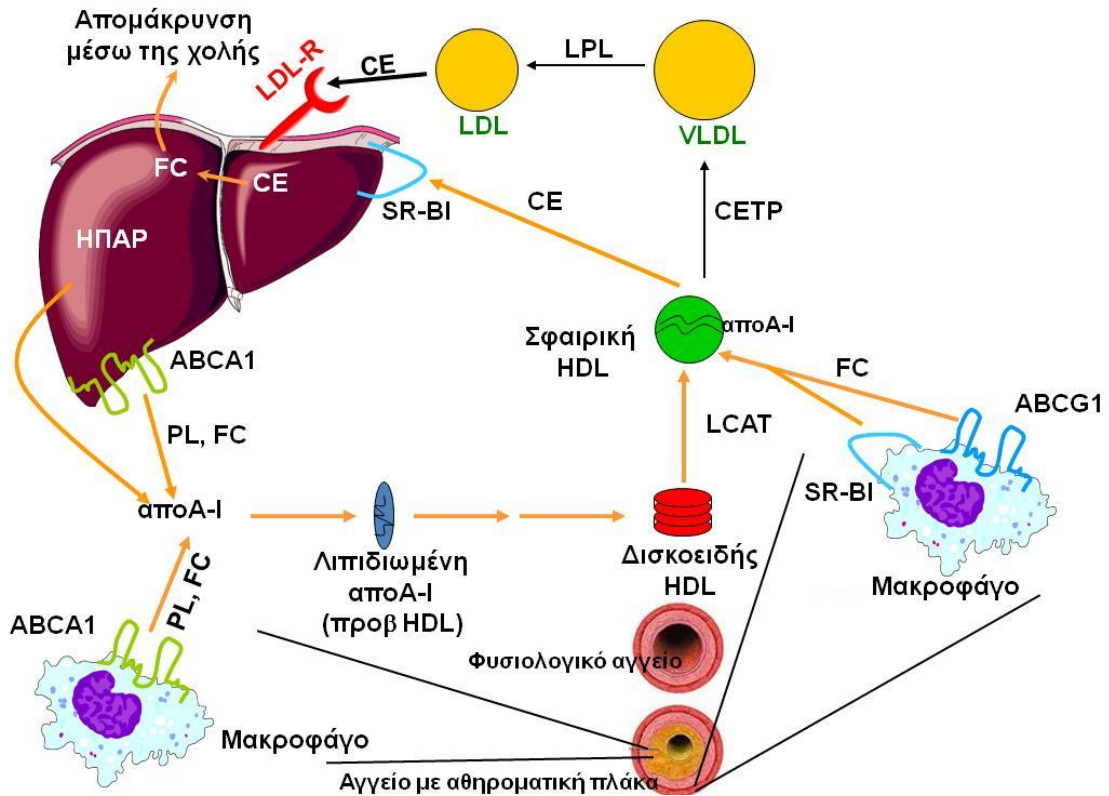
Η πορεία της RCT ξεκινά με την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα των αγγείων μέσω ABCA1 προς την ελεύθερη ή φτωχή λιπιδίων αποΑ-I και μέσω ABCG1 προς την HDL και από άλλους ιστούς μέσω ABCA1 προς την ελεύθερη ή φτωχή λιπιδίων αποΑ-I. Στην συνέχεια η χοληστερόλη της HDL εστεροποιείται από την LCAT και μεταφέρεται μέσω του υποδοχέα της HDL, τον SR-BI, στο ήπαρ για απομάκρυνση μέσω της χολής (Εικόνα 1.19).

Η εστεροποιημένη χοληστερόλη της HDL μπορεί επίσης να μεταφερθεί αρχικά από την HDL σε λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την αποB (VLDL και LDL) μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP και στην συνέχεια από τις VLDL και LDL να μεταφερθούν μέσω των LDL και LRP υποδοχέων στο ήπαρ [138]. Η αντιαθηρογόνος λειτουργία της HDL μέσω της πορείας της RCT οφείλεται στο ότι με την διευκόλυνση της απομάκρυνσης της περίσσειας κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα εμποδίζεται η δημιουργία ή μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αφρωδών κυττάρων και εμποδίζεται ή μειώνεται ο ρυθμός του θανάτου των αφρωδών κυττάρων, ο οποίος αφήνει έναν αυξανόμενο όγκο εξωκυττάρων λιπιδίων και άλλων κυτταρικών θραυσμάτων. Δεδομένου ότι από την διαδοχική συσσώρευση αποπρωτικών κυττάρων, θραυσμάτων και κρυστάλλων χοληστερόλης θα σχηματιστεί ο νεκρωτικός πυρήνας της αθηρωματικής πλάκας [111,112], η δράση της HDL εμποδίζει τον σχηματισμό ή υποστρέφει τον ήδη σχηματισμένο νεκρωτικό πυρήνα.

### **1.9.3.2 Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL**

Η HDL έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που φυσιολογικά περιορίζουν την αθηρογόνο δράση των LDL του υπο-ενδοθηλιακού χώρου, προστατεύοντας τις LDL από την περαιτέρω οξειδωση των λιπιδίων της επιφάνειας τους ή ανάγοντας τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια [139,140]. Αρκετά ένζυμα και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την HDL έχουν αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [141], ανάμεσα τους είναι η παραοξονάση 1 (PON1), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH ή Lp-PLA2) και η LCAT. Τα ένζυμα αυτά, υδρολύουν και επομένως αδρανοποιούν οξειδωμένα φωσφολιπίδια, που είναι πρόδρομοι για περαιτέρω οξειδωση και φλεγμονή [141,142].

Μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης



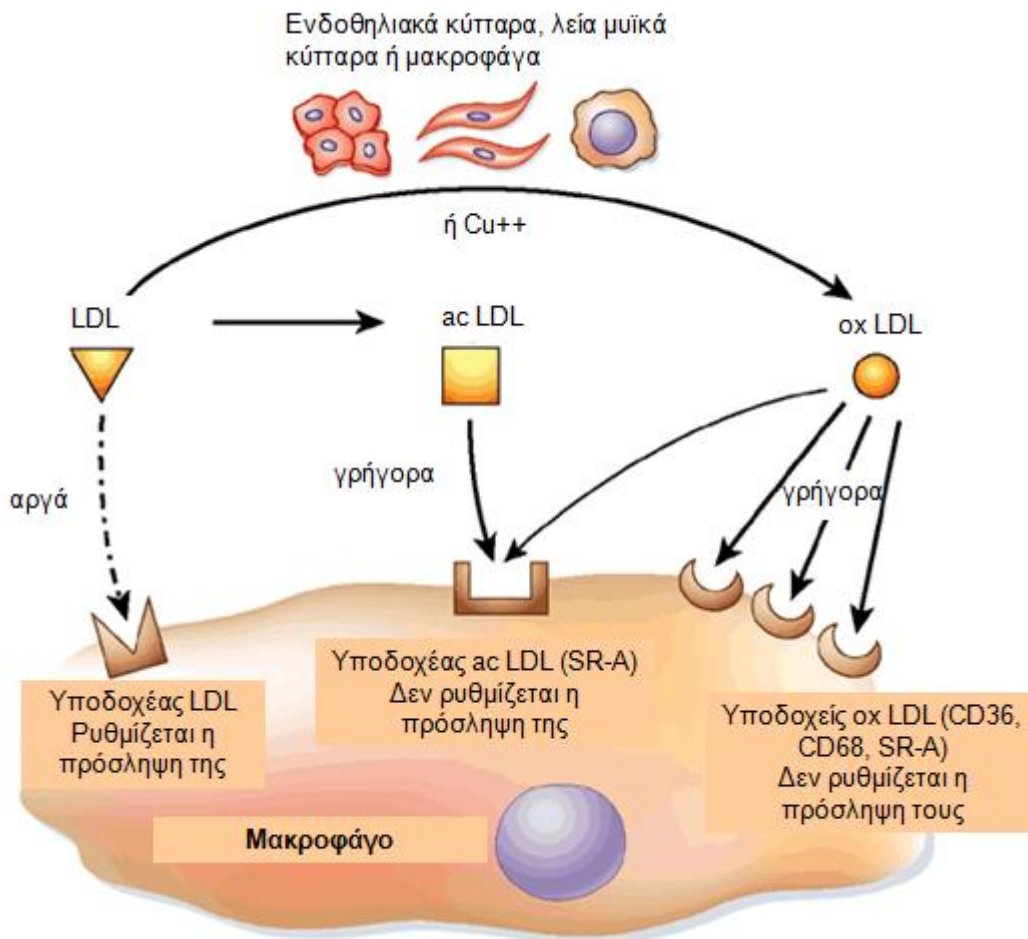
**Εικόνα 1.19.** Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης.

ABCA1: Μεταφορέας χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, αποA-I: Απολιποπρωτεΐνη A-I, PL: Φωσφολιπίδια. FC: Ελεύθερη χοληστερόλη, HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, SR-BI: Υποδοχέας της HDL, ABCG1: Μεταφορέας χοληστερόλης, LCAT: Ένζυμο εστεροποίησης χοληστερόλης, CETP: πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, VLDL: Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας, LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση, LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, CE: Εστέρας χοληστερόλης, LDL-R: Υποδοχέας της LDL.

Η LCAT υδρολύει ακυλ-ομάδες στην θέση *sn*-2 της φωσφατιδυλοχολίνης (ή λεκιθίνης) και μεταφέρει αυτό το λιπαρό οξύ στην ελεύθερη χοληστερόλη σχηματίζοντας έναν εστέρα χοληστερόλης [56,143,144]. Με τη δραστηριότητα αυτή της φωσφολιπάσης A2 (PLA2), η LCAT μπορεί επίσης να υδρολύσει οξειδωμένες ακυλ-αλυσίδες φωσφατιδυλοχολινών (OxPL), παράγοντας την λιγότερο βιοενεργή λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) [145] και οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν εν συνεχεία να χρησιμοποιηθούν από την LCAT για να εστεροποιήσει την διάκυλογλυκερόλη, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο τριγλυκερίδια εκτός από τον σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης [146]. Αρκετές μελέτες *in vitro*, καθώς και μελέτες σε ζώα έχουν δείξει πως μέσω της δραστηριότητας PLA2, η LCAT μπορεί προφανώς να ανακατασκευάσει αγγειακά λιπίδια, οδηγώντας έτσι σε μια προφανή μείωση οξειδωτικού στρες, υδρολύοντας τα οξειδωμένα *sn*-2 λιπαρά οξέα από την φωσφατιδυλοχολίνη [145-148]. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η PON1 μπορεί να αναστείλλει την βιολογική

δραστικότητα της ελαφρώς οξειδωμένης LDL (OxLDL) [149] και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (OxPL) [150], υποδηλώνοντας ότι η PON1 μπορεί να υδρολύσει τα OxPL [149,150]. Παρ'όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι ο ρόλος των παραοξονασών στην άμεση προστασία της LDL από το οξειδωτικό στρες δεν έχει επιβεβαιωθεί με σιγουριά ακόμα [151]. Έχει δειχθεί πως η PON1 αυξάνει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα προάγοντας την πρόσδεση της HDL επαγόμενη από τον ABCA1 [152]. Η δράση της PON1 μπορεί έμμεσα να μειώσει την προ-φλεγμονώδη σηματοδότηση στα κύτταρα in vivo και να συνεισφέρει στις αντι-αθηροσκληρωτικές δράσεις της PON1 [153,154]. Η PAF-AH είναι ακόμα ένα ένζυμο που βρέθηκε στην HDL που να μπορεί να υδρολύσει oxPL. Υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν ότι η PAF-AH και όχι η PON1 είναι η κύρια υδρολάση της HDL υπεύθυνη για την υδρόλυση oxPL [155,156]. Λιποπρωτεΐνες που απομονώθηκαν από μύες που εκφράζουν την ανθρώπινη PAF-AH είναι πιο σταθερές στο οξειδωτικό στρες [157]. Επιπλέον, HDL μύος που περιείχε την ανθρώπινη PAF-AH έχει δειχθεί να αναστέλλει τον σχηματισμό αφρώδων κυττάρων και να διευκολύνει την εκροή χοληστερόλης σε μακροφάγα [157].

Κατά την διάρκεια μιας αντίδρασης οξείας φάσης υπάρχει μια απότομη αύξηση του προφλεγμονώδους αμυλοειδούς A του ορού (SAA: Serum Amyloid A) και μείωση της apoA-I, PON1, PAF-AH και LCAT της HDL [141]. Έχει προταθεί ότι αυτές οι αλλαγές οδηγούν στον σχηματισμό HDL με μειωμένες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες [141]. Αν επηρεαστούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL θα έχει σαν αποτέλεσμα οι LDL να οξειδωθούν, οι τροποποιημένες LDL να επάγουν την MCP-1, να εισέλθουν τα μονοκύτταρα στο αρτηριακό τοίχωμα [158], να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα, να προσλάβουν τις τροποποιημένες LDL μέσω υποδοχέων «εκκαθαριστών» και να μετατρεπούν σε αφρώδη κύτταρα [159] (**Εικόνα 1.20**). Τα αφρώδη μακροφάγα θα παράγουν κυτταροκίνες (απώλεια αντιφλεγμονώδους ιδιότητας της HDL) που αυξάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε αγγειακά κύτταρα, προκαλώντας την πρόσκληση και άλλων μονοκυττάρων [160].



**Εικόνα 1.20. Η οδοί πρόσληψης φυσιολογικής και τροποποιημένης LDL από μακροφάγα κύτταρα.** Τα μακροφάγα κύτταρα προσλαμβάνουν την φυσιολογική LDL μέσω του υποδοχέα της LDL, ενώ την τροποποιημένη LDL μέσω υποδοχέων εκκαθαριστών (SR-A, CD36, CD 68). Και ενώ η πρόσληψη φυσιολογικής LDL ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου, η πρόσληψη τροποποιημένης LDL δεν ρυθμίζεται, ευνοώντας έτσι την δημιουργία αφρωδών κυττάρων, όταν οι τροποποιημένες LDL βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στο περιβάλλον. ac LDL: Ακετυλιωμένη LDL, ox LDL: οξειδωμένη LDL [161]

Οι φυσιολογικές HDL μετριάζουν την κλιμακωτή οξειδωση και φλεγμονή, περιορίζοντας την οξειδωση των LDL μέσω των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της apoA-I που περιέχουν [162], μειώνουν τα επαγόμενα από κυτταροκίνες προσκολλητικά μόρια και μειώνουν το λιπιδικό περιεχόμενο των φλεγμονωδών αφρωδών κυττάρων μέσω της εκροής χοληστερόλης [163].

### 1.9.3.3 Οι ενδοθηλιο-προστατευτικές ιδιότητες της HDL

Η HDL έχει βρεθεί να ασκεί αρκετές σημαντικές αντιαθηρογόνες επιδράσεις στο ενδοθήλιο [133,164]. Οι επιδράσεις αυτές της HDL αφορούν την παραγωγή NO από την συνθάση NO του ενδοθηλίου (eNOS) και μηχανισμούς επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου.

Οι επιδράσεις αυτές επάγονται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον SR-BI του ενδοθηλίου και σχετίζονται με την εκροή χοληστερόλης και την πρωτεΐνη προσαρμογέα PDZK1. Επιπλέον, με την σύνδεση της HDL με τον SR-BI έχει αναφερθεί να ενεργοποιείται η eNOS με φωσφορυλίωση στην Ser1177 που επάγεται μέσω των κινασών PI3K (κινάση της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης) και Akt. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η HDL προκαλεί ενεργοποίηση της eNOS με φωσφορυλίωση στην Ser1177 και παραγωγή NO στο ενδοθήλιο μέσω του υποδοχέα S1P3 (Sphingosine-1- Phosphate receptor 3). Μελέτες σε επίμυες υποδεικνύουν ότι η HDL προστατεύει από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που επάγεται από την χοληστερόλη της διατροφής προάγοντας α) εκροή χοληστερόλης και απελευθέρωση 7-κετο-χοληστερόλης μέσω του του ABCG1 μεταφορέα του ενδοθηλίου και β) μειωμένη, επαγόμενη από υπερχοληστερολαιμία, επίδραση καβεολίνης-1 με την eNOS. Έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπους με υπερχοληστερολαιμία ή με χαμηλά επίπεδα HDL (ετεροζυγώτες για τον μεταφορέα ABCA1) 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 βιο-διαθεσιμότητα ενδοθηλιακού NO, θεωρείται να παίζει ρόλο κλειδί στην έναρξη και ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και στην κλινική της επιπλοκή (ανασκόπηση στο [165]).

#### **1.9.3.4 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL**

Το γεγονός ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι αντίστροφα σχετιζόμενη με τα επίπεδα της HDL, υποδηλώνει ότι η HDL έχει αντι-αιμοπεταλιακή δράση. Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL οφείλονται στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μειώνοντας τα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand και ενισχύοντας την δραστικότητα των ενεργοποιημένων πρωτεϊνών C και S. Η συνεισφορά του παράγοντα von Willebrand στον σχηματισμό θρόμβου συνίσταται στην επαγωγή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα εξωκυττάρια συστατικά της θεμέλιας ουσίας και πρόληψη της άμεσης απομάκρυνσης του προπηκτικού παράγοντα VIII από το πλάσμα, που επιτρέπει την φυσιολογική παραγωγή θρομβίνης [166,167], ενώ οι πρωτεΐνες C και S είναι φυσικά αντιπηκτικά [168]. Μηχανιστικά, η HDL μπορεί να δρα έμμεσα στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επιδρώντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αν και μπορεί να δρα και άμεσα (ανασκόπηση στο [113]).

Η χορήγηση ανασυνδυασμένης HDL (rHDL) σε ανθρώπους ή έγχυση της αποA-I Μιλάνο (αποA-I C173R) σε αρουραίους ανέστειλλε την συσσώρευση αιμοπεταλίων, υποστηρίζοντας επιπλέον την υπόθεση ότι η HDL αναστέλλει την ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων in vivo. Σε ένα μοντέλο αρουραίου με οξεία αρτηριακή θρόμβωση, η έγχυση της αποΑ-I Μιλάνο είχε σαν αποτέλεσμα επιμήκυνση του χρόνου σχηματισμού του θρόμβου και μείωση του βάρους του θρόμβου υποδηλώνοντας ότι η HDL αναστέλλει τον σχηματισμό του θρόμβου in vivo [113].

Η προστακυκλίνη δρα συνεργιστικά με το NO για να επάγει διαστολή των αγγειακών λείων μυών, αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και μείωση των απελευθερούμενων αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν τον τοπικό πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Επιπλέον της προαγωγής NO, η HDL ενισχύει την σύνθεση της προστακυκλίνης, η οποία μπορεί να τροποποιήσει την θρόμβωση, καθώς και άλλα ενδοαγγειακά γεγονότα [113].

#### **1.9.4 Τροποποίηση της HDL σε παθολογικές καταστάσεις**

Παρά τις παλαιότερες αναφορές για ευεργετικές δράσεις της HDL, καθώς και την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ HDL-C και αθηροσκληρωτικού συμβάντος, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι η φαρμακολογική αύξηση των επιπέδων της HDL δεν είναι πάντα ευεργετική σε ασθενείς με ΣΝ. Σε πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι η αύξηση της HDL-C και η μείωση της LDL-C δεν επηρεάζουν πάντα την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [169]. Αλλαγές στην ποιότητα της HDL μπορεί να ευθύνεται για αυτήν τη παρατήρηση. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL μπορούν να επηρεαστούν σε συστημικές συνθήκες, για παράδειγμα μετά από εγχείρηση και η HDL να μετατραπεί από αντι- σε προ-φλεγμονώδη [170]. Δομικές και λειτουργικές αλλαγές της HDL έχουν επίσης αναφερθεί στην χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Η HDL αν και φυσιολογικά αναστέλλει την οξειδωση της LDL και μειώνει την μετανάστευση των μονοκυττάρων στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος, όταν μετατραπεί σε προ-φλεγμονώδη στερείται αυτής της ιδιότητας. Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως η φλεγμονή και ο διαβήτης, η HDL μπορεί να υποστεί τέτοιες αλλαγές που να επηρεάζουν τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της. Στον διαβήτη τύπου 2, η μικρή πυκνή HDL βρέθηκε να έχει μειωμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες σχετίστηκαν με το οξειδωτικό στρες, γλυκαιμία και υπερτριγλυκεριδαιμία. Η HDL των διαβητικών βρέθηκε να έχει ένα αυξημένο περιεχόμενο οξειδωμένων λιπαρών οξέων και μειωμένες αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (ανασκόπηση στο [171]). Η μυελουπεροξειδάση των λευκοκυττάρων (MPO), μια αιμοπρωτεΐνη που απελευθερώνεται κατά την διάρκεια της αποκοκκίωσης (degranulation) ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων, είναι αισθητά αυξημένη στην ανθρώπινη αθηρωματική πλάκα. Η MPO έχει δειχθεί ότι τροποποιεί την αποΑ-I. Αν και έχει προταθεί μηχανισμός με τον

οποίο η MPO τροποποιεί την αποΑ-I, δεν είναι αποδεκτός από όλη την επιστημονική κοινότητα. Έχει προταθεί ότι η MPO καταλύει την επιλεκτική οξειδωτική τροποποίηση της αποΑ-I in vivo. Ο Zheng et al περιγράφουν την περιοχή της άμεσης σύνδεση της MPO και παρέχεται μηχανισμός της επιλεκτικής τροποποίησης της αποΑ-I στο πλάσμα. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η MPO προκαλεί ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών και κατανάλωση του NO. Έχει δειχθεί in vivo and in vitro ότι η τροποποίηση της αποΑ-I επηρεάζει την εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα, καθώς η αποΑ-I δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον μεταφορέα, ενώ επηρεάζεται και η ικανότητα της αποΑ-I να προσδένει λιπίδια. Τροποποιημένη αποΑ-I βρέθηκε στην HDL της κυκλοφορίας ατόμων με ΣΝ. Τόσο η αποΑ-I όσο και η HDL οδήγησαν σε μειωμένη εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα. Αυξημένα επίπεδα MPO σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη (UA: Unstable Angina) μπορεί να επηρεάσει την ρήξη και αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας. Ακόμα, βρέθηκε ότι υψηλή συγκέντρωση MPO αμέσως μετά την εμφάνιση οξύ στεφανιαίου συνδρόμου (ACS: Acute Coronary Syndrome) σχετίστηκε με υψηλότερο κίνδυνο θανάτου ή επανεμφάνισης ισχαιμικών γεγονότων [171].

Μετά την αρχική παρατήρηση ότι η αποΑ-I που βρίσκεται στον προ-β HDL σωματίδιο είναι πολύ ευαίσθητη στην πρωτεόλυση [172], έγινε αντιληπτό ότι διάφορες πρωτεάσες, οι οποίες είναι γνωστό ότι βρίσκονται στον ανθρώπινο υπο-ενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος αποικοδομούν την αποΑ-I της HDL3 in vitro και μειώνουν έτσι την κυτταρική εκροή χοληστερόλης. Αυτές οι πρωτεάσες περιλαμβάνουν μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας [173], πλασμίνη, καλλικρεΐνη [174] και χυμάση (πρωτεάση ιστιοκυττάρων) [175]. Στις ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες τα ιστιοκύτταρα βρίσκονται συχνά κοντά στα αφρώδη κύτταρα [176]. Τα ιστιοκύτταρα γεμίζουν με κυτταροπλασματικά εκκριτικά κοκκία που περιέχουν αφθονία από 2 είδη ουδέτερων πρωτεασών σερίνης, την τρυπτάση και την χυμάση. Πράγματι, όπως και σε άλλους ιστούς, όλα τα ιστιοκύτταρα στον ανθρώπινο αρτηριακό υπο-ενδοθηλιακό χώρο περιέχουν τρυπτάση και επιπλέον κάποια από αυτά περιέχουν και χυμάση [176]. Κατά την ενεργοποίηση ιστιοκυττάρων, αυτές οι πρωτεάσες εκκρίνονται στην ενεργή τους μορφή. Τα ιστιοκύτταρα είναι εν δυνάμει μια σημαντική πηγή ουδέτερων πρωτεασών στο εξωκυττάριο υγρό του αρτηριακού υπο-ενδοθηλιακού χώρου. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η χυμάση των ιστιοκυττάρων πρωτεολύει αποτελεσματικά του μικρούς προ-β HDL υποπληθυσμούς που περιέχουν μόνο την αποΑ-I ή μόνο την απο A-IV και έτσι καταστρέφει την υψηλή συγγένια συστατικών της εκροής χοληστερόλης που προάγεται από την HDL3 και το πλάσμα [175,177].



Η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) επάγει την μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL προς λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια και την μεταφορά τριγλυκεριδίων προς την αντίθετη κατεύθυνση. Σε καταστάσεις υπερτριγλυκεριδαιμίας, καθώς και σε απόκριση οξείας φάσης και στο μεταβολικό σύνδρομο η HDL είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια εξαιτίας της CETP [178,179]. Η πλούσια σε τριγλυκερίδια HDL είναι ασταθής και αποικοδομείται μέσω της υδρόλυσης της ηπατικής λιπάσης [178], ενώ δεν μπορεί εύκολα να αλληλεπιδράσει με τον SR-BI του ήπατος, μειώνοντας έτσι την συμμετοχή της HDL στο μονοπάτι της RCT [178,180].

Η απόκριση οξείας φάσης που συμβαίνει σε φλεγμονώδεις ασθένειες επηρεάζει την σύσταση της HDL και σχετίζεται με μειωμένη προστασία ενάντι του οξειδωτικού στρες, επιδεινώνοντας έτσι την φλεγμονή. Τρεις δείκτες απόκρισης οξείας φάσης που αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες είναι γνωστοί. Ενώ η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) αλληλεπιδρά με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την αποB, το αμυλοειδές A του ορού (SAA) και η χαλκοπλασμίνη συνδέονται με την HDL [181]. Η SAA και η χαλκοπλασμίνη σε υψηλή συγκέντρωση δεσμεύονται στην HDL και εκτοπίζουν την αποA-I. Επίσης, κατά την διάρκεια της φλεγμονής η σύνθεση της αποA-I μειώνεται και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται και η δραστικότητα της PON1, καθώς η δραστικότητα και η σταθερότητα του ενζύμου εξαρτάται από την ποσότητα και τη σύσταση της HDL που εξαρτάται από την αποA-I. Η HDL οξείας φάσης απενεργοποιεί την PON1 που περιέχει και αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου της στο ήπαρ. Επίσης, άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα της HDL όπως η PAF-AH και η LCAT γίνονται δυσλειτουργικά ή μειώνονται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Έτσι η τροποποιημένη HDL σε μια φλεγμονώδη απόκριση χάνει την ικανότητα της να προστατεύσει τις LDL από την οξείδωση [171].

### **1.9.5 Θεραπείες που στοχεύουν την HDL**

Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις για την πρόληψη αθηροσκλήρωσης πρέπει να στοχεύουν όχι μόνο στην αύξηση των επιπέδων της HDL, αλλά να βελτιώνουν επίσης τις δομικές και λειτουργικές της ιδιότητες. Έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής θεραπευτικές προσεγγίσεις που αυξάνουν τα επίπεδα της HDL, αλλά υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον να μάθουμε αν επηρεάζουν και την ποιότητα της HDL.

### **1.9.5.1 Χορήγηση δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)**

Τα δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) είναι απλά σωματίδια HDL αποτελούμενα κυρίως από φωσφολιπίδια και απολιποπρωτεΐνες, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι εμπλουτισμένα και με χοληστερόλη (ενότητα 3.10). Έγχυση rHDL σε ανθρώπους, είχε σαν αποτέλεσμα την άμεση αύξηση των επιπέδων της HDL στην κυκλοφορία και προαγωγής της RCT [182]. Η rHDL προκαλεί μείωση στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, αναστολή της έκφρασης προσκολλητικών μορίων και σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας σε δυσλιπιδαιμικά άτομα. Παρ' όλα αυτά στην μελέτη ERASE (Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy) που πραγματοποιήθηκε παρουσιάστηκε μη σημαντική επίδραση της rHDL στο μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας όπως εκτιμήθηκε με χρήση ενδοαγγειακών υπερήχων (IVUS: IntraVascular UltraSound), αν και βοήθησε στον χαρακτηρισμό της πλάκας και στην εκτίμηση της αθηροσκλήρωσης στην ποσοτική στεφανιαία αγγειογραφία [183]. Επίσης σε χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων rHDL παρατηρήθηκαν ηπατικές δυσλειτουργίες. Συνεπώς και άλλες μελέτες είναι απαραίτητες για να εκτιμηθεί ο ρόλος της rHDL στην επιλεγμένη αυτή ομάδα.

### **1.9.5.2 Χορήγηση αποA-I**

Επίμυες αποA-I +/- ανέπτυξαν περισσότερες αθηρωματικές πλάκες συγκριτικά με φυσιολογικούς επίμυες, ενώ διαγονιδιακή υπερέκφραση ή ενδοφλέβια έγχυση αποA-I σε αυτά οδήγησε σε μείωση της αθηροσκλήρωσης [184]. Έτσι μελετήθηκε η χορήγηση αποA-I ως θεραπευτική προσέγγιση εκτενέστερα. Χρησιμοποιήθηκε η αποA-I Μιλάνο (αποA-I C173R), γνωστή για τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της. Ενδοφλέβια χορήγηση της ανασυνδυσμένης αποA-I Μιλάνο είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση του όγκου της αθηρωματικής πλάκας που είχε αναπτυχθεί σε κουνέλια με διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη [185]. Ο Li et al παρατήρησαν ότι ενδοφλέβια έγχυση αποA-I Μιλάνο σε αρουραίους είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και καθυστέρησης του σχηματισμού θρόμβου [186]. Επίσης, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο που τους είχε χορηγηθεί ενδοφλέβια λιπιδιωμένη αποA-I Μιλάνο. Ύστερα από 5 εβδομάδες χορήγησης αυτού του παρασκευάσματος σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της στεφανιαίας αθηρωματικής πλάκας όπως εκτιμήθηκε με χρήση IVUS [187].

### **1.9.5.3 Χορήγηση μιμητικών πεπτιδίων της αποΑ-I**

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά υποσχόμενες μελέτες με χρήση μιμητικών πεπτιδίων της αποΑ-I. Το D-4F, ένα στοματικά ενεργό πεππίδιο 18 αμινοξέων, παρουσίασε ικανότητα βελτίωσης των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των HDL σε μοντέλα ζώων. Το πεππίδιο αυτό προήγαγε το σχηματισμό σωματιδίων τύπου HDL που είχαν προ-βηλεκτροφορητική κινητικότητα και περιείχαν χοληστερόλη, αποΑ-I και παραοξονάση. Τα σωματίδια αυτά είχαν την ικανότητα να απομακρύνουν τα οξειδωμένα προϊόντα των λιπιδίων, να επάγουν εκροή χοληστερόλης και να αναστέλλουν την φλεγμονή στο ενδοαγγειακό τμήμα [188]. Μελέτη σε μαϊμούδες έδειξε βελτίωση της αντιφλεγμονώδους ικανότητας της HDL 2 h μετά την χορήγηση του πεπτιδίου. Τα επίπεδα των υδροπεροξειδίων των λιπιδίων μειώθηκαν τόσο στην HDL όσο και στην LDL [189]. Τέλος, αρχικές δοκιμές σε άτομα με ΣΝ έδειξαν ότι τα άτομα που τους χορηγήθηκε το D-4F παρουσίασαν βελτίωση της φλεγμονώδους κατάστασης της HDL, συγκριτικά με τα άτομα που έλαβαν placebo, ενώ τα επίπεδα της HDL-c παρέμειναν ανεπηρέαστα [190].

Ακόμα μια υποσχόμενη υπό ανάπτυξη ένωση είναι η D-[113-122]apoJ, ένα μιμητικό πεππίδιο αλληλουχίας 9 αμινοξέων ανάλογο της απολιποπρωτεΐνης J, που βελτίωσε σημαντικά τις φλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και ανέστειλε την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας σε μοντέλα ζώων [191].

### **1.9.5.4 Στοχεύοντας την HDL μέσω της Μυελούπεροξειδάσης (MPO)**

Η MPO έχει βρεθεί να στοχεύει επιλεκτικά την αποΑ-I και να την τροποποιεί οξειδωτικά. Προτείνεται ότι θα ήταν από κλινικής πλευράς πολύ ευεργετικό να αναπτυχθεί αναστολέας MPO. Το συγκεκριμένο παρασκεύασμα θα στοχεύει τις περιοχές της αποΑ-I, όπου και προσδένεται η MPO και θα παρεμποδίζονται έτσι οι δυσμενείς δράσεις της τελευταίας σε ασθενείς με ΣΝ, σε περιπτώσεις μολύνσεων και χρόνιων φλεγμονωδών διαδικασιών [192]

### **1.9.5.5 Αναστολείς CETP**

Γενετική ανεπάρκεια της CETP έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα της HDL-c, αποΑ-I και μειωμένα επίπεδα LDL-c [193]. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην ανάπτυξη αναστολέων του CETP. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση αναστολέων του CETP σε κουνέλια βελτιώνει την λειτουργικότητα της HDL και βελτιώνει την λιπιδική σύσταση της και πιο συγκεκριμένα μειώνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και αυξάνει το περιεχόμενο εστέρων χοληστερόλης, αποτελέσματα που συμφωνούν με φορείς

μεταλλάξεων του CETP [193,194]. Ο Kontush et al έδειξαν ότι ο αυξημένος λόγος CE/TG στην HDL βελτιώνει την αντιοξειδωτική της ικανότητα [195]. Πράγματι βρέθηκε πως οι αναστολείς του CETP μειώνουν τα επίπεδα oxLDL στην κυκλοφορία του αίματος στην οικογενή υποάλφαλιποπρωτεϊναιμία [196].

Ο αναστολέας της CETP, torcetrapib, αύξησε τα επίπεδα της HDL-c, της apoA-I και apoA-II, το μέγεθος της HDL και της LDL. Παρ'όλες αυτές τις θετικές του επιδράσεις στον μεταβολισμό, η μελέτη ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events) έδειξε αυξημένο κίνδυνο θανάτου και καρδιακών συμβάντων σε άτομα με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο και τους χορηγούνταν torcetrapib και atorvastatin [197]. Για αυτόν τον λόγο, η μελέτη τερματίστηκε πρόωρα. Η αύξηση καρδιαγγειακών συμβάντων και θνησιμότητας οφειλόταν σε κάποια συγκεκριμένη αρνητική αντίδραση του συγκεκριμένου φαρμάκου (off-target toxicity) ή στην αναστολής της CETP (on-target toxicity) [171].

Ο Forrest και οι συνεργάτες του το 2008 δημοσίευσαν πως η αύξηση της πίεσης στα άτομα που έλαβαν torcetrapib δεν οφείλονταν σε αναστολή της CETP, αλλά σε αυξημένα επίπεδα αλδοστερόνης της κυκλοφορίας και συνεπώς αύξηση της αρτηριακής πίεσης [198]. Οι ανεπιθύμητες επιδράσεις του torcetrapib δεν παρουσιάστηκαν σε άλλους αναστολείς του CETP. Δυο ακόμα αναστολείς του CETP που μελετήθηκαν είναι το dalcetrapib και το anacetrapib. Το dalcetrapib αυξάνει τα επίπεδα της HDL-c και της apoA-I και την δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων που σχετίζονται με την HDL (PON1, Lp-PLA2), αλλά φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα της LDL-c. Επίσης, η χορήγηση του dalcetrapib φαίνεται να μην επηρεάζει την ικανότητα της HDL να προάγει εκροή χοληστερόλης, ενώ η μελέτη dal-PLA-QUE έδειξε μια μείωση στις επιθετικές δομικές αγγειακές αλλαγές σε άτομα που προσλαμβάνουν το dalcetrapib [199]. Στη μελέτη DEFINE (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP inhibition with Anacetrapib), η χορήγηση anacetrapib είχε ως αποτέλεσμα την πολύ μεγάλη αύξηση των επιπέδων της HDL-c και σημαντική μείωση των επιπέδων της LDL-c [200]. Για να γίνει σύγκριση αυτών των δυο αναστολέων, ενώ η χορήγηση dalcetrapib οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της HDL-c κατά 31%, χορήγηση του anacetrapib αυξάνει τα επίπεδα της HDL-c κατά 138% και επιπλέον μειώνει την LDL-c κατά 36%. Θετικό είναι ότι και οι δυο αναστολείς δεν φαίνεται να έχουν κάποιες αρνητικές παρενέργειες [171].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) στο πλάσμα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, μιας ασθένειας που αποτελεί κύρια αιτία θανάτου στην Ευρώπη. Παράλληλα, μελέτες σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL εξαρτώνται περισσότερο από την ποιότητα της HDL, παρά από την ποσότητα της HDL-χοληστερόλης (HDLc) και ότι τα υψηλά επίπεδα HDLc πρέπει να συνοδεύονται από την ύπαρξη λειτουργικής HDL. Πολύ σημαντική λειτουργία της HDL είναι η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών. Επιπλέον, η HDL έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες και προστατεύει την ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του αίματος.

Η βιοσύνθεση της HDL αρχίζει εξωκυττάρια με την μεταφορά κυτταρικών φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 στην απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I). Η αποA-I λιπιδιώνεται περαιτέρω σταδιακά, μετατρέπεται σε δισκοειδές σωματίδιο και κατόπιν σε σφαιρικό HDL σωματίδιο ύστερα από την δράση του ενζύμου εστεροποίησης της χοληστερόλης LCAT. Τα σωματίδια της HDL αναδιαμορφώνονται στο πλάσμα από τον υποδοχέα της HDL SR-BI, ο οποίος μεσολαβεί στην επιλεκτική μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης από την HDL στο ήπαρ για απέκκριση. Αναδιαμόρφωση των σωματιδίων HDL πραγματοποιείται επίσης και από τον μεταφορέα στερολών ABCG1 ο οποίος προάγει την μεταφορά χοληστερόλης σε ώριμα σφαιρικά σωματίδια HDL, καθώς επίσης και από την υδρόλυση των λιπιδίων της HDL από διάφορες λιπάσες (LPL, HL, EL) και την ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ HDL και άλλων λιποπρωτεϊνών (VLDL, LDL) μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP) και της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP).

Μεταλλάξεις σε διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβολισμού της HDL μπορούν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές και να αναστείλουν τη βιοσύνθεση της HDL ή να οδηγήσουν στην παρουσία HDL με ανώμαλη σύσταση, σχήμα ή μέγεθος και/ή να επηρεάσουν τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL. Σκοπός της εργασίας ήταν να χαρακτηρίσουμε τις ιδιότητες της HDL σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, καθώς και να κατανοήσουμε μηχανισμούς με τους οποίους επηρεάζονται οι λειτουργίες της HDL.

Για να προσεγγίσουμε τους σκοπούς της εργασίας εξετάσαμε αν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες apoA-I, ABCA1 και LCAT, οι οποίες είναι οι κύριες πρωτεΐνες του μονοπατιού βιοσύνθεσης της HDL, επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και τους HDL υποπληθυσμούς που περιέχουν την apoA-I. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL με μια *in vitro* φθορισμομετρική μέθοδο και κατόπιν, για να διερευνηθεί που οφείλονται οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν, μετρήθηκαν τα επίπεδα προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων στην HDL, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων PON1, PAF-ακετυλοϋδρολάση και LCAT της HDL και μετρήθηκαν τα επίπεδα των προφλεγμονωδών PAF και SAA στην HDL. Επιπλέον, για να εξεταστεί αν επηρεάζεται η κατανομή των υποπληθυσμών της HDL και συνεπώς το μέγεθος και η σύσταση της HDL, αναλύθηκαν οι υποπληθυσμοί της HDL που περιέχουν apoA-I με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Επίσης, σε μια άλλη ομάδα ασθενών, με στεφανιαία νόσο (με χρόνια σταθερή μορφή ή μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο), εξετάσαμε αν επηρεάζονται οι αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις δράσεις καθώς και η ικανότητα της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων χοληστερόλης ABCA1 ή ABCG1.

Για να κατανοήσουμε το μονοπάτι με το οποίο η HDL οδηγεί σε απομάκρυνση περίσσειας χοληστερόλης από μακροφάγα μελετήσαμε την ικανότητα της apoA-I πάνω στην HDL να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1. Ο στόχος μας ήταν να αναγνωρίσουμε κρίσιμες περιοχές ή αμινοξέα της apoA-I, οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα της HDL να προάγει εκροή χοληστερόλης ή οξυστερόλης μέσω ABCG1 και παράλληλα να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους η HDL και ο ABCG1 προάγουν την απομάκρυνση στερολών από τα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν ανασυγκροτημένα σωματιδίων HDL (rHDL) που περιέχουν είτε την WT apoA-I ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I ελλειμματικές στο αμινο-τελικό άκρο ή/και στο καρβοξυ-τελικό άκρο, ελλειμματικές σε εσωτερικές περιοχές ή που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις. Για να εξεταστεί αν δομικές αλλαγές της apoA-I της rHDL επηρεάζουν την ικανότητα της rHDL να προκαλεί εκροή κυτταρικής στερόλης μέσω ABCG1, μετρήθηκε η εκροή χοληστερόλης και 7 κετο-χοληστερόλης από HEK293 κύτταρα και μακροφάγα μυός J774 που υπερεκφράζουν τον ABCG1 παρουσία rHDL που περιέχει την WT ή διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I. Επίσης, εξετάστηκε αν η πρωτεολυτική αποικοδόμηση της apoA-I της rHDL μπορεί να επηρεάσει την εκροή χοληστερόλης

μέσω ABCG1. Επιπλέον, μελετήθηκε η ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης κυττάρων HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1 παρουσία ή απουσία χοληστερόλης ή 7-κετοχοληστερόλης, ώστε να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και μεμβράνης που επηρεάζουν την ικανότητα των rHDL σωματιδίων να απομακρύνουν την κυτταρική χοληστερόλη ή 7-κετο-χοληστερόλη μέσω ABCG1.

Τέλος, για να εξετάσουμε αν η HDL μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις παρουσία του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1, μετρήθηκαν σε HEK293 κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 τα επίπεδα διάφορων κυτταροκινών παρουσία ή απουσία rHDL.

Απώτερος στόχος όλων των μελετών μας είναι να κατανοηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί που επηρεάζουν τα επίπεδα και τις (δυσ)λειτουργίες της HDL, έτσι ώστε να αναπτυχθούν νέοι τρόποι για τη διάγνωση, πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία των χαμηλών επιπέδων HDL και της αθηροσκλήρωσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

#### 3.1 Απομόνωση της HDL από τον ορό του αίματος [201]

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Ορός αίματος ανθρώπου, θειϊκή δεξτράνη [20 g/l, pH 7 (Sigma)] & Χλωριούχο Μαγνήσιο ( $MgCl_2$ ) [1 mol/l, pH 7 (Sigma)], τα οποία διατηρούνται στους 4°C, HCl, 37% (AppliChem), NaOH 10N (AppliChem). Ενεργό αντιδραστήριο [Ισοι όγκοι διαλυμάτων θειϊκής δεξτράνης και  $MgCl_2$  αναμιγνύονται για να φτιαχτεί ένα διάλυμα με συγκέντρωση θειϊκής δεξτράνης 10 g/l και  $MgCl_2$  500 mmol/l] Αυτό το αντιδραστήριο όταν προστεθεί στα δείγματα δίνει τελική συγκέντρωση θειϊκής δεξτράνης 0,9 g/l και  $MgCl_2$  45 mmol/l].

**Όργανα:** Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Biofuge Fresco, Heraus).

**Αρχή μεθόδου:** Οι μηχανισμοί της καθίζησης λιποπρωτεϊνών από πολυανιόντα και δισθενή κατιόντα δεν είναι γνωστοί με μεγάλη ακρίβεια. Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων των πολυανιόντων και των θετικά φορτισμένων ομάδων των πρωτεϊνών στις λιποπρωτεΐνες είναι πιθανότατα πολύ σημαντική. Επίσης, τα δισθενή ιόντα μετάλλων αλληλεπιδρούν με αρνητικά φορτισμένες ομάδες (πχ. φωσφολιπιδίων) πάνω στις λιποπρωτεΐνες ευνοώντας το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων. Οι μεγαλύτερες και πλούσιες σε λιπίδια λιποπρωτεΐνες, VLDL και LDL, σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα πιο γρήγορα σε σχέση με τις μικρότερες και πλουσιότερες σε πρωτεΐνη HDL. Τα αδιάλυτα σύμπλοκα καταβυθίζονται στη συνέχεια με φυγοκέντρωση.

**Πειραματική διαδικασία:** Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια αφήνονται εκτός ψυγείου πριν τη χρήση τους ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ενεργό αντιδραστήριο σε αναλογία όγκου 10:1. Το μείγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια το μείγμα φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο στους 4°C, για 40 min, στα 12500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και φυλάσσεται σε νέο σωληνάριο.



### 3.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των HDL με την δοκιμασία μέτρησης 2,7 διχλωροφθοροσκεΐνης (DCF) [202]

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1), οξειδωμένη μέσω αέρα LDL ανθρώπου [203], 2,7-διχλωρο-διϋδρο-φθοροσκεΐνο-διοξικός εστέρας (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes), CH<sub>3</sub>OH (Merck, Sigma), PBS 1x (LONZA, Whittaker), σωλήνες erpendorf, μαύρη πλάκα φθορισμού 96 θέσεων (Greiner Bio-one).

**Όργανα:** Επωαστήρας (Labtech), μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star Galaxy, bMG).

**Αρχή μεθόδου:** Οι ιδιότητες των HDL μετρώνται με *in vitro* μέθοδο που χρησιμοποιεί 2,7- διχλωροφθοροσκεΐνη (DCFH). Οι HDL ελέγχονται για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξειδωση της ανθρώπινης LDL ή να απενεργοποιούν τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια της LDL. Η DCFH όταν αλληλεπιδρά με προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων που περιέχονται στις LDL σχηματίζει 2,7- διχλωροφθοροσκεΐνη (DCF), που παράγει έντονο φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού που παράγεται μετράται σε φθορισμόμετρο. Οι φυσιολογικές HDL απενεργοποιούν τα οξειδωμένα λιπίδια των LDL εμποδίζοντας τα να αλληλεπιδράσουν με τη DCFH. Οι αντιοξειδωτικές/ αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των HDL προσδιορίζονται με τη μέτρηση στην αλλαγή της έντασης του φθορισμού από την οξειδωση της DCFH από την LDL παρουσία ή απουσία HDL.

**Πειραματική διαδικασία:** Το DCFH-DA διαλύεται σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL με ισχυρή ανάδευση για 2 min. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 20 min, έτσι ώστε να υδρολυθεί ο εστερικός δεσμός και να απελευθερωθεί η DCFH. Στη συνέχεια, μοιράζεται σε σωλήνες τύπου erpendorf και διαβιβάζεται ρεύμα N<sub>2</sub> για να αποφευχθεί περαιτέρω οξείδωση και φυλάσσεται στους -20°C σε σκοτεινό μέρος. Την ημέρα του πειράματος γίνεται αραίωση 1:10 με PBS (συγκέντρωση 0.2 mg/mL). Σε κάθε πηγάδι της πλάκας 96 θέσεων τοποθετείται ποσότητα HDL μάρτυρα ή ασθενούς ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 μg/mL χοληστερόλης και ποσότητα LDL ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100 μg/mL χοληστερόλης σε τελικό όγκο 100 μL. Ως τυφλό χρησιμοποιείται PBS. Η πλάκα επωάζεται στη συνέχεια στους 37°C, υπό ανακίνηση σε 80 rpm, για 1 h. Κατόπιν, προστίθονται σε κάθε πηγάδι 10 μL διαλύματος εργασίας DCFH (συγκέντρωση 0.2 mg/mL), αναδεύονται καλά και ακολουθεί επώαση για ακόμα 2 h, στους 37°C, σε 80

rpm. Τέλος, η ένταση του φθορισμού που παράγεται μετράται σε μετρητή πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (Διέγερση: 465 nm, Εκπομπή: 535 nm).

### **3.3 Προσδιορισμός της δραστικότητας ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF-AH: PAF-acetylhydrolase) στην HDL [204]**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker) [Dulbecco's PBS: KCl 2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l, NaCl 80 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  21,6 g/l, pH: 6,41-7,61], αλβουμίνη από ορό μοσχαριού (BSA) (Sigma), διάλυμα 1mg/mL BSA σε PBS1x pH 7.4, το οποίο διατηρείται στους  $-20^\circ\text{C}$ , διάλυμα PAF (Sigma)  $3,91 \times 10^{-3}$  M σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1 (v/v), 2- $[\text{}^3\text{H}$ -ακέτυλο]PAF (Perkin Elmer)  $3,7 \times 10^{-6}$  M, ειδικής δραστικότητας 27Ci/mmol, τελικής ραδιενεργούς συγκέντρωσης 0,1mCi/mL σε αιθανόλη, διάλυμα 2- $[\text{}^3\text{H}$ -ακέτυλο] PAF σε BSA/PBS 1mg/mL,  $2 \times 10^{-4}$  M [0,15mL 2- $[\text{}^3\text{H}$ -ακέτυλο]PAF  $3,7 \times 10^{-6}$  M και 0,46mL PAF  $3,91 \times 10^{-3}$  M αναμιγνύονται σε γυάλινο σωλήνα και εξατμίζονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Στο σωλήνα προστίθενται 9mL BSA/PBS 1mg/mL και αφήνονται σε υδρόλουτρο  $37^\circ\text{C}$  για 15 min τουλάχιστον υπό κίνηση για την πλήρη διαλυτοποίηση του PAF, ειδική δραστικότητα του διαλύματος είναι περίπου 18000cpm/nmol PAF. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ ], διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (TCA) (Merck) 20% w/v (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους  $-4^\circ\text{C}$ ), διάλυμα Hepes pH 7.4 [4.2 mmol/L Hepes, 137 mmol NaCl, 2.6 mmol/L KCl, 2 mmol EDTA], υγρό σπινθηρισμού [11g PPO, 0,2g POPOP, 1266mL τολουόλιο. Τα τρία αυτά συστατικά επωάζονται όλη τη νύχτα και την επόμενη μέρα προστίθενται 660 mL Triton X-100], πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου, πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).

**Όργανα:** Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

**Αρχή μεθόδου:** Ο PAF συνδεδεμένος με την BSA καταβυθίζεται πλήρως παρουσία TCA 10% (w/v), ενώ το απελευθερωμένο οξικό οξύ παραμένει στο υπερκείμενο. Επειδή το οξικό οξύ είναι ραδιενεργά επισημασμένο προσδιορίζεται η δραστικότητα PAF-AH μετρώντας τη ραδιενέργεια του υπερκείμενου με μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

**Πειραματική διαδικασία:** Σωλήνες erpendorf που περιέχουν 75μL TCA 20% (w/v) τοποθετούνται σε πάγο. Το διάλυμα  $[\text{}^3\text{H}]$ PAF/BSA/PBS και τα δείγματα τοποθετούνται σε υδρόλουτρο  $37^\circ\text{C}$  και επωάζονται για 10 min για να αποκτήσουν θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια τοποθετούνται στο υδρόλουτρο erpendorf με την ένδειξη M.E. (Μείγμα Επώασης). Στους σωλήνες αυτούς αναμιγνύονται ίσες ποσότητες (90μL) δείγματος

(16,66μL απομονωμένης HDL ανθρώπου αραιωμένη σε διάλυμα HEPES pH 7.4) και διαλύματος [<sup>3</sup>H]PAF/BSA/PBS. Η επώαση γίνεται στους 37°C για 10 min και κατόπιν 75μL από το M.E. μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχουν 75μL TCA 20% (w/v) και είναι τοποθετημένο στον πάγο, για να σταματήσει η αντίδραση. Σε άλλο σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται 37,5 μL διαλύματος [<sup>3</sup>H]PAF/BSA/PBS, 37,5 μL δείγματος και 75 μL TCA (δείγμα αναφοράς, δεν γίνεται η αντίδραση των 10 min). Οι σωλήνες επωάζονται για 30 min στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 4000 g για 10 min. Τέλος 75 μL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5 mL υγρό σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.18).

### **3.4 Προσδιορισμός δραστηριότητας παραοξνάσης του ενζύμου PON1 [204]**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1), παραοξόν 4200 mM (Διαιθυλ-π-νιτροφαινολοφωσφορικό οξύ, Sigma), χλωριούχο ασβέστιο (Ρυθμιστικό διάλυμα CaCl<sub>2</sub>, Sigma), Tris-HCl (AppliChem), ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης δραστηριότητας PON1 έναντι παραοξόν [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C], ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας παραοξνάσης [το διάλυμα αυτό προκύπτει με την ανάμιξη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης δραστηριότητας PON1 έναντι παραοξόν με αντίστοιχο όγκο παραοξόν ώστε η συγκέντρωση του παραοξόν να είναι 5,61 mM].

**Όργανα:** Επωαστήρας (Labtech), πλάκα 96 θέσεων (Greiner Bio-one), μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star Galaxy, BMG).

**Αρχή μεθόδου:** Η δραστηριότητα της PON1 προσδιορίζεται έχοντας υπόστρωμα το παραοξόν (δραστηριότητα παραοξνάσης). Το παραοξόν μετατρέπεται σε p-νιτροφαινόλη και διαιθυλοφωσφορικό οξύ. Έτσι, βρίσκοντας την ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που έχει παραχθεί, έχουμε υπολογίσει και την δραστηριότητα της PON1.

**Πειραματική διαδικασία:** Ο ρυθμός υδρόλυσης του παραοξόν προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης λόγω της παραγωγής p-νιτροφαινόλης στα 405 nm, τους 25°C για 10 min στο φασματοφωτόμετρο. Ο τελικός όγκος στον οποίο γίνεται η μέτρηση είναι 250 μL τα οποία περιέχουν 5 μL δείγματος και 245 μL ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας παραοξνάσης. Ο όγκος του δείγματος μπορεί να μεταβληθεί, ωστόσο ο τελικός όγκος θα πρέπει να παραμένει στα 250 μL. Η τελική συγκέντρωση του παραοξόν στο μίγμα της αντίδρασης είναι 5,5 mM. Στη συνέχεια,

υπολογίζεται η ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο:

$$C=A \cdot 10^{6*} / \epsilon \cdot b$$

Όπου,

C: Η συγκέντρωση της p-νιτροφαινόλης στο διάλυμα U/L

A: Η κλίση της απορρόφησης της αντίδρασης στα 405 nm σε σχέση με το χρόνο

$\epsilon$ : Συντελεστής μοριακής απόσβεσης,  $17000 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b: Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

d: Η αραίωση του δείγματος στο τελικό όγκο της αντίδρασης

Η δραστικότητα της PON1 εκφράζεται σε U/L ορού, ορίζοντας το 1 U ως την δραστικότητα που καταλύει το σχηματισμό 1  $\mu\text{mol}$  p-νιτροφαινόλης ανά λεπτό.

**3.5 Προσδιορισμός των επιπέδων του αμυλοειδούς A του ορού (SAA: Serum Amyloid A), του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF: Platelet Activating Factor) και της λιποπρωτεΐνης a [Lp(a): Lipoprotein (a)] στην HDL μέσω της ένζυμο-σύνδετης ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας τύπου «sandwich» (ELISA sandwich: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay sandwich)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1).

Kit Human SAA ELISA (Hycult biotech) που περιέχει: Πλάκα 96 πηγαδιών, επιστρωμένων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του SAA, αντίσωμα έναντι του SAA συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP: HorseRadish Peroxidase), διάλυμα έκπλυσης 20x, διάλυμα αραίωσης προτύπων, δειγμάτων και αντισώματος έναντι του SAA 5x, πρότυπο δείγματος λυοφιλοποιημένος [Τα πρότυπα που απαιτούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις 1:2, πυκνού διαλύματος SAA 200 ng/mL σε διάλυμα αραίωσης προτύπων, δειγμάτων και αντισώματος έναντι του SAA 1x], διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει 3,3',5,5'-τετρα-μέθυλο- βενζιδίνη (TMB) και  $\text{H}_2\text{O}_2$ , διάλυμα τερματισμού (οξαλικό οξύ).

Kit Human PAF ELISA (Cusabio) που περιέχει: Πλάκα 96 πηγαδιών, επιστρωμένων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PAF, αντίσωμα έναντι του PAF συζευγμένο με βιοτίνη, HRP συζευγμένη με αβιδίνη, διάλυμα έκπλυσης, διάλυμα αραίωσης προτύπων και δειγμάτων, διάλυμα αραίωσης του αντισώματος έναντι του PAF συζευγμένο με βιοτίνη, διάλυμα αραίωσης HRP συζευγμένης με αβιδίνη, πρότυπο δείγματος λυοφιλοποιημένο [Τα πρότυπα που απαιτούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις 1:2, πυκνού διαλύματος PAF 300 ng/mL σε διάλυμα αραίωσης προτύπων και δειγμάτων και αντισώματος έναντι του PAF 1x], διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει 3,3',5,5'-τετρα-μέθυλο-βενζιδίνη (TMB) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, διάλυμα τερματισμού (οξαλικό οξύ).

Kit Human Lp(a) ELISA (PROGEN Biotechnik) που περιέχει: Πλάκα 96 πηγαδιών, επιστρωμένων με πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι της Lp(a), πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Lp(a) αίγας συζευγμένο με HRP λυοφιλοποιημένο, 5 πρότυπα δείγματος λυοφιλοποιημένα, θετικό δείγμα ελέγχου λυοφιλοποιημένο, διάλυμα εργασίας 10x [γίνεται ανασύσταση όλων των λυοφιλοποιημένων συστατικών με διάλυμα εργασίας 1x], διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει 3,3',5,5'-τετρα-μέθυλο-βενζιδίνη (TMB) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, διάλυμα τερματισμού (οξαλικό οξύ).

**Όργανα:** Μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG), επωαστήρας (Labtech).

**Αρχή μεθόδου:** Η ELISA, κύριος εκπρόσωπος των ανοσοενζυμικών αναλυτικών μεθόδων, αποτελεί μία μέθοδο η οποία, στηρίζεται στην εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Κατά τη μέθοδο αυτή ένα ένζυμο που αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα και παράγει ένα έγχρωμο προϊόν συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα αντιγόνο-στόχο. Αν υπάρχει αντιγόνο τότε το σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου θα δεσμευθεί σε αυτό και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας έγχρωμο προϊόν. Η ELISA τύπου «sandwich» επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του αντιγόνου και η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου.

**Πειραματική διαδικασία:** Ο προσδιορισμό των επιπέδων του SAA, του PAF και της Lp(a) στην HDL πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ELISA τύπου «sandwich», με τα Kit Human SAA ELISA (Hycult biotech), Kit Human PAF ELISA (Cusabio) και Kit Human Lp(a) ELISA (PROGEN Biotechnik) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε κανονικοποίηση των επιπέδων του SAA ως προς τα επίπεδα της HDL-c (και SAA/HDL-c), καθώς μπορεί τα επίπεδα του SAA να ήταν

παρόμοια μεταξύ ατόμων με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL και ατόμων αναφοράς, αλλά επειδή τα άτομα αυτά έχουν λιγότερη HDL, θα μπορούσε να βρίσκεται σε μεγαλύτερη πυκνότητα στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων τους και να επηρεάζουν έτσι τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL. Η HDL απομονώθηκε από ορό αίματος ανθρώπων (ενότητα 3.1). Ο προσδιορισμός των επιπέδων του SAA, του PAF και της Lp(a) γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm. Η ένταση του παραγόμενου χρώματος (κίτρινο) είναι ανάλογη της ποσότητας του SAA, του PAF και της Lp(a). Η δεσμευμένη στο αντίσωμα HRP καταλύει την οξειδωση του TMB από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγώντας στην παραγωγή υδατοδιαλυτού μπλε προϊόντος. Μετά την προσθήκη του H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (που τερματίζει την παραπάνω οξειδοαναγωγική αντίδραση), το μπλε προϊόν μετατρέπεται σε κίτρινο υδατοδιαλυτό προϊόν με μέγιστο απορρόφησης στα 450nm.

### **3.6 Προσδιορισμός των επιπέδων μηλονικής-διαλδεΐδης (MDA: malondialdehyde)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1), Cayman's TBARS Assay kit που περιέχει: Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA: ThioBarbituric Acid), οξικό οξύ 5x, υπεροξειδίο του νατρίου (10x), πρότυπο μηλονικής-διαλδεΐδης, διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS), χρωμογόνο [530 mg TBA, 50 mL οξικό οξύ 1x, 50 mL υπεροξειδίο του νατρίου 1x (σταθερό για 24 h, ποσότητες για 24 δείγματα)], μαύρη πλάκα 96 πηγαδιών, πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου.

**Όργανα:** Μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG), ψυχόμενη φυγόκεντρος για πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου (Kubota 7780).

**Αρχή μεθόδου:** Η MDA είναι ένα φυσικά απαντώμενο προϊόν υπεροξειδωσης των λιπιδίων και χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικού στρες σε κύτταρα και ιστούς [205,206]. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων, τα οποία προέρχονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι ασταθή και διασπώνται για να σχηματίσουν μια σειρά από συμπλέγματα ενώσεων, τα οποία περιλαμβάνουν δραστικές καρβονυλικές ενώσεις, όπως είναι η MDA. Η MDA μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με το TBA σε υψηλή θερμοκρασία (90-100°C) σε όξινο περιβάλλον το οποίο είναι ανιχνεύσιμα χρωματομετρικά στα 530-540nm ή φθορισμομετρικά (Διέγερση: 465 nm, Εκπομπή: 535 nm), η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία.

**Πειραματική διαδικασία:** Όλα τα Αντιδραστήρια, εκτός των δειγμάτων, τα αφήνουμε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν το πείραμα. Προτιμήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων MDA φθορισμομετρικά λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της

μέτρησης. Ακολούθησε κανονικοποίηση των επιπέδων του MDA ως προς τα επίπεδα της HDL-c (και MDA/HDL-c), καθώς μπορεί τα επίπεδα του MDA να ήταν παρόμοια μεταξύ ατόμων με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL και ατόμων αναφοράς, αλλά επειδή τα άτομα αυτά έχουν λιγότερη HDL, θα μπορούσε να βρίσκεται σε μεγαλύτερη πυκνότητα στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων τους και να επηρεάζουν έτσι τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL. Διαλύουμε 25  $\mu\text{L}$  του πρότυπου MDA με 975  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , για να πάρουμε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 12,5  $\mu\text{M}$ . Από αυτό θα παρασκευαστούν τα πρότυπα που απαιτούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, ξεκινώντας από 5  $\mu\text{M}$  και καταλήγοντας, με διαδοχικές αραιώσεις 1:2 με  $\text{H}_2\text{O}$ , σε συγκέντρωση 0,0625  $\mu\text{M}$ . Ως τυφλό χρησιμοποιείται το  $\text{H}_2\text{O}$ . Μεταφέρουμε 100  $\mu\text{L}$  δείγματος ή προτύπων σε πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου χωρητικότητας τουλάχιστον 5 mL. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος SDS και, αφού το ανακαινήσουμε, 4 mL χρωμογόνου με πίεση προς τον πάτο του σωληναρίου. Αφού κλείσουμε τα καπάκια, μεταφέρουμε άμεσα τα δείγματα μας σε υδατόλουτρο στους 90-100°C και επωάζουμε τα δείγματα μας για 1 h. Ακολουθεί επώαση για 10 min στον πάγο, για να σταματήσει η αντίδραση, και φυγοκέντρωση για 10 min στα 1600 g στους 4°C. Τα δείγματα είναι σταθερά για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εντός αυτού του χρονικού διαστήματος, 150  $\mu\text{L}$  από κάθε σωληνάριο μεταφέρεται σε μαύρη πλάκα 96 πηγαδιών και η ένταση του φθορισμού που παράγεται μετράται σε μετρητή πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Διέγερση: 530 nm, Εκπομπή: 550 nm).

### **3.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) [207] και μη αποδιατακτικές συνθήκες**

**Αντιδραστήρια-υλικά:**  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Merck), Tris (Appllichem), διάλυμα ακρυλαμιδίου [N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου 37,5:1, διάλυμα 30% (w/v)] (Biorad), ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl A [1,5 M, pH 8,8], ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl B [1 M, pH 6,8], διάλυμα 10% w/v δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) (Sigma), διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (APS) (Sigma) [Φυλάσσεται στους -20°C], τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) (Sigma), κυανούν της βρωμοφαινόλης, πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (11-250 και 7-175 kDa), γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10x8 cm, ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) για την ρύθμιση του πάχους της πηκτής (1,5 mm), ειδική χτένα για τον σχηματισμό των πηγαδιών της πηκτής.

Για αποδιατακτικές συνθήκες: διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (separating gel) 10%, 13% και 15% [3,3 / 4,3 / 4,95 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου, 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl A, 0,1 mL 10% w/v SDS και 4 / 3 / 2,35 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος APS 10%

και 8  $\mu\text{L}$  TEMED], διάλυμα πηκτής επιστοιβάσης (stacking gel) 5% [830  $\mu\text{L}$  διαλύματος ακρυλαμιδίου, 630  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl B, 50 $\mu\text{L}$  διαλύματος SDS 10% και 3,4 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος APS 10% και 10  $\mu\text{L}$  TEMED], διάλυμα λύσης και διάλυμα δείγματος για τις φωσφοπρωτεΐνες είναι το 1X SDS Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 at 25°C), 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης + κοκτέιλ αναστολέων φωσφατασών και πρωτεασών(Roche)], διάλυμα λύση RIPA για τον ABCG1 [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% deoxycholate και αναστολείς πρωτεασών(Roche)], 10x διάλυμα ηλεκτροφόρησης [30 g Tris, 143,5 g γλυκίνη, 10 g SDS. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στο 1 L με  $\text{H}_2\text{O}$ ].

Για μη αποδιατακτικές συνθήκες: πηκτές διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20%, ειδικό 4x διάλυμα δείγματος [2,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl B, 4 mL γλυκερόλη και 1 mL κυανού της βρωμοφαινόλης 1%. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στα 10 mL με  $\text{H}_2\text{O}$ ], 12,5x ειδικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης [30g Tris, 144 g γλυκίνη στα 800 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ].

**Όργανα:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-protean II, Biorad, τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

**Αρχή Μεθόδου:** Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μέσα σε μια μήτρα πηκτής πολυακρυλαμιδίου με βάση το μέγεθος. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται μετά από συμπολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου με το αντιδραστήριο διασταύρωσης N,N'-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 καταλύτη TEMED. 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 πρωτεΐνες, αποδίδοντας έτσι ένα αρνητικό φορτίο στο μόριο τους. Έχοντας αυτό το αρνητικό φορτίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο με βάση τη μοριακή τους μάζα. Παρασκευάζονται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου: η πρώτη είναι πηκτή επιστοιβάσης και η άλλη πηκτή διαχωρισμού. Η διαφορά αυτών έγκειται στο διαφορετικό μέγεθος πόρων της πηκτής, καθώς και στη διαφορά pH και ιοντικής ισχύος. Η πηκτή επιστοιβάσης διευκολύνει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μία στενή περιοχή, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη είσοδο όλων των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.



**Πειραματική διαδικασία:** 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 1 cm 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 30-40 min. Η πηκτή διαχωρισμού καλύπτεται με H<sub>2</sub>O για να αποφευχθούν τυχόν φουσκάλες αέρα. Στη συνέχεια (αφού αφαιρεθεί το H<sub>2</sub>O) προστίθεται η πηκτή επιστοίβασης μέχρι πάνω και τοποθετείται η χτένα. Μετά από 30 min πολυμερισμού απομακρύνεται η χτένα και ξεπλένονται τα πηγάδια που έχουν σχηματιστεί με H<sub>2</sub>O. Τα πηγάδια είναι ο χώρος τοποθέτησης των δειγμάτων.

Όσον αφορά την παρασκευή πηκτών διαβαθμισμένης πυκνότητας, για 12 πηκτές απαιτούνται περίπου 110 mL διαλύματος. Ο ολικός όγκος χωρίζεται σε δύο ίσους όγκους, δηλαδή 55 mL, που τοποθετούνται σε κάθε θάλαμο της συσκευής βαθμίδωσης. Στο θάλαμο A τοποθετείται το πυκνό διάλυμα, ενώ στο θάλαμο B το αραιό. Η σύσταση των δύο διαλυμάτων: (Πυκνό 20%: 36,7 mL διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%, 13,8 mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl A, 4,5 mL H<sub>2</sub>O, 275 μL APS 10%, 27,5 μL TEMED. Αραιό 4%: 7,3 mL διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%, 13,8 mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl A, 34 mL H<sub>2</sub>O, 275 μL APS 10%, 27,5 μL TEMED). Η συσκευή βαθμίδωσης τοποθετείται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και στον θάλαμο B τοποθετείται ένα μαγνήτης. Καλό είναι να τοποθετείται και στον θάλαμο A ένας πάρα πολύ μικρός μαγνήτης. Ανοίγονται προσεκτικά οι βαλβίδες που κρατούν τους δυο θαλάμους κλειστούς και το περιεχόμενο τους έρχεται σε επαφή στο θάλαμο B. Χρειάζεται προσοχή, έτσι ώστε η ροή να μην είναι πολύ γρήγορη και να υπάρχει χρόνος να γίνει καλή ανάμιξη των δυο διαλυμάτων στο θάλαμο B. Το μείγμα της πηκτής ρέει από τον θάλαμο B προς τον θάλαμο παρασκευής πηκτών, όπου και σχηματίζεται η διαβάθμιση των πηκτών. Οι πηκτές χρειάζονται περίπου 1 h προκειμένου να πήξουν. Έπειτα τοποθετούνται και φυλάσσονται στους 4<sup>0</sup>C για περίπου 2-3 εβδομάδες.

Τα δείγματα, στην περίπτωση ανάλυσης φωσφοπρωτεϊνών, όπου το διάλυμα λύσης αποτελεί και το διάλυμα δείγματος, εισάγονται σε θάλαμο υπερήχων, 15 παλμοί διάρκειας 1 sec με ένταση 30% με 1 sec παύση μεταξύ δυο παλμών. Στην συνέχεια, θερμαίνονται για 5 min στους 100<sup>0</sup>C (τα rHDL σωματίδια δεν εισάγονται σε θάλαμο υπερήχων και όταν αναλύονται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, αφού προστεθεί το

ειδικό διάλυμα δείγματος, δεν θερμαίνονται). Τέλος, αφού προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης στην άνω και στην κάτω μονάδα της συσκευής, φορτώνονται τα δείγματα στα πηγάδια της πηκτής. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 100V και διαρκεί 1,5 h περίπου. Στην περίπτωση ανάλυσης των φωσφοπρωτεϊνών και των rHDL σωματιδίων όταν αναλύονται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 2,5 h περίπου.

### **3.8 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων [208]**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Ορός αίματος ανθρώπου, CH<sub>3</sub>OH (Merck), tris (AppliChem), tricine (N-[τρις(υδροξυμεθυλο) μεθυλο]-γλυκίνη) (Sigma), γαλακτικό ασβέστιο (Fluka), νατραζίδιο (Riedel de Haen), διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης [3,03 g Tris, 4,48 g Tricine, 0,92 g γαλακτικό ασβέστιο και 0,5 g νατραζίδιο σε 1 L κρύο H<sub>2</sub>O (4 °C), pH 8,6. Παρασκευάζεται πάντα την ημέρα του πειράματος], αγαρόζη (Fluka, Sigma), διάλυμα πηκτής αγαρόζης 0,75%, BSA (Sigma), διάλυμα BSA 20%, γλυκερόλη (Sigma), κυανούν της βρωμοφαινόλης, διάλυμα ακρυλαμιδίου [N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου 37,5:1, διάλυμα 30% (w/v) (Biorad)], ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl A [1,5 M, pH 8,8], ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβασης Tris-HCl B [1 M, pH 6,8], διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου 10% (APS) (Sigma) [φυλάσσεται στους -20°C], τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) (Sigma), διάλυμα πηκτής επιστοίβασης (stacking gel) 3% [500 μL διαλύματος ακρυλαμιδίου, 0,625 mL ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβασης, 3,875 mL H<sub>2</sub>O, 85μL APS 10% και 8,5 μL TEMED], Stock διάλυμα ηλεκτροφόρησης 12,5x [30 g Tris, 144 g γλυκίνη στα 800 mL H<sub>2</sub>O], διάλυμα ηλεκτροφόρησης 2<sup>ης</sup> διάστασης [80 mL διάλυμα ηλεκτροφόρησης 12,5x και 920 mL H<sub>2</sub>O], πηκτική διαχωρισμού (separating gel) διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20%.

Παρασκευή δειγμάτων: Δείγμα BSA: 1μL BSA 20%, 6 μL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης, 2 μL 50% γλυκερόλη, 1 μL 1% κυανούν της βρωμοφαινόλης. Δείγμα ορού: 0,7-2μL ορού, 5-6,3μL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης, 2 μL 50% γλυκερόλη, 1 μL 1% κυανούν της βρωμοφαινόλης. Από δείγματα με χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης αποΑ-I χρησιμοποιήθηκαν 2μL. Για όλα τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν 0,7 μL. Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος τροποποιείται έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 μL

Παρασκευή των πηκτών διαβαθμιζόμενης πυκνότητας: (ενότητα 3.7).

**Όργανα:** θάλαμος παρασκευής πηκτών Mini Protean 3 Multi Casting Chamber (Biorad), συσκευή βαθμίδωσης Hoefler SG gradient maker (General Electric), γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10x8 cm, ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) για τη ρύθμιση το πάχους της πηκτής (1,5 mm / 1<sup>η</sup> διάσταση - 1mm / 2<sup>η</sup> διάσταση), ειδική χτένα για τον σχηματισμό των φρεατίων της πηκτής, συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-protean II, Biorad, τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

**Αρχή μεθόδου:** Η ηλεκτροφόρηση των HDL σε πηκτή αгарόζης – 1<sup>η</sup> διάσταση [209] διαχωρίζει τις HDL με βάση το φορτίο τους. Αυτός ο διαχωρισμός διακρίνει 3 υποπληθυσμούς HDL που ονομάζονται προ-β, α και προ-α, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα (πιο αργή, ίδια, πιο γρήγορη σε σχέση με την αλβουμίνη). Η ηλεκτροφόρηση των διαχωρισμένων σε πηκτή αгарόζης HDL σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας-2<sup>η</sup> διάσταση, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες [210,211], διαχωρίζει τις προ-β-HDL και α-HDL, σε επιπλέον υποπληθυσμούς.

**Πειραματική διαδικασία:** Αρχικά, ετοιμάζεται το sandwich ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης που δημιουργείται μετά την τοποθέτηση ειδικών διαχωριστικών ταινιών ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες. Στη συνέχεια τοποθετείται το μείγμα της πηκτής αгарόζης 0,75% στον ενδιάμεσο χώρο των δυο πλακών του sandwich ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης και αφού τοποθετηθεί ειδική χτένα (ενότητα 3.7), αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 min. Κατόπιν, απομακρύνεται η χτένα και ξεπλένονται τα πηγάδια που έχουν σχηματιστεί με νερό. Στη συνέχεια, τα δείγματα του ορού και το δείγμα BSA τοποθετούνται στην πηκτή. Τέλος, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1<sup>ης</sup> διάστασης στην άνω και κάτω μονάδα της συσκευής. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 100V και διαρκεί περίπου 1 h (έως ότου η μπάντα της BSA να μεταναστεύσει 3 cm και η μπάντα της βρωμοφαινόλης 5 cm από την κορυφή). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται από το μέσο κάθε διαχωρισμένου δείγματος μία λεπτή λωρίδα, η οποία ξεκινά από το σημείο ένθεσης του δείγματος και καταλήγει στο απέναντι άκρο της πηκτής. Αυτή τοποθετείται στο πάνω μέρος πηκτής επιστοίβασης (περιστροφή της μπάντας κατά 90<sup>ο</sup>), που παρασκευάζεται φρέσκια κάθε φορά και βρίσκεται πάνω από την πηκτή διαχωρισμού διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20%. Η λωρίδα της πηκτής αгарόζης από την 1<sup>η</sup> διάσταση σταθεροποιείται πάνω από την πηκτή επιστοίβασης της 2<sup>η</sup> διάστασης με την προσθήκη μικρής ποσότητας αгарόζης 0,75% που πήζει πολύ γρήγορα. Τελικά, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα

ηλεκτροφόρησης 2<sup>η</sup> διάστασης στην άνω και στην κάτω μονάδα της συσκευής. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 100V και διαρκεί 2,5 h.

### **3.9 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά western**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** PBS 10x (LONZA, Whittaker) ή TBS 10x [Tris Buffered Saline, 24,2 g Tris base (Sigma), 80 g NaCl (Applichem), pH 7.6 (φωσφοπρωτεΐνες)], CH<sub>3</sub>OH (Merck), Tris (AppliChem), διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 12,5x [30g Tris, 144 g γλυκίνη στα 800 mL H<sub>2</sub>O], διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) [1x: 80 mL διαλύματος μεταφοράς 12,5x, 200 mL CH<sub>3</sub>OH και 720 mL H<sub>2</sub>O], άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait), tween-20 (Merck), διάλυμα πλύσης (PBS/Tween-20 0,1%) ή (TBS/Tween-20 0,1% (φωσφοπρωτεΐνες)), διάλυμα blocking [5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη σε διάλυμα πλύσης], πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την αποΑ-I ανθρώπου, μυός και αρουραίου, FL267 (Santa Cruz Biotechnology), πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την ABCG1 ανθρώπου (NOVUS BIOLOGICALS) (NB400), αντίσωμα για την ανοσοσφαιρίνη IgG κουνελιού συνδεδεμένο με HRP (Chemicon), μονοκλωνικό αντίσωμα μυός για την αποΑ-I ανθρώπου 5F6 (Πανεπιστήμιο Οπτάβας, Ινστιτούτο Καρδιολογίας, Καναδάς), πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας για την αποΑ-I ανθρώπου (AB 740) (Chemicon), αντίσωμα για την ανοσοσφαιρίνη IgG αίγας συνδεδεμένο με HRP, (Santa Cruz Biotechnology), μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την φωσφο-STAT3 ανθρώπου, μυός και αρουραίου D3A7 (Cell signaling Technology), μονοκλωνικό αντίσωμα μυός για την STAT3 ανθρώπου, μυός και αρουραίου 124H6 (Cell signaling Technology), αντίσωμα για την ανοσοσφαιρίνη IgG μυός συνδεδεμένο με HRP (Novagen), πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την ετικέτα 6 αμινοξέων ιστιδίνης συνδεδεμένο με HRP (Abcam). Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL), (Pierce), χαρτί Whatman (Biorad), μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Corp).

**Όργανα:** Μηχάνημα εμφάνισης (LUMINESCENT IMAGE ANALYZER, LAS 4000, FUJIFILM), συσκευή μεταφοράς (Biorad), τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

**Αρχή της μεθόδου:** Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και κατόπιν μεταφέρονται σε μεμβράνη πολυμερούς (πχ. νιτροκυτταρίνης) που τους επιτρέπει να συνδέονται με το αντίσωμα που προστίθεται στη συνέχεια και είναι ειδικό για την υπό αναζήτηση πρωτεΐνη. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός 2<sup>ου</sup> αντισώματος ειδικού για το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα. Ένα ένζυμο δεσμευμένο πάνω στο 2<sup>ο</sup> αντίσωμα οδηγεί, με την

προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος στο σχηματισμό, έγχρωμου προϊόντος ή προϊόντος που εκπέμπει χημειοφωταύγεια ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί. Το ποσό του 2<sup>ου</sup> αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια είναι ανάλογο με την ποσότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα.

**Πειραματική διαδικασία:** Δείγματα ορού ασθενών και μαρτύρων που έχουν υποβληθεί σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (ενότητα 3.8) είτε δείγματα κυτταρικού λύματος ή ανασυγκροτημένα σωματίδια HDL (rHDL: reconstituted HDL) έπειτα από ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης (ενότητα 3.7) υποβάλλονται σε ανοσοαποτύπωση. Πιο συγκεκριμένα, αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση (ενότητα 3.7, 3.8), ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για τον λόγο αυτό ένα λεπτό σφουγγάρι και ένα κομμάτι χαρτιού whatman κομμένα στο μέγεθος της πηκτής τοποθετούνται στην ειδική συσκευή μεταφοράς αφού πρώτα έχουν διαβραχεί με το διάλυμα μεταφοράς 1x. Πάνω τους τοποθετείται η πηκτή και από πάνω η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (αφού έχει πρώτα διαβραχεί και αυτή με το ίδιο διάλυμα). Τέλος, τοποθετούνται άλλο ένα κομμάτι βρεγμένου χαρτιού Whatman και ενός ακόμα σφουγγαριού και αφαιρούνται με προσοχή όλες οι φυσαλίδες μεταξύ όλων αυτών των στρώσεων (όπου υπάρχουν φυσαλίδες δεν θα γίνει επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών). Η συσκευή κλείνει (δημιουργώντας έτσι ένα είδος «sandwich») και αφήνεται σε λειτουργία είτε στα 100 V (ύστερα από ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων ή ανάλυση φωσφατασών) είτε στα 120 V (στις υπόλοιπες περιπτώσεις) για 2 h (3 h για ανάλυση φωσφατασών). Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε κατάλληλο πλαστικό δοχείο επωάζεται με διάλυμα blocking για περίπου 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα πλύσης 3 φορές για 10 min. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σακουλάκι και προστίθεται το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα που είναι ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη [πολυκλωνικά αντισώματα για την ανθρώπινη αποΑ-I AB 740 ή FL-267 σε αραιώση 1:2000 ή 1:200, μονοκλωνικό αντίσωμα για την αποΑ-I ανθρώπου 5F6 σε αραιώση 1:000, πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την ABCG1 ανθρώπου σε αραιώση 1:500, μονοκλωνικό αντίσωμα για την φωσφο-STAT3 ανθρώπου D3A7 σε αραιώση 1:1000, μονοκλωνικό αντίσωμα για την STAT3 ανθρώπου 124H6 σε αραιώση 1:1000, μονοκλωνικό αντίσωμα για την β-τουμπουλίνη ανθρώπου T4026 σε αραιώση 1:1000] σε διάλυμα blocking (εκτός της φωσφο-STAT3 όπου το διάλυμα του αντισώματος είναι 5% BSA σε διάλυμα πλύσης). Πριν σφραγιστεί το σακουλάκι απομακρύνονται με προσοχή όλες οι φυσαλίδες ούτως ώστε το αντίσωμα να έρχεται σε επαφή με όλη την επιφάνεια της μεμβράνης. Το σακουλάκι τεντώνεται καλά πάνω σε γυάλινη πλάκα με την βοήθεια ταινίας, ώστε να κυκλοφορεί το διάλυμα ελεύθερο, και

αφήνεται στους 37 °C για 1 h υπό ανακίνηση (γίνεται ολονύχτια επώαση στους 4 °C, στην περίπτωση φωσφο-STAT3 και STAT3). Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές με διάλυμα πλύσης για 10 min και τοποθετείται σε καθαρό σακουλάκι με το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα [το αντίσωμα για την IgG, αίγας ή κουνελιού σε αραιώση 1:1000 και μύς αραιώση 1:5000] σε διάλυμα blocking (εκτός του αντισώματος που είναι ειδικό για την φωσφο-STAT3 όπου το διάλυμα του αντισώματος είναι 5% BSA σε διάλυμα πλύσης) και αφήνονται υπό ανάδευση στους 37 °C για 1 h. Η μεμβράνη τέλος, εκπλένεται 3 φορές από 10 min με διάλυμα πλυσίματος. Η μεμβράνη επωάζεται με το μίγμα διαλυμάτων του kit της χημειοφωταύγειας, τοποθετείται στο μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας και συλλέγονται φωτογραφίες της μεμβράνης στον υπολογιστή.

### **3.10 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL: reconstituted HDL) [212]**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** L-α φωσφατιδυλοχολίνη αυγού (egg-PC, Sigma) [20mg egg-PC/mL CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2:1)], σφιγγομυελίνη από εγκέφαλο βοός (Sigma) [2mg/mL CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2:1)] (sigma), χολικό νάτριο (Sigma), 30mg/mL SB (βλέπε παρακάτω), αποA-I, χοληστερόλη (Sigma) [2 mg/mL σε CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2:1)], χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub> Merck), μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH, Merck), τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, Applichem), NaCl (Sigma), EDTA (Riedel de-Haën), ρυθμιστικό Διάλυμα (Salt Buffer:SB) 10x [100 mM Tris-HCl, 1,5M NaCl, 0,1% EDTA, pH 8], PBS 10x (LONZA, Whittaker).

**Όργανα:** Κυκλο-αναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific Industries), οβίδα N<sub>2</sub>, μεμβράνη διαπίδυσης 12 kDa (Sigma).

**Αρχή μεθόδου:** Η μέθοδος της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου διευκολύνει την αλληλεπίδραση της αποA-I 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 μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων και χολικού νατρίου είναι 1:1 (όπως στη μέθοδο που χρησιμοποιείται) τότε το μίγμα λιπιδίων-χολικού νατρίου σχηματίζει δισκοειδείς διπλοστιβάδες λιπιδίων και χολικού νατρίου που σταθεροποιούνται με την δακτυλιοειδή τοποθέτηση μορίων χολικού νατρίου γύρω από τη διπλοστιβάδα. Με τη διαπίδυση επιτυγχάνεται η σταδιακή απομάκρυνση του χολικού νατρίου από τα λιπιδίδια και η αντικατάστασή του με την αποA-I προς σχηματισμό δισκοειδών μυκηλιακών συμπλόκων.

**Πειραματική διαδικασία:** Τα σωματίδια της rHDL παρασκευάζονται με βάση την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, με μερικές μικρές τροποποιήσεις

[212,213]. Στα περισσότερα πειράματα, η μοριακή αναλογία (egg-PC:σφιγγομυελίνη:χοληστερόλη:αποΑ-I:χολικό νάτριο) στα σωματίδια rHDL είναι 100:0:10:1:100, ενώ παρασκευάστηκαν και σωματίδια με μοριακή αναλογία 80:0:10:1:100 και 100:10:10:1:100. Σε ένα τυπικό πείραμα για την παρασκευή σωματιδίων με μοριακή αναλογία POPC:χοληστερόλη:αποΑ-I:χολικό νάτριο 100:10:1:100, χρησιμοποιούνται 0.14 g χοληστερόλης και 2.71 g egg PC, τα οποία αναμιγνύονται σε γυάλινο σωληνάριο με ήπια ανάδευση και ακολούθως ξηραίνονται υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub>. Τα ξηραμένα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 250 μL διαλύματος SB 1x, με ήπια ανάδευση (vortex) για περίπου 30 sec και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 30 sec. Η διαδικασία ανάδευσης σε κυκλο-αναδευτήρα για 30 sec και παραμονής στους 4°C για άλλα 30 sec επαναλαμβάνεται μέχρι την ομογενοποίηση των λιπιδίων (συνολικό διάστημα περίπου 1 h). Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα χολικού νατρίου 51 μL και ακολουθεί επώαση του μείγματος 1 h στους 4°C. Στο τελικό στάδιο, γίνεται προσθήκη 1 mg αποΑ-I, διαλυμένη σε SB, και η επώαση συνεχίζεται για 1 h ακόμη. Κατόπιν, γίνεται διαπίδυση των δειγμάτων σε 100 mL διαλύματος SB 1x, στους 4°C, με χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας <12-14 kDa. Η διαπίδυση γίνεται για δύο ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων γίνεται 3 με 4 φορές αλλαγή του SB. Στα σωματίδια διαβιβάζεται αέριο N<sub>2</sub> για να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπιδίων και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C (οι ποσότητες egg PC, χοληστερόλης και χολικού νατρίου που περιγράφονται πως χρησιμοποιήθηκαν αφορούν την αποΑ-I αγρίου τύπου ή αποΑ-I που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις. Για τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I (ελλειμματικές στο αμινο-τελικό άκρο ή/και καρβοξυ-τελικό άκρο, ελλειμματικές σε εσωτερικές περιοχές) απαιτούνται κάποιες τροποποιήσεις, δεδομένου ότι διαφέρουν στο μοριακό τους βάρος. Επίσης, όταν στα rHDL σωματίδια θέλουμε την παρουσία σφιγγομυελίνης, τότε 0,28 g από αυτή προστίθεται μαζί με την χοληστερόλης και την egg PC.

### 3.11 Προσδιορισμός Φωσφολιπιδίων

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 3.1) ή δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) (ενότητα 3.10), Kit (Sentinel Diagnostics) που περιέχει:

Αντιδραστήριο R1a: N-[Τρι(υδροξυμεθυλ)μεθυλ]-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ (TES) 50 mmol/l pH 7,6 4-ύδροξυβενζοϊκό οξύ 12 mmol/l, EDTA 1,3 mmol/l, νατραζίδιο < 0,1%, Επιφανειοδραστικοί παράγοντες.

Αντιδραστήριο R1b (Λυοφιλοποιημένο): TES 50 mmol/l, Φωσφολιπάση D >1500 U/l, Οξειδάση της χολίνης >7500 U/mL, Υπεροξειδάση >7000 U/mL, 4-Αμινοαντιπυρίνη 1,2 mmol/l.

Διάλυμα R1: 10 mL αντιδραστηρίου R1a προστίθονται σε 1 φιαλίδιο αντιδραστηρίου R1b. Το μείγμα αφήνεται για 10 min και στη συνέχεια γίνεται ήπια ανακίνησή του.

Πρότυπο διάλυμα: διάλυμα φωσφολιπιδίων (300 mg/dl), νατραζίδιο <0,1%, Επιφανειοδραστικοί παράγοντες.

**Όργανα:** Πλάκα 96 θέσεων (Greiner Bio-one), μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG).

**Αρχή μεθόδου:** Τα φωσφολιπίδια προσδιορίζονται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, ως εξής: τα φωσφολιπίδια (λεκιθίνη, σφιγγομυελίνη, λυσολεκιθίνη) υδρολύονται παρουσία της φωσφολιπάσης D σε χολίνη και φωσφατιδικό οξύ ή N-άκυλο-σφιγγο-φωσφορικό οξύ ή λυσοφωσφατιδικό, αντίστοιχα. Η χολίνη οξειδώνεται από την οξειδάση της χολίνης σε βεταΐνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τελικά, το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδράει με την 4-αμινοαντιπυρίνη και το 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.

**Πειραματική διαδικασία:** Τα αντιδραστήρια πριν την έναρξη της διαδικασίας πρέπει να είναι στους 37°C. Σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις του πρότυπου δείγματος με PBS (τελική ποσότητα σε κάθε θέση 45, 30, 12 και 6 μg) και κατόπιν 5 μL δείγματος και κατάλληλος όγκος προτύπου σε τελικό όγκο 15 μL PBS 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.

### 3.12 Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) (ενότητα 3.10),

Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός (Data-Cal της Thermo): Έχει περιεκτικότητα σε χοληστερόλη 255 mg/dL: είναι ένας σταθερός, λυοφιλοποιημένος ορός ζωικής προέλευσης (βοείας), στον οποίο έχουν προστεθεί διάφορα συστατικά ώστε να δώσουν τιμές στόχους στο υψηλό φυσιολογικό εύρος. Η ανασύσταση του βαθμονομητή γίνεται με την προσθήκη 3 mL H<sub>2</sub>O. Το περιεχόμενο διαλύεται πλήρως μέσα σε 30 min με περιστασιακή ήπια ανακίνηση, αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού. Για την κατασκευή



της πρότυπης καμπύλης ο Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός αραιώνεται σε 50mg/dL με PBS.

Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου (Data-Trol της Thermo): παρασκευάζεται από ανθρώπινο ορό στον οποίο έχουν προστεθεί ανθρώπινα και μη- ανθρώπινα ένζυμα, μη πρωτεϊνικά συστατικά και βακτηριοστατικοί παράγοντες. Χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας των διαδικασιών των εξετάσεων κλινικής χημείας. Η ανασύσταση του βαθμονομητή γίνεται με την προσθήκη 5 mL H<sub>2</sub>O. Το περιεχόμενο διαλύεται πλήρως μέσα σε 30 min με περιστασιακή ήπια ανακίνηση, αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού. Η αναμενόμενη μέση τιμή χοληστερόλης είναι 152 mg/dl, ενώ το εύρος διακύμανσης 137-167 mg/dl.

Αντιδραστήριο μέτρησης χοληστερόλης (Infinity της Thermo): Οξειδάση χοληστερόλης >200U/l, εστεράση χοληστερόλης >500U/l, Υπεροξειδάση >300U/l, 4-Αμινοαντιπυρίνη 0,25 mmol/l, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ 10 mmol/l, ρυθμιστικό διάλυμα 50 mmol/l, Επιφανειοδραστικός παράγοντας, pH 6,7±0,1 στους 20°C.

**Όργανα:** Μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star Galaxy, bMG) , Πλάκα 96 θέσεων (Greiner Bio-one).

**Αρχή Μεθόδου:** Η ολική χοληστερόλη του ορού προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο 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-4-εν-3-όνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντιδρά με 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 4-αμινοαντιπυρίνη και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm.

**Πειραματική διαδικασία:** Δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τον Βαθμονομητή Πρότυπο Ορό με διαδοχικές αραιώσεις του πρότυπου δείγματος με PBS (τελική συγκέντρωση σε κάθε θέση 10, 6, 3, 2, 1 μg) και κατόπιν 5 μL δείγματος και κατάλληλος όγκος προτύπου σε τελικό όγκο 20 μL PBS αναμιγνύονται καλά με 300μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Για την παρακολούθηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της διαδικασίας χρησιμοποιείται ο Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου (5 μL σε 15 μL PBS). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min και μέτρηση της απορρόφησης στα 505 nm.

### 3.13 Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry [214]

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL), DC protein assay Kit (Bio-Rad) [Αντιδραστήριο A (αλκαλικό διάλυμα χαλκού), Αντιδραστήριο S (διάλυμα απορρυπαντικού), Αντιδραστήριο B (αραιό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu)], πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός 2mg/mL (BSA) (Pierce), DPBS 10x (LONZA), πλάκα 96 θέσεων (Greiner Bio-one).

**Όργανα:** μετρητής πλακών φθορισμού-απορρόφησης (Fluo-Star, bMG).

**Αρχή μεθόδου:** Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στο γεγονός ότι ο  $\text{Cu}^{2+}$  σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζει σύμπλοκα ιώδους χρώματος με τους πεπτιδικούς δεσμούς και ανάγεται προς  $\text{Cu}^+$ . Στη συνέχεια, με την προσθήκη του αντιδραστήριου 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 στα αμινοξέα His και Cys. Το μέγιστο της απορρόφησης είναι στα 750 nm, ενώ το ελάχιστο στα 405 nm.

**Πειραματική διαδικασία:** 5μL δείγματος (εις διπλούν) αναμειγνύονται με 25μL αντιδραστήριου A+S (στα 1000μL αντιδραστήριου A προστίθενται 20μL αντιδραστήριου S) και 200μL αντιδραστήριου B. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Παράλληλα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με 0,625, 1,25, 2,5, 5, 7,5 και 10μg πρωτεΐνης από πρότυπο διάλυμα BSA σε τελικό όγκο 5 μL PBS, ακολουθώντας την ίδια κατεργασία. Ως τυφλό χρησιμοποιείται PBS 1x (5 μL). Η τελική τιμή της πρωτεΐνης υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

### 3.14 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών J774, RAW 264.7 και HEK293

**Πειραματικό υλικό:** Κυτταρική σειρά μακροφάγων κυττάρων μύος J774 και RAW264.7 (European Collection of Animal Cell Culture) και HEK 293, προερχόμενα από νεφρό εμβρύου ανθρώπου (American Type Culture Collection).

**Αντιδραστήρια-υλικά:** θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), διάλυμα 10.000 U/mL πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Sigma), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v), DMSO (Sigma), αποστειρωμένα φίλτρα 0,22 μm (Millipore), αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειών επιφάνειας 25, 75 και 175 cm<sup>2</sup> (Greiner), αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon 15 και

50 mL, αποστειρωμένες σύριγγες 5, 10, 20 και 50 mL και αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων σε υγρό άζωτο, αποστειρωμένα εξαρτήματα αποκόλλησης κυττάρων (ξύστρες) (Greiner), σωλήνες τύπου errendorf και αποστειρωμένα σιφώνια (Greiner), διάλυμα Θρυψίνης (0,05%) / EDTA (0,02%) σε PBS χωρίς  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  (Biochrom AG).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v)  $CO_2$  σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), οπτικό μικροσκόπιο (Olympus), επιτραπέζια φυγόκεντρος (Kubota 7780).

**Έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων J774, RAW 264.7 και HEK293:** Φιαλίδιο με κατεψυγμένα κύτταρα σε 90% θρεπτικό μέσο (DMEM/ FBS 10% (v/v)/ 100 U/mL πενικιλίνη και 100  $\mu$ g/mL στρεπτομυκίνη) και 10 % DMSO αποψύχεται σε υδατόλουτρο 37 °C και τα κύτταρα μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας επιφάνειας 75  $cm^2$  (εάν το φιαλίδιο περιείχε το 1/3 – 1/5 των κυττάρων από φιάλη καλλιέργειας 75  $cm^2$  που βρίσκονταν σε συμβολή πριν από το πάγωμα) που περιέχει 15 mL θρεπτικού υλικού DMEM/ FBS 10 % (v/v)/ 100 U/mL πενικιλίνη και 100  $\mu$ g/mL στρεπτομυκίνη. Χαλαρώνεται το καπάκι της φιάλης, και τοποθετείται σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v)  $CO_2$  σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C. Μετά από 24 h, ελέγχεται στο μικροσκόπιο η βιωσιμότητα των κυττάρων και ο βαθμός προσκόλλησης τους στον πυθμένα της φιάλης και ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο.

**Διατήρηση-ανάπτυξη των καλλιιεργειών μακροφάγων J774 και RAW 264.7:** Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φιάλες καλλιέργειας (επιφάνειας 25, 75 και 175  $cm^2$ ) σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v)  $CO_2$  σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C και ελέγχεται η ανάπτυξη τους στο μικροσκόπιο. Ανά 2-3 ημέρες, ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης τους, απορρίπτεται το μέσο και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM/FBS/πεν./στρεπτ. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί μέχρι το 90 % της κατάστασης συμβολής γίνεται ανακαλλιέργεια αυτών. Γίνεται αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων. Παραλαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων με σιφώνιο, γίνεται αραίωση του κυτταρικού πληθυσμού συνήθως 1:6-1:8 σε φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM/FBS/πεν./στρεπτ., και τοποθετούνται τα κύτταρα σε νέες φιάλες καλλιιεργειών. Τα κύτταρα ανακαλλιιεργούνται μέχρι και τρεις μήνες.

**Διατήρηση-ανάπτυξη των καλλιιεργειών κυττάρων HEK 293:** Η διαδικασία είναι ίδια με αυτήν των μακροφάγων, με μόνη διαφορά την διαδικασία αποκόλλησης των

κυττάρων. Στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αντί της χρήσης ξύστρας κυττάρων, χρησιμοποιείται διάλυμα Θρυψίνης / EDTA. Συγκεκριμένα, αφαιρείται το παλιό θρεπτικό μέσο, προστίθονται 3 mL διαλύματος Θρυψίνης/ EDTA ανά φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup>, επωάζονται τα κύτταρα στον επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C για 3 min και στην συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος FBS. Παραλαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων με σιφώνιο και μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300 g για 10 min, αποχύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων υγρό, αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM/FBS/πεν./στρεπτ., ακολουθώντας αραίωση του κυτταρικού πληθυσμού συνήθως 1:6 και τοποθετούνται σε νέες φιάλες καλλιέργειών.

\* Η θρυψίνη πέπτει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-επιφάνειας φιάλης. Το EDTA είναι χηλικός παράγοντας των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, τα οποία οι ιντεγκρίνες χρειάζονται για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες για κυτταρική προσκόλληση.

**Δημιουργία stock καλλιέργειας κατεψυγμένων κυττάρων J774, RAW 264.7 και HEK293:** Κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι συμβολής αποκολλούνται από τον πυθμένα της φιάλης με την βοήθεια ξύστρας κυττάρων ή θρυψίνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Παραλαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων με σιφώνιο και μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300 g για 10 min, αποχύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων υγρό, αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε 5 mL 90% DMEM/FBS/πεν./στρεπτ. και 10 % (v/v) DMSO και τοποθετούνται ανά 1 mL σε ειδικά φιαλίδια. Το θρεπτικό μέσο αποθήκευσης πριν προστεθεί στα κύτταρα θα πρέπει να περάσει με την βοήθεια μιας σύριγγας 10 mL μέσα από ένα φίλτρο 0,2 μm για αποστείρωση. Το DMSO προστίθεται στο διάλυμα κατάψυξης των κυττάρων ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας για την ελάττωση της καταστροφής των κυττάρων από το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου που μπορούν να οδηγήσουν σε ρήξη της μεμβράνης των κυττάρων και για ωσμωτικούς λόγους. Η επιβίωση των κυττάρων εξαρτάται όμως και από το ρυθμό κατάψυξης. Για το σκοπό αυτό κάθε φιαλίδιο με το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε κουτί πολυστυρενίου και φυλάσσεται στους - 80 °C για περίπου 48 h. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αργός ρυθμός κατάψυξης (ιδανικά η θερμοκρασία πρέπει να μειώνεται 1°C/min). Κατόπιν, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε δοχείο υγρού αζώτου, όπου και φυλάσσονται.

### 3.15 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης από μακροφάγα J774

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου, ανασυγκροτημένα σωματίδια HDL (rHDL: reconstituted HDL), μακροφάγα κύτταρα J774, δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) (Greiner bio-one / CELLSTAR), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), διάλυμα 10.000 U/mL πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Sigma), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), αιθανόλη 100% (Merck), [4-<sup>14</sup>C]χοληστερόλη [0,1 mCi/mL, ειδική δραστηριότητα 50mCi/mmol σε αιθανόλη (Perkin Elmer)], 1,2,6-[<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη [1 mCi/ml, ειδική δραστηριότητα 40 Ci/mmol σε αιθανόλη (ARC)], μέσο επισήμανσης [1,6 μL [4-<sup>14</sup>C]χοληστερόλη ή 0,8μL 1,2,6-[<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη / πηγάδι. Η ποσότητα αυτή αφού εξατμιστεί υπό αέριο N<sub>2</sub>, αναδιαλύεται σε 0,5 μL αιθανόλης / πηγάδι, προστίθεται 1 μL 10% BSA σε DMEM / πηγάδι και ακολουθεί καλή ανάδευση. Τελικά, προστίθενται 0,5 mL 0,2 % BSA σε DMEM / πηγάδι], cpt-cAMP (8- (4- chlorophenylthio) adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate sodium salt) (Sigma), 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) (Cayman Chemicals), ακετυλιωμένη LDL ανθρώπινου ορού (acLDL) (Invitrogen), Triton X-100 (Merck), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker), υγρό σπινθηρισμού (ενότητα 3.3), πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).

**Όργανα:** Υδατόλουτρο, απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific). Φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus), ζυγός (Sartorius TE 64), μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

**Αρχή της μεθόδου:** Η εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων μέσω ABCA1 πραγματοποιείται κυρίως με την αλληλεπίδραση του ABCA1 με την ελεύθερη ή φτωχή λιπιδίων απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I), όπου οδηγεί σε βαθμιαία δέσμευση λιπιδίων. Η εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 πραγματοποιείται με την διευκόλυνση από τον ABCG1 της πρόσληψης χοληστερόλης από HDL σωματίδια (χωρίς να γνωρίζουμε ακόμα με ακρίβεια τον μηχανισμό). Για τον υπολογισμό της ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης χρησιμοποιούνται μακροφάγα κύτταρα ποντικού J774, τα οποία επωάζονται παρουσία ή απουσία ενός αναλόγου του cAMP (cpt-cAMP: 4-chlorophenylthio adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate sodium salt), το οποίο αυξάνει

την εκροή χοληστερόλης προς την αποΑ-I πιθανότατα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA: protein kinase A), αυξάνοντας της φωσφορυλίωση του ABCA1 [215]. Για τον υπολογισμό της ABCG1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης χρησιμοποιούνται μακροφάγα κύτταρα ποντικού J774, τα οποία επωάζονται παρουσία ή απουσία του 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). Το AICAR έχει αναφερθεί ότι αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του ABCG1, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα των mRNA και των πρωτεϊνών του ABCA1, των υποδοχέων εκκαθαριστών, περιλαμβανομένου του υποδοχέα εκκαθαριστή A, του CD36 και SR-BI και γονιδίων που σχετίζονται με την συνθεση χοληστερόλης σε J774 μακροφάγα επίμυος [99]. Η αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης του ABCG1 από το AICAR, γίνεται ανεξαρτήτως του μονοπατιού LXR (liver x receptor) / RXR (retinoid x receptor), αλλά μέσω της ενεργοποίησης της ERK κινάσης, όπου τα επίπεδα του mRNA του ABCG1 αυξάνονται μέσω ενός μετά-μεταγραφικού μηχανισμού που σταθεροποιεί το mRNA [99].

**Πειραματική διαδικασία:** Κύτταρα J774 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών (24-well plates) σε πυκνότητα που καλύπτει το 80% της συνολικής επιφάνειας κάθε πηγαδιού σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS και 1% αντιβιοτικά). 24 h μετά, τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με DMEM και επισημαίνονται με 0,16  $\mu\text{Ci}$ / πηγάδι [ $^{14}\text{C}$ ]-χοληστερόλη ή 0,8  $\mu\text{Ci}$ / πηγάδι 1,2,6- $^3\text{H}$ ]7-κετο-χοληστερόλη σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 0,2 % (w/v) BSA και 1% αντιβιοτικά) για άλλες 24 h. Σε ορισμένα πειράματα εκροής χοληστερόλης προστέθηκε στο μέσον επισήμανσης acLDL με τελική συγκέντρωση 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με DMEM και επωάζονται για άλλες 24 h, με 0,5 mL μέσο (DMEM, 0,2% (w/v) BSA, 1% αντιβιοτικά) παρουσία ή απουσία του αναλόγου του cAMP (cpt-cAMP) σε συγκέντρωση 0,3 mM (στην περίπτωση της εκροής χοληστερόλης μέσω ABCA1) και παρουσία ή απουσία του AICAR σε συγκέντρωση 1 mM (στην περίπτωση της εκροής χοληστερόλης μέσω ABCG1). Στο τέλος της επώασης ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με DMEM, 0,2% (w/v) BSA και επώαση των κυττάρων με 0,5 mL DMEM, 0,2% (w/v) BSA, 1% αντιβιοτικά που περιέχει την πρωτεΐνη-αποδέκτη της χοληστερόλης (απομονωμένες HDL από ορό αίματος ανθρώπου σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σε αποΑ-I στην περίπτωση της εκροής χοληστερόλης μέσω ABCA1 ή rHDL σωματίδια 1  $\mu\text{M}$  αποΑ-I στην περίπτωση της εκροής χοληστερόλης μέσω ABCG1). Η επώαση συνεχίζεται για 4 h και κατόπιν συλλέγεται το μέσο και τα κύτταρα. Το μέσο των κυττάρων υφίσταται φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 5 min ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που έχουν συνακολουθήσει. Όσον, αφορά τα πειράματα εκροής χοληστερόλης, τα κύτταρα

στους δίσκους καλλιέργειας, ξεπλένονται μια φορά με DMEM και επωάζονται, υπό ανάδευση, σε διάλυμα λύσης (0,4 mL PBS, 0,1% Triton-X 100), για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, λαμβάνονται 55  $\mu$ L από το μέσο των κυττάρων και 40  $\mu$ L από το λύμα των κυττάρων, προστίθενται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 10 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation cocktail) (ενότητα 3.3) και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.18). Το ποσοστό της εξερχόμενης από τα κύτταρα [ $^{14}$ C]-χοληστερόλης υπολογίζεται ως το % του λόγου των κρούσεων που μετρήθηκαν στο μέσο των κυττάρων ως προς το σύνολο των κρούσεων του μέσου των κυττάρων και του κυτταρικού λύματος. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) crt-cAMP / καθαρής (net) AICAR εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επωάστηκαν με το crt-cAMP / AICAR (μη ειδική εκροή χοληστερόλης), αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επωάστηκαν με crt-cAMP / AICAR (ολική εκροή χοληστερόλης).

Για τα πειράματα εκροής 7-κετο-χοληστερόλης, 100  $\mu$ L από το υπερκείμενο (που έχει φυγοκεντρηθεί όπως περιγράφεται παραπάνω) εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο-μεθανόλη κατά Bligh-Dyer [216]. Για την εκχύλιση, 100  $\mu$ L υπερκείμενου αναμιγνύονται με 376  $\mu$ L  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:2) [μονοφασικό σύστημα  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0,8)], ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση στους 4°C για 30 min. Προστίθεται μετά 124  $\mu$ L  $\text{CHCl}_3$  και 124  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  [διφασικό σύστημα  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0,9)], ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 5.000 x g για 1min στους 4°C, ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Παραλαμβάνονται 200  $\mu$ L από την χλωροφορμική φάση (υποκείμενη φάση) και μετρούνται οι κρούσεις σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.18). Τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη 800  $\mu$ L διάλυμα λύσης (PBS 0,1% Triton-X 100) και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. 100  $\mu$ L από το λύμα των κυττάρων εκχυλίζονται με χλωροφόρμιο-μεθανόλη (όπως έγινε και στο υπερκείμενο) και στην συνέχεια μετρούνται οι κρούσεις 200  $\mu$ L της χλωροφορμικής φάσης σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.18). Το ποσοστό εκροής [ $^3$ H]-7-κετο-χοληστερόλης από τα κύτταρα υπολογίζεται ως το % του λόγου των κρούσεων που μετρήθηκαν στο μέσο των κυττάρων ως προς το σύνολο των κρούσεων του μέσου των κυττάρων και του κυτταρικού λύματος. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) AICAR εξαρτώμενης εκροής 7-κετο-χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής 7-κετο-χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επωάστηκαν με το AICAR (μη ειδική εκροή 7-κετο-χοληστερόλης), αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής 7-κετο-χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επωάστηκαν με AICAR (ολική εκροή 7-κετο-χοληστερόλης).

### 3.16 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικού

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κύτταρα HEK 293, δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) επιστρωμένα με poly-D λυσίνη (Becton Dickinson), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), pCDNA 3.1(+), pCDNA 3.1-ABCG1, lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen), opti-MEM I (GIBCO), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), οπτικό μικροσκόπιο (Olympus).

**Αρχή της μεθόδου:** Επιμόλυνση είναι η διαδικασία εισαγωγής νουκλεϊκών οξέων σε ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω μη-ϊικής μεθόδου. Υπάρχουν πολλοί τρόποι εισαγωγής DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: Κατιονικός (πολυμερών), λιποσωμάτων και νανοσωμάτων (όπως βομβαρδισμός, κυρίως φυτικών κυττάρων στόχων, με μικροσκοπικά σωματίδια χρυσού επιστρωμένα στην επιφάνεια τους με μόρια DNA με χρήση μιας συσκευής ("gene gun"), στην οποία δημιουργούνται ηλεκτρικές εκκενώσεις). Ακολουθήθηκε η εισαγωγή DNA μέσω λιποφεκταμίνης 2000, η οποία τεχνική ανήκει στην δεύτερη κατηγορία. Η λιποφεκταμίνη σχηματίζει κυστίδια, τα οποία περιβάλλουν το DNA. Η μεμβράνη των κυστιδίων αυτών είναι παρόμοια με την κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οπότε, όταν εισάγονται λιποσώματα σε θρεπτικό μέσο κυττάρων και έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα, τότε συντήκονται οι δυο μεμβράνες και το περιεχόμενων των λιποσωμάτων (DNA) εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Από εκεί και πέρα το επιθυμητό γονίδιο DNA που υπάρχει στο πλασμίδιο μπορεί να εκφραστεί.

**Πειραματική διαδικασία:** Κύτταρα HEK 293 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών επιστρωμένα με poly-D λυσίνη σε πυκνότητα 10<sup>5</sup> κύτταρα /πηγάδι σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS) απουσία αντιβιοτικών. 24 h μετά, ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο στα κύτταρα και τα μισά πηγάδια του δίσκου επιμολύνονται με το πλασμίδιο pCDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 και τα άλλα μισά πηγάδια επιμολύνονται με το άδειο πλασμίδιο pCDNA3.1 (mock). Για να γίνει η επιμόλυνση αρχικά αραιώνονται 0,8μg DNA σε 50 μL opti-MEM I για κάθε πηγάδι και αναμιγνύονται ήπια. Επίσης, αραιώνονται 1,6 μL λιποφεκταμίνης σε 50 μL opti-MEM I για κάθε πηγάδι, αναμιγνύονται ήπια και επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 5 min επώασης προστίθεται το



αραιωμένο DNA στην αραιωμένη λιποφεκταμίνη, αναμιγνύονται ήπια και επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, 100  $\mu$ L μίγματος μεταφέρεται σε κάθε πηγάδι που περιέχει κύτταρα σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37 °C στον επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα. Το θρεπτικό μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης μπορεί να αντικατασταθεί από φρέσκο μέσο (χωρίς τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης) μετά από ~5 h χωρίς να μειωθεί η δυνατότητα επιμόλυνσης των κυττάρων.

### **3.17 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κύτταρα HEK 293, δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) (ενότητα 3.10), δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) επιστρωμένα με poly-D λυσίνη (Becton Dickinson), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό (55°C για 45 min), [4-<sup>14</sup>C]χοληστερόλη [0,1 mCi/mL, ειδική δραστικότητα 50 mCi/mmol σε αιθανόλη (Perkin Elmer)], 1,2,6-[<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη [1 mCi/ml, ειδική δραστικότητα 40 Ci/mmol σε αιθανόλη (ARC)], αιθανόλη 100% (Merck), αλβουμίνη από ορό μοσχαριού (BSA), ελεύθερη λιπαρών οξέων (Sigma), μέσο επισήμανσης [1,6  $\mu$ L [4-<sup>14</sup>C]χοληστερόλη ή 0,8 $\mu$ L 1,2,6-[<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη / πηγάδι. Η ποσότητα αυτή αφού εξατμιστεί υπό αέριο N<sub>2</sub>, αναδιαλύεται σε 0,5  $\mu$ L αιθανόλης / πηγάδι και ακολουθεί καλή ανάδευση. Τελικά, προστίθενται 0,5 mL 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό σε DMEM / πηγάδι], NaOH 10M (Applichem), ακετυλιωμένη LDL ανθρώπινου ορού (acLDL) (Invitrogen), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker), υγρό σπινθηρισμού [ενότητα 3.3], CHCl<sub>3</sub> (Merck), MeOH (Merck, Sigma), πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus), μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

**Αρχή της μεθόδου:** Η εκροή χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης μέσω ABCG1 πραγματοποιείται με την διευκόλυνση από τον ABCG1 της πρόσληψης χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης από HDL.

**Πειραματική διαδικασία:** Γίνεται επιμόλυνση HEK 293 με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή με το πλασμίδιο pcDNA3.1 (mock) για ~5 h με την πορεία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.16. Κατόπιν, απομακρύνεται το μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης και αντικαθίσταται από 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό) που περιέχει 0,16  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-χοληστερόλη ή 0,8  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-7-κετο-χοληστερόλη. Σε ορισμένα πειράματα εκροής χοληστερόλης προστέθηκε στο μέσον επισήμανσης acLDL με τελική συγκέντρωση 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Επωάζονται τα κύτταρα για 20 h στους 37 $^{\circ}\text{C}$  και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS 1x και επώαση των κυττάρων για 1 h στους 37 $^{\circ}\text{C}$  με 0,5 mL θρεπτικό μέσο που περιέχει 0,2% BSA σε DMEM. Τέλος, αφαιρείται το μέσο και προστίθενται 0,4 mL μέσου που περιέχει 0,2% BSA σε DMEM και τους αποδέκτες της χοληστερόλης (rHDL που περιέχουν είτε την αποA-I αγρίου τύπου είτε μεταλλαγμένες της μορφές) σε συγκέντρωση 1-4  $\mu\text{M}$  αποA-I. Η επώαση συνεχίζεται για 4 h και κατόπιν συλλέγεται χωριστά το μέσο και τα κύτταρα.

Για τα πειράματα εκροής χοληστερόλης, το μέσο των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 8000 rpm για 5 min ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που έχουν συνακολουθήσει. Τα κύτταρα στους δίσκους καλλιέργειας, ξεπλένονται μια φορά με DMEM και επωάζονται, υπό ανάδευση, σε διάλυμα λύσης (1 mL 0,1 N NaOH), για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, λαμβάνονται 300  $\mu\text{L}$  από το μέσο των κυττάρων και όλο το λύμα των κυττάρων, προστίθενται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation cocktail) (ενότητα 3.3) και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.18). Το ποσοστό εκροής [ $^{14}\text{C}$ ]-χοληστερόλης από τα κύτταρα υπολογίζεται ως το % του λόγου των κρούσεων που μετρήθηκαν στο μέσο των κυττάρων προς το σύνολο των κρούσεων του μέσου των κυττάρων και του κυτταρικού λύματος. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) ABCG1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1, αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1.

Για τα πειράματα εκροής 7-κετο-χοληστερόλης, ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στην ενότητα 3.15. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) ABCG1-εξαρτώμενης εκροής 7-κετο-χοληστερόλης, το ποσοστό εκροής 7-κετο-χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1, αφαιρούνται από το ποσοστό

εκροής 7-κετο-χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1.

### **3.18 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών [217]**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Ραδιενεργά δείγματα, υγρό σπινθηρισμού [ενότητα 3.3], πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας των 20 mL (Bioline).

**Όργανα:** Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer), καταγραφέας Epson LX-300+.

**Αρχή της μεθόδου:** Η μέτρηση της ραδιενέργειας γίνεται με την τεχνική του σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counting), στην οποία η ραδιενεργή ακτινοβολία μετράται δευτερογενώς. Το ραδιενεργό δείγμα που περιέχει κάποιο ισότοπο ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ), το οποίο εκπέμπει β<sup>-</sup> σωματίδια αναμιγνύεται με ένα “κοκτέιλ” σπινθηριστή. Το “κοκτέιλ” αυτό περιέχει: α) το διαλύτη (S, Τολουόλιο) που απορροφάει μέρος της ακτινοβολίας των β<sup>-</sup> σωματιδίων και διεγείρεται, β) τον πρωταρχικό σπινθηριστή, που είναι μία φθορίζουσα ουσία (F<sub>1</sub>, PPO), στην οποία μεταφέρεται η διέγερση του διαλύτη και γ) συνήθως ένα δευτερεύοντα σπινθηριστή (F<sub>2</sub>, POPOP), ο οποίος απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει ο πρωταρχικός σπινθηριστής και εκπέμπει ακτινοβολία σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, που ανιχνεύεται καλύτερα από το φωταπολλαπλασιαστή του ειδικού θαλάμου μέτρησης ραδιενέργειας. Τελικά, η ακτινοβολία αποδιέγερσης των φθορίζουσών ουσιών που ανιχνεύεται και η οποία είναι ανάλογη προς την ενέργεια των β<sup>-</sup> σωματιδίων που απορροφήθηκε, καταγράφεται ως αριθμός κρούσεων ανά λεπτό (cpm).

**Πειραματική διαδικασία:** Σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5-10 mL υγρού σπινθηρισμού τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα του υπό μέτρηση υδατικού διαλύματος (μέχρι 10% του όγκου του υγρού σπινθηρισμού), ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex και μετράται η ραδιενέργεια στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

### **3.19 Μελέτη της πλευρικής διάχυσης των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων HEK293**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κύτταρα HEK 293, δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) επιστρωμένα με poly-D λυσίνη (Becton Dickinson), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό (55<sup>0</sup>C για 45 min), χοληστερόλη (Sigma), 7-κετο-χοληστερόλης

(5-cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one) (Sigma), αιθανόλη 100% (Merck), 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ (Invitrogen Corp), 7,5mM 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ σε DMSO, κυψελίδα μέτρησης φθορισμού (Helma), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), φθορισμόμετρο (Hitachi Science and Technology F2500).

**Αρχή της μεθόδου:** Η μέθοδος έχει αναπτυχθεί και εφαρμοστεί από τους Hashimoto et al. 1999, Galla and Luisetti 1980, Dafnis et al 2010 [218-220]. Η τεχνική εφαρμόστηκε για να διερευνηθεί εάν η υπερέκφραση του ABCG1 σε κύτταρα HEK293 που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία χοληστερόλης ή 7-κετο-χοληστερόλης μπορεί να επηρεάσει την πλευρική διάχυση των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκού οξέος. Το 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ σε υδατικό διάλυμα απαντάται ως διμερές που όταν διεγερθεί εκπέμπει ακτινοβολία εκπομπής φθορισμού με μέγιστο εκπομπής στα 475nm. Όταν εισέλθει στην πλασματική μεμβράνη και ανάλογα με την κινητικότητα του "σπάει" σε μονομερή, τα οποία έχουν μέγιστο εκπομπής σε μικρότερο μήκος κύματος από τα διμερή (397nm). Επειδή ο σχηματισμός των μονομερών εξαρτάται από τη συχνότητα σύγκρουσης των λιπιδίων στη μεμβράνη, ο λόγος των μεγίστων της έντασης φθορισμού του 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκού οξέος στις δύο του καταστάσεις, χρησιμοποιείται ως δείκτης της πλευρικής διάχυσης των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη.

**Πειραματική διαδικασία:** Γίνεται επιμόλυνση κυττάρων HEK 293 με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή με το πλασμίδιο pcDNA3.1 (mock) για ~5 h με την πορεία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.16. Κατόπιν, απομακρύνεται το μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης και αντικαθίσταται από 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό) που περιέχει χοληστερόλη ή 7-κετοχοληστερόλη σε συγκέντρωση ίση με αυτή που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκροής χοληστερόλης (ενότητα 3.16), με την διαφορά ότι τώρα οι στερόλες δεν είναι ραδιενεργά επισημασμένες. Επώάζονται τα κύτταρα σε αυτό το μέσο για 20 h και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS 1x και αναδιασπορά σε 2mL PBS. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε κυψελίδα μέτρησης φθορισμού στην οποία επιπλέον προστίθεται 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ σε τελική συγκέντρωση 2 $\mu$ M. Μετά από επώαση 5min στο σκοτάδι, λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού του 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκού οξέος στα 380-580nm (διέγερση 340nm), στο

φθορισμόμετρο (πλάτος θυρίδας διεγείρουσας και εκπεμπόμενης δέσμης 2,5nm). Από το φάσμα του κάθε δείγματος υπολογίζεται ο λόγος των μεγίστων της έντασης φθορισμού του 1-πυρενιο-δωδεκανοϊκού οξέος στις δύο του καταστάσεις (διεγερμένο διμερές/ μονομερές) στα 475 και 397nm, αντίστοιχα.

### 3.20 Πρωτεόλυση rHDL σωματιδίων

**Αντιδραστήρια-υλικά:** rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I αγρίου τύπου (ενότητα 3.10), πλασμίνη ανθρώπινου πλάσματος (Sigma), PMSF (Applichem).

**Όργανα:** Επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH).

**Αρχή μεθόδου:** Η πλασμίνη είναι μια πρωτεάση που επιδεικνύει προτίμηση σε πέψη του πεπτιδικού δεσμού μετά από λυσίνη και αργινίνη και έχει βρεθεί μαζί με άλλες πρωτεάσες (μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας, καλλικρεΐνη) στον εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών του ανθρώπου. Οι πρωτεάσες αυτές έχει βρεθεί να αποικοδομούν την αποΑ-I της HDL<sub>3</sub> in vitro, επηρεάζοντας έτσι την επαγόμενη από HDL εκροή χοληστερόλης από αφρώδη κύτταρα [173,174,177,221]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η πρωτεόλυση της λιπιδιωμένης αποΑ-I από μερικές πρωτεάσες, ανάμεσα τους και η πλασμίνη, παράγουν τμήματα της αποΑ-I που στερούνται της καρβοξυ-τελικής περιοχής τους [172,173].

**Πειραματική διαδικασία:** Η πρωτεόλυση rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I αγρίου τύπου πραγματοποιήθηκε όπως έγινε από τους Lindstedt και Kovanen με μερικές τροποποιήσεις [174]. rHDL σωματίδια με συγκέντρωση αποΑ-I 1,2 mg / mL επωάστηκαν με 0,008 U / mL ανθρώπινης πλασμίνης σε διάλυμα 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris, pH 7.4 στους 37°C 1 h υπό ανάδευση. Η πρωτεόλυση σταμάτησε με προσθήκη PMSF με τελική συγκέντρωση 2 mM. Δείγμα από την αντίδραση αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμιδίου 15% υπο αποδιατακτικές συνθήκες ή σε πηκτική διαβαθμισμένης πυκνότητας 4-20% υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες(ενότητα 3.7). Η αποΑ-I εντοπίστηκε με χρώση με διάλυμα Coomassie Blue ή ανοσοαποτύπωση κατά western (ενότητα 3.9). Τα πρωτεολυμένα rHDL σωματίδια χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκροής χοληστερόλης από HEK293 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA3.1(ενότητα 3.16).

### **3.21 Διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNA interfering) σε κύτταρα RAW264.7**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7, δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) (Greiner bio-one / CELLSTAR), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), διάλυμα 10.000 U/mL πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Sigma), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), αιθανόλη 100% (Merck), lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen), opti-MEM I (GIBCO), BLOCK-iT™ φοριζόν ολιγονουκλεοτίδιο (Invitrogen), μη κωδικό βραχύ ολιγονουκλεοτίδιο παρεμπόδισης (nc siRNA: non coding short interfering RNA), βραχύ ολιγονουκλεοτίδιο παρεμπόδισης του ABCG1 μύος (Stealth siRNA έναντι του ABCG1 μύος, 5'-TACGGCACGAGATTGGAGACCTTTC-3') (Invitrogen).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), οπτικό μικροσκόπιο (Olympus), μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiovert 25).

**Αρχή της μεθόδου:** Η RNA παρεμπόδιση (RNAi) είναι ένας μηχανισμός όπου η ύπαρξη τμημάτων RNA διπλής έλικας (dsRNA) παρεμποδίζει την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Μακριά, δίκλινα μόρια RNA (τυπικά πάνω από 200 νουκλεοτίδια) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποσιωπήσουν την έκφραση στοχευμένων γονιδίων σε μια ποικιλία οργανισμών. Ο μηχανισμός είναι ο εξής: το μακριού μήκους δίκλινο μόριο RNA μετατρέπεται σε βραχείς παρεμποδιστές RNA μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων (siRNA: short interfering RNA) από ένα ένζυμο που ομοιάζει με την RNάση III και ονομάζεται Dicer με μια αντίδραση εξαρτώμενη από ATP. Τα siRNA έχουν 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους. Τα siRNA μπορούν να συντεθούν εκτός κυττάρου (όπως στην συγκεκριμένη πειραματική πορεία) και να εισέλθουν σε αυτά με την διαδικασία της επιμόλυνσης ή της ηλεκτροδιάτρησης. Τα siRNA προσλαμβάνονται από σύμπλοκα που περιέχουν ενδοριβονουκλεάση, γνωστά ως σύμπλοκα αποσιώπησης επαγόμενα από RNA (RISCs: RNA-Induced Silencing Complexes). Ένα από τα κύρια συστατικά αυτού του συμπλόκου είναι η πρωτεΐνη αργοναύτης ή Ago. Η Ago πέπτει και αποβάλλει το πληροφοριακό RNA (sense RNA) του δίκλινου siRNA και έτσι ενεργοποιείται το RISC. Το αντι-πληροφοριακό RNA (antisense RNA) δρα ως οδηγός κλώνος, καθοδηγώντας το σύμπλοκο στο ομόλογο

mRNA, και όταν προσδεθεί με την συμπληρωματική έλικα (mRNA), οδηγεί σε ενδονουκλεοτική πέψη του mRNA στόχου από RNάση του συμπλόκου.

Σε αυτήν την πειραματική πορεία επιχειρήσαμε να αποσιωπήσουμε τον ABCG1 με βραχύ παρεμποδιστή μήκους 25 νουκλεοτιδίων (siRNA), εισαγάγοντας τον σε μακροφάγα κύτταρα μυός RAW 264.7 με την διαδικασία της επιμόλυνσης παρουσία λιποφεκταμίνης 2000 (ενότητα 3.16).

**Πειραματική διαδικασία:** Κύτταρα RAW264.7 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών (24-well plates) σε πυκνότητα  $10^5$  κύτταρα / πηγάδι σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS). 16 h μετά, τα κύτταρα ξεπλένονται 1 φορά με PBS 1x και προστίθεται 0,2 mL opti-MEM I. Τα κύτταρα επιμολύνονται στην συνέχεια με 0,1 mL opti-MEM I που περιέχει μια από τις ακόλουθες τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: χωρίς να περιέχουν κάτι επιπρόσθετο, περιέχουν μόνο λιποφεκταμίνη, περιέχουν λιποφεκταμίνη και το μη κωδικό ολιγονουκλεοτίδιο παρεμπόδισης (nc siRNA) και τέλος περιέχουν λιποφεκταμίνη και το ολιγονουκλεοτίδιο παρεμπόδισης του ABCG1 μυός (ABCG1 siRNA). Στις τέσσερις αυτές συνθήκες μπορεί να προστεθεί και το BLOCK-iT™ φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση του ποσοστού της επιτυχούς επιμόλυνσης από μικροσκόπιο φθορισμού. Για να γίνει η επιμόλυνση αρχικά προστίθεται σε 50  $\mu$ L opti-MEM I (για κάθε πηγάδι) είτε τίποτα (2 συνθήκες), είτε nc siRNA, είτε ABCG1 siRNA με τελική συγκέντρωση κάθε ολιγονουκλεοτιδίου στο πηγάδι 100 nM. Επίσης, αραιώνονται 1  $\mu$ L λιποφεκταμίνης σε 50  $\mu$ L opti-MEM I για κάθε πηγάδι, αναμιγνύονται ήπια και επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 5 min επώασης προστίθεται το αραιωμένο RNA στην αραιωμένη λιποφεκταμίνη, αναμιγνύονται ήπια και επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, 0,1 mL μίγματος μεταφέρεται σε κάθε πηγάδι που περιέχει κύτταρα σε 0,2 mL μέσου και ακολουθεί επώαση για 6 h στους 37 °C. Το θρεπτικό μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα RNA/λιποφεκταμίνης αντικαταστάται από 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS). Στο σημείο αυτό, αν έχει προστεθεί το φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, μπορούμε να παρατηρήσουμε σε μικροσκόπιο φθορισμό το αποτέλεσμα της επιμόλυνσης και να γίνει εκτίμηση του ποσοστού της επιτυχούς επιμόλυνσης. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37 °C για συνολικά 48 h από την στιγμή της επιμόλυνσης.

### 3.22 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα HEK293 και RAW264.7

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κύτταρα HEK293 ή RAW264.7, Kit απομόνωσης ολικού RNA μικρής κλίμακας από καλλιέργειες κυττάρων «High pure RNA Isolation Kit» (Roche) [Τα

συστατικά του Kit αναφέρονται στην περιγραφή της πειραματικής πορείας], αιθανόλη 100% (Merck), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker).

**Όργανα:** Επιτραπέζια φυγόκεντρος BIOFUGE fresco Heraeus, απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets).

**Αρχή της μεθόδου:** Η απομόνωση του RNA έγινε με το High pure RNA Isolation Kit της εταιρίας Roche, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, από το λύμα κυττάρων HEK293 που είχαν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1 (mock) και είχαν επωαστεί απουσία και παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I αγρίου τύπου. Επίσης έγινε απομόνωση RNA από μακροφάγα κύτταρα RAW 264.7 ύστερα από την διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 siRNA). Όλα τα υλικά καθώς και ο χώρος που εκτελείται η απομόνωση προ-αποστειρώνονται με UV για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων με ξένο DNA. Το διάλυμα λύσης των κυττάρων περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη, η οποία είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας και βοηθά στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA. Επιπλέον, με την προσθήκη του διαλύματος λύσης απενεργοποιούνται RNάσες, οι οποίες απελευθερώνονται από οργανίδια (όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα) κατά τη λύση των κυττάρων. Το λύμα των κυττάρων αρχικά εισέρχεται από ειδική στήλη φιλτραρίσματος, όπου το γενωμικό υλικό προσδένεται εκλεκτικά στο φίλτρο της στήλης, από την οποία και εκλούεται στο τέλος της διαδικασίας με την προσθήκη απαλλαγμένου από RNάσες H<sub>2</sub>O. Πριν την έκλυση, προστίθεται στην στήλη διάλυμα DNάσης, όπου πέπτει το DNA στο φίλτρο της στήλης. Πλένεται η στήλη με διάλυμα εκπλυσης που περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη (για απενεργοποίηση της DNάσης (μη επιθυμητή σε μελλοντική PCR) και αιθανόλης (37-80% τελικής συγκέντρωσης στα διαλύματα έκπλυσης). Με την ύπαρξη αιθανόλης διατηρούνται στο φίλτρο της στήλης όλα τα μόρια RNA με μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια, ενώ εκλούνται μόρια RNA με λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια (5.8S rRNA, 5S rRNA και tRNA -τα οποία συνολικά συνιστούν το 15-20 % του ολικού RNA), πολυσακχαρίτες, άλατα και οι πρωτεΐνες.

**Πειραματική διαδικασία:** Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων και αντικαθίσταται από 0,5mL παγωμένου PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλώνται από το δισκίο 24 θέσεων με ήπιες αναρροφήσεις και εκροφήσεις από αυτόματη πιπέτα και μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf. Κατόπιν τοποθετούνται στον πάγο και φυγόκεντρούνται στα 8000 x g για 5 min στους 4<sup>0</sup>C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο,



προστίθεται στο ίζημα (κύτταρα) νέο παγωμένο διάλυμα PBS, φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, και τελικά το ίζημα αναδιασπείρεται σε 200  $\mu\text{L}$  PBS. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση 15 sec, προσθήκη 400  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα λύσης και επαναλαμβάνεται ισχυρή ανάδευση για 15 sec προκειμένου τα κύτταρα να λυθούν πλήρως. Το λύμα των κυττάρων μεταφέρεται στη στήλη με το ειδικό φίλτρο πρόσδεσης νουκλεϊκών οξών και φυγοκεντρείται στα 8.000 x g για 15sec στους 4<sup>0</sup>C. Το έκλουσμα απορρίπτεται και το δεσμευμένο στη στήλη νουκλεϊκό οξύ επωάζεται με προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος DNAάσης (έχει αραιωθεί το ένζυμο που φυλασσόταν στους -20<sup>0</sup>C 10x με το διάλυμα του ενζύμου) για 15 min. Η στήλη εκπλένεται στην συνέχεια με 500  $\mu\text{L}$  από το 1<sup>ο</sup> διάλυμα έκπλυσης (και φυγοκέντρηση στα 8.000 x g για 15sec), με 500  $\mu\text{L}$  από το 2<sup>ο</sup> διάλυμα έκπλυσης (και φυγοκέντρηση στα 8.000 x g για 15sec) και με 200  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα 2<sup>ο</sup> διάλυμα έκπλυσης (και φυγοκέντρηση στα 13.000 x g για 2min). Το RNA εκλούεται από τη στήλη μετά από την προσθήκη διάλυμα έκλουσης 20-50  $\mu\text{L}$  (απαλλαγμένου από RNάσες H<sub>2</sub>O) και φυγοκέντρηση στα 8.000 x g για 1min σε στους 4<sup>0</sup>C. Το απομονωμένο RNA μοιράζεται σε σωλήνες eppendorf και φυλάσσεται στους -80<sup>0</sup>C.

### **3.23 Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού RNA και πλασμιδιακού DNA**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** RNA, DNA, διάλυμα έκλουσης, ddH<sub>2</sub>O.

**Όργανα:** Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000.

**Αρχή της μεθόδου:** Μετράται η απορρόφηση του RNA ή DNA στα 260nm ( $A_{260}$ ), αφού σε ουδέτερο pH απορρόφηση ίση με τη μονάδα στα 260nm αντιστοιχεί σε 44 $\mu\text{g}$  RNA ή DNA/mL διαλύματος. Η καθαρότητα του RNA/DNA (απαλλαγμένου από πρωτεΐνες) καθορίζεται από το λόγο που απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260nm και στα 280nm ή στα 260nm και 230nm ( $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{230}$ ). Οι λόγοι  $A_{260}/A_{280}$  και  $A_{260}/A_{230}$  επηρεάζονται σημαντικά από το pH. Η ελάτωση του pH οδηγεί σε χαμηλότερους λόγους  $A_{260}/A_{280}$  και  $A_{260}/A_{230}$ . Το καθαρό RNA/DNA σε διάλυμα έκλουσης έχει λόγους  $A_{260}/A_{280}$  και  $A_{260}/A_{230}$  μεταξύ 1,9-2,1. Ένα δείγμα RNA/DNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση (σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), όσον αφορά το RNA) όταν ο παραπάνω λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,6-2,2, ενώ υψηλή τιμή απορρόφησης στα 280nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εμποδίζουν τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA/DNA και παρεμποδίζουν την RT-PCR (όσον αφορά το RNA).

**Πειραματική διαδικασία:** Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA και του DNA με το Nanodrop ND-1000 απαιτείται 1μL δείγματος το οποίο και φορτώνεται στο άκρο ενός ινώδους οπτικού καλωδίου (ινώδες λήψης). Ένα δεύτερο ινώδες οπτικό καλώδιο έρχεται τότε σε επαφή με το υγρό δείγμα και το υγρό δημιουργεί έτσι μια γέφυρα μεταξύ των άκρων των δυο ινωδών οπτικών καλωδίων. Το κενό ρυθμίζεται στο 1mm. Το μηχάνημα ελέγχεται από το λειτουργικό πρόγραμμα ND-1000 V3.1.0 ενός υπολογιστή, με τον οποίο είναι συνδεδεμένο και τα δεδομένα αποθηκεύονται στον υπολογιστή. Πριν τη μέτρηση του δείγματος το όργανο μηδενίζεται με 1μL ίδιου διαλύματος με αυτό στο οποίο βρίσκεται το RNA ή το DNA (τυφλό). Η ποιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, όπως αναφέρεται ακολούθως.

### 3.24 Ηλεκτροφόρηση RNA

**Αντιδραστήρια-υλικά:** RNA, αγαρόζη (Sigma), ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE [54g Tris, 27,5g βορικό οξύ, 40mL EDTA 0,25M, στα 500 mL H<sub>2</sub>O, pH 8,0], 5 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma), κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma), 6x διάλυμα πλήρωσης [0,25% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης και 40% (v/v) γλυκερόλη σε 0,5x TBE], διάλυμα έκπλυσης της συσκευής ηλεκτροφόρησης [0,5% (w/v) SDS σε 0,2M NaOH].

**Όργανα:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης DAN KAR CORP, συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Power Pac Basic (Biorad), συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδεδεμένη με κάμερα (UV Bio DOC It™ Imaging System - UV Transilluminator), φούρνος μικροκυμάτων.

**Αρχή της μεθόδου:** Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του RNA και του DNA καθώς και ο έλεγχος της ποιότητας του RNA. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊνικά οξέα σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων. Έτσι, τα διάφορα μόρια νουκλεϊνικών οξέων μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου( $\log_{10}$ ) του αριθμού των βάσεων τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα, και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε "ζώνες". Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν ακτινοβολίας της πηκτής με UV ακτινοβολία λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από μόρια όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλονται ανάμεσα στα μόρια του RNA και του DNA και στη διπλή έλικα του DNA.

**Πειραματική διαδικασία:** Παρασκευή πηκτής διαχωρισμού 1%: Αναμειγνύονται 1g αγαρόζης και 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,25x TBE και στη συνέχεια το μίγμα φέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων, στα 350Watt έως ότου διαυγαστεί (~3,5min). Στη συνέχεια (και μόλις υποχωρήσει η θερμοκρασία περίπου στους 50°C) προστίθενται 5μL βρωμιούχου αιθιδίου και το διάλυμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προηγουμένως έχει τοποθετηθεί ειδικό χτενάκι. Η πηκτή στερεοποιείται ~40 min μετά την απόχυση. Πριν από την ηλεκτροφόρηση η συσκευή εκπλυθεί με διάλυμα 0,5% (SDS) σε 0,2M NaOH για την αναστολή των RNAsών. Κατάλληλος όγκος διαλύματος RNA που περιέχει 0,5 μg RNA αναμειγνύεται με διάλυμα πλήρωσης σε αναλογία 5:1. Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια της πηκτής που δημιουργήθηκαν από το ειδικό χτενάκι και η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x σε σταθερή τάση 90V για ~1h. Οι ζώνες RNA γίνονται ορατές μετά από ακτινοβολία με UV ακτινοβολία, λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου και η πηκτή φωτογραφίζεται και η εικόνα της αποθηκεύεται σε αρχείο υπολογιστή. Οι ζώνες του RNA πρέπει να είναι οξείες και η ένταση της ταινίας που αντιστοιχεί στο 28S ριβοσωμικό RNA πρέπει να είναι διπλάσια της έντασης της ταινίας που αντιστοιχεί στο 18S ριβοσωμικό RNA. Αν οι ταινίες του RNA δεν είναι οξείες, αλλά εμφανίζονται απλωμένες κατά μήκος της πηκτής και προς περιοχές μικρότερου μεγέθους RNA, τότε το RNA έχει υποστεί διάσπαση. Επιπλέον, εάν εμφανιστούν απλωμένες ζώνες προς περιοχές μεγάλου μεγέθους RNA και σε μικρή απόσταση από τα φρεάτια ένθεσης του δείγματος, το παρασκεύασμα είναι επιμολυσμένο με γενωμικό DNA.

### **3.25 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Ολικό RNA κυττάρων HEK293 ή RAW264.7, Kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) [διάλυμα 160U/ μL GoScript™ Reverse Transcriptase απαλλαγμένο από RNάσες - περιέχει την αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)-, 5x ρυθμιστικό διάλυμα αντιστροφής μεταγραφής, διάλυμα MgCl<sub>2</sub> 25mM, διάλυμα εξαμερών εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων (random hexameres) 500μg/mL, διάλυμα εναρκτηρίων ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης (oligo-dTs) 500μg/mL, διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs) 10mM (το καθένα), διάλυμα 40U/ μL του ανασυνδυασμένου αναστολέα των RNAsών RNasin, H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες], αποστειρωμένοι - θερμοανθεκτικοί σωλήνες PCR, ρίγχη αυτόματων πιπετών με

φίλτρο, αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από DNάσες, RNάσες και γονιδιακό DNA (Greiner Bio-one).

**Όργανα:** Συσκευή PCR TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 Ver 300, απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets).

**Αρχή της μεθόδου:** Η αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) προς συμπληρωματικό DNA (cDNA) πραγματοποιήθηκε με το Kit GoScript™ Reverse Transcription System της εταιρίας Promega. Το συγκεκριμένο Kit είναι σχεδιασμένο για την σύνθεση cDNA από καθαρισμένο poly-A ή ολικό RNA. Το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση cDNA από 1ng έως και 5μg ολικού RNA. Η αντίδραση σύνθεσης πρώτου κλώνου cDNA (first-strand cDNA) καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση GoScript™ Reverse Transcriptase, παρουσία εναρκτηρίων ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης, εξαμερών εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων και τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιζών. Η απόδοση της σύνθεσης του cDNA αυξάνει με την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης του ανασυνδυασμένου αναστολέα των RNασών RNasin.

**Πειραματική διαδικασία:** Σε κατάλληλο όγκο διαλύματος ολικού RNA που περιέχει 0,5μg RNA προστίθενται 1μL εναρκτηρίων ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης (0,5μg) και 1μL εξαμερών εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων (0,5μg). Ακολουθεί επώαση στους 70°C στη συσκευή PCR για 5min, ψύξη σε πάγο για 5min και φυγοκέντρηση στα 8000 x g για 10sec. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Κατόπιν, προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα H<sub>2</sub>O (η ποσότητα H<sub>2</sub>O που προστίθεται σε κάθε αντίδραση υπολογίζεται από τη διαφορά του τελικού όγκου της αντίδρασης (20μL) με το άθροισμα του όγκου των υπόλοιπων προστιθέμενων αντιδραστηρίων), 4μL ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης, 3,2μL διαλύματος MgCl<sub>2</sub> (4mM), 1μL τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιζών (0,5mM το καθένα), 0,5μL διαλύματος αναστολέα των RNασών (20U) και 1μL διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης (160U). Τα δείγματα μεταφέρονται και πάλι στη συσκευή PCR και επωάζονται στους 25°C για 5min και ακολούθως στους 42°C για 60min. Στο στάδιο αυτό του κύκλου δρα η αντίστροφη μεταγραφάση και άρα κατασκευάζεται το cDNA. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος στους 70°C για 15 min, όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση. Θεωρητικά από 500 ng RNA παράγονται 500 ng cDNA. Άρα η συγκέντρωσή του cDNA είναι 500 ng/20μL ή 25 ng/μL. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται

αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) είτε φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

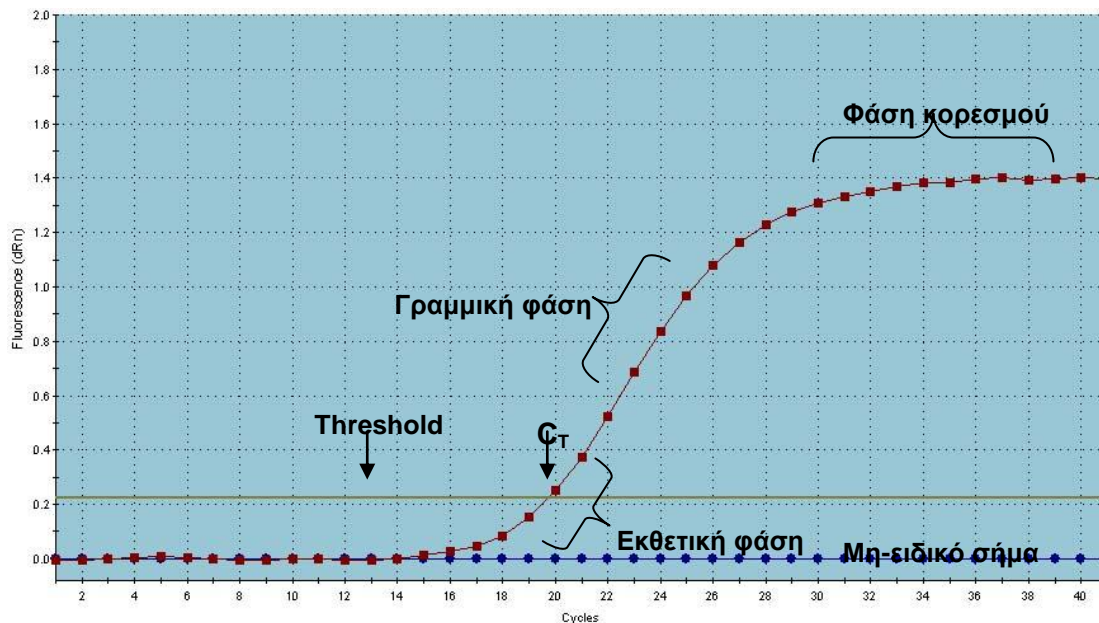
### **3.26 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Διάλυμα 25ng/μL cDNA κυττάρων HEK293 και RAW 264.7 (ενότητα 3.25), Kit SYBR FAST qPCR (KAPA) [SYBR FAST qPCR MIX (RNA πολυμεράση,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP's, SYBR Green) (προστίθενται 10μL/ αντίδραση), διάλυμα της χρωστική αναφοράς ROX (προστίθενται 0,4μL/ αντίδραση)], διαλύματα 10μM πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών συμπληρωματικών περιοχών των γονιδίων του TNFα, της IL-1β, της IL-10 και της GAPDH ανθρώπου, καθώς και ABCG1, GAPDH και TNFα μύς (Η αλληλουχία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και το μήκος των τμημάτων επί των γονιδίων που περικλείουν ανά ζεύγη παρατίθενται στον πίνακα 4.2 των Αποτελεσμάτων) (παρασκευάστηκαν από την εταιρία Macrogen),  $\text{H}_2\text{O}$  απαλλαγμένο από RNάσες (Demo S.A.), ρίγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από DNάσες, RNάσες και γονιδιακό DNA (Greiner Bio-one), συστοιχίες σωλήνων PCR με καπάκια που επιτρέπουν την ανίχνευση ακτινοβολίας φθορισμού (επίπεδα) (Bioplastics).

**Όργανα:** Συσκευή ποσοτικής PCR MxPro-Mx3000P (Stratagene), απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets).

**Αρχή της μεθόδου:** Με τη μέθοδο της PCR είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός μιας περιοχής του DNA, που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο τμήματα γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Ο πολλαπλασιασμός αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση εναρκτήριων μορίων γνωστής αλληλουχίας βάσεων (εκκινητές), τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα άκρα μίας ορισμένης περιοχής του DNA. Αρχικά, το DNA εκμαγείο αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία  $\sim 95^{\circ}\text{C}$ , ακολουθεί υβριδοποίηση των εκκινητών στις κατάλληλες περιοχές και επέκτασή τους με την επίδραση DNA πολυμεράσης, παρουσία dNTPs, σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης. Έτσι, συντίθενται νέοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί των αρχικών κλώνων εκμαγείων. Σε αυτό το στάδιο, τα μόρια του DNA υφίστανται ως δίκλινα μόρια. Νέα σύνθεση επέρχεται με θερμικό διαχωρισμό των δύο κλώνων, ανασύνδεση των εναρκτήριων μορίων στο DNA, κατόπιν ψύξης του μίγματος σε κατάλληλη θερμοκρασία και επέκταση των εναρκτήριων μορίων με επίδραση της DNA πολυμεράσης. Κάθε τέτοια επανάληψη αποτελεί και ένα κύκλο της PCR. Κάθε νέος κλώνος που συντίθεται αποτελεί εκμαγείο για τη σύνθεση νέου DNA με αποτέλεσμα τα αντίγραφα της αρχικής περιοχής του DNA να αυξάνονται εκθετικά ανά κύκλο.

Η Real Time PCR είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης μετράται η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας που δεσμεύεται στο DNA. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια. Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική (linear) φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε κορεσμό (plateau). Το σήμα στη Real Time PCR ανιχνεύεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης και όχι με ανάλυση "τελικού σημείου", όπως συμβαίνει με τη συμβατική μέθοδο PCR. Ως αναλυτικό σήμα καταγράφεται η τιμή  $C_T$  (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή  $C_T$  είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή  $C_t$  τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος [222].



**Εικόνα 3.1.** Καμπύλη ενίσχυσης (φθορισμός ως προς αριθμό κύκλων) των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου της **GAPDH** σε κύτταρα **HEK293**. Στο σχήμα διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής  $C_T$ , ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το μη-ειδικό σήμα και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Η εικόνα του σχήματος παρατίθεται όπως προέκυψε από το λογισμικό του μηχανήματος ποσοτικής PCR MxPro-Mx3000P της Stratagene

Στην παρούσα μελέτη, η παρατήρηση του παραγόμενου προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρήση της φθορίζουσας ουσίας SYBR Green (με μέγιστο διέγερσης και εκπομπής στα 497nm και 520nm, αντίστοιχα). Στην αρχή της ενίσχυσης, το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το αποδιαταγμένο DNA, τους εκκινητές και τη χρωστική.

Τα μη δεσμευμένα μόρια χρωστικής εκπέμπουν ασθενή φθορισμό παράγοντας ένα πολύ χαμηλό σήμα υποβάθρου, αντίστοιχο με αυτό της χρωστικής αναφοράς ROX. Μετά τον υβριδισμό των εκκινητών και τη σύνθεση του δίκλωνου DNA κατά την PCR, τα μόρια του SYBR Green δεσμεύονται στη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπουν φθορισμό. Δεδομένου ότι η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται συνεχώς, κάθε αύξηση στο φθορισμό γίνεται ορατή και καταγράφεται, ενώ η αντίδραση βρίσκεται σε εξέλιξη. Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης της έλικας του DNA, στον επόμενο κύκλο της αντίδρασης, τα δεσμευμένα μόρια της χρωστικής ελευθερώνονται και το σήμα του φθορισμού μειώνεται. Τελικά η ένταση του ανιχνευόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης του ABCG1 σε κύτταρα HEK293 παρουσία και απουσία rHDL που περιέχει την αποA-I αγρίου

τύπου και παρουσία ή απουσία του αναστολέα της STAT3 στην έκφραση των γιονιδίων του TNF $\alpha$ , της IL-1 $\beta$  και της IL-10, καθώς και η επίδραση της αποσιώπησης πλήρως ή μερικώς του ABCG1 στην έκφραση των γιονιδίων του TNF $\alpha$  (ενότητες 3.27 & 3.21). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η οποία εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (ιδιοσυστατικό γονίδιο - housekeeping gene). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το SYBR FAST qPCR Kit της εταιρίας KAPA στο οποίο περιλαμβάνεται η πολυμεράση, το MgCl<sub>2</sub>, τα dNTP's, το SYBR Green και η χρωστική αναφοράς ROX στις βέλτιστες συγκεντρώσεις. Η ποσότητα του cDNA και η συγκέντρωση των εκκινητών που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, για κάθε μία από τις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, φαίνεται στους πίνακες 4.3 και 4.5 των Αποτελεσμάτων.

**Πειραματική διαδικασία:** Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση του ζεύγους των εκκινητών στην αντίδραση. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή (πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή) πρέπει να είναι η ίδια. Τα cDNA αραιώνονται με H<sub>2</sub>O σε σωλήνες erpendorf και υπολογίζεται η ποσότητα του cDNA κάθε δείγματος που απαιτείται. Προστίθεται σε συστοιχίες σωλήνων PCR η ποσότητα του cDNA κάθε δείγματος και αφού ετοιμαστεί το κυρίως διάλυμα της αντίδρασης «master mix» που περιέχει διαλύματα πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών, H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες (τελικός όγκος αντίδρασης 20  $\mu$ L), SYBR FAST qPCR MIX (προστίθενται 10 $\mu$ L/ αντίδραση) και διάλυμα της χρωστική αναφοράς ROX (προστίθενται 0,4 $\mu$ L/ αντίδραση), προστίθεται σε κάθε δείγμα cDNA. Οι σωλήνες προστατευμένοι από το φως μεταφέρονται σε πάγο. Οι σωλήνες μεταφέρονται στη συσκευή PCR και ξεκινά το πρόγραμμα PCR. Το προγράμμα που εφαρμόστηκε περιγράφεται στις Εικόνες 4.28 και 4.34 των Αποτελεσμάτων.

### **3.27 Επώαση HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1 παρουσία ή απουσία αναστολεων για τον JAK2, την STAT3 και PI3K**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Κύτταρα HEK 293, δίσκοι 24 πηγαδιών (24-well plates) επιστρωμένα με poly-D λυσίνη (Becton Dickinson), θρεπτικό υλικό καλλιέργειών Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) που περιέχει ultra-glutamine 1 και 4,5 g/l γλυκόζη (BioWhittaker, Lonza), ορός εμβρύου μοσχαριού (FBS) (Sigma), 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό (55<sup>0</sup>C για 45 min), αιθανόλη 100% (Merck), DPBS 10x (LONZA, BioWhittaker), DMSO (Sigma), πεπτιδικός αναστολέας του μεταγωγέα σήματος και



ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (STAT<sub>3</sub>: Signal Transducer and Activator of Transcription 3) PpYLKTK-AAVLLPVLLAAP; PpYLKTK-mts (Calbiochem,jpt Innovative Peptide Solutions), αναστολέας της Κινάσης Ιανός 2 (JAK2: Janus Kinase 2) AG490 (Cayman), αναστολέας της κινάσης της 3 φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K: Phosphoinositide 3-kinase) Βορτμανίνη (Cell Signaling).

**Όργανα:** Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets), επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific).

**Αρχή της μεθόδου:** Ο STAT3 δρα, αφού φωσφορυλιωθεί σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης στη θέση 705 του καρβοξυ-τελικού του άκρο και σχηματίζει ένα όμο- ή έτερο- διμερές. Για να σχηματιστεί αυτό το όμο- ή έτερο- διμερές πρέπει η φωσφο-τυροσίνη 705 του ενός μονομερούς να συνδεθεί με μια συντηρημένη δομική περιοχή SH2 του άλλου μονομερούς και αντίστροφα [223]. Οι SH2 περιοχές παρουσιάζονται σε πολλές πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος και επιτρέπουν τις πρωτεΐνες πάνω στις οποίες βρίσκονται να «αγκυροβολούνται» σε αυτές κατάλοιπα φωσφορυλιωμένου τυροσινών άλλων πρωτεϊνών. Αποτελούν δηλαδή τμήμα πρωτεϊνών-προσαρμογέων και η ύπαρξη τους βοηθά στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η κυτταρική μεμβράνη είναι διαπερατή από το πεπτιδικό αναστολέα του STAT3 (PpYLKTK-AAVLLPVLLAAP; PpYLKTK-mts), ένα ανάλογο φωσφο-πεπτίδιο που προσδένεται στην δομική περιοχή SH2 της STAT3 και δεν επιτρέπει έτσι τον ομο- ή έτερο-διμερισμό των μονομερών STAT3. Η κυτταρική μεμβράνη είναι διαπερατή από αυτό το πεπτίδιο, εξαιτίας της ύπαρξης της αλληλουχίας AAVLLPVLLAAP στην C-τελική περιοχή του αναστολέα (mts: membrane translocating sequence).

Η STAT3 φωσφορυλιώνεται και επομένως ενεργοποιείται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της Κινάσης Ιανός 2 (JAK2: Janus Kinase 2) [224] ή όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της κινάσης της 3 φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K: Phosphoinositide 3-kinase) [225]. Ο JAK2 έχει στενή σχέση με πάρα πολλούς κυτταρικούς υποδοχείς, όπως αυξητικών ορμονών, προλακτίνης, λεπτίνης, ερυθροποιητίνης, ιντερφερόνης α,β,γ ή ιντερλευκινών. Μόλις προσδεθεί ο κατάλληλος προσδέτης στον υποδοχέα, η JAK2 φωσφορυλιώνει την C-τελική περιοχή του υποδοχέα, όπου μπορεί και να πάει να προσδεθεί η STAT3 μέσω της SH2 περιοχής του και στην συνέχεια να μπορέσει να φωσφορυλιωθεί η τυροσίνη 705 και να συνεχιστεί η μεταγωγή σήματος. Ο AG490 παρεμποδίζει την JAK2, άγνωστο ακριβώς πως, να φωσφορυλιώσει τον υποδοχέα και επομένως να ενεργοποιηθεί η STAT3. Από την άλλη,

ο αναστολέας της κινάσης της 3 φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K: Phosphoinositide 3-kinase) Βορτμανίνη, προσδένεται μη αντιστρεπτά στην καταλυτική μονάδα της PI3K, p110, και παρεμποδίζει έτσι την μεταγωγή σήματος προς την STAT3.

**Πειραματική διαδικασία:** Αναστολή STAT3: Κύτταρα HEK 293 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών επιστρωμένα με poly-D λυσίνη σε πυκνότητα  $10^5$  κύτταρα /πηγάδι σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS) απουσία αντιβιοτικών. 22 h μετά, ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο στα κύτταρα και επωάζονται για 2 h απουσία και παρουσία 100, 235 και 500  $\mu$ M PrYLKTK-mts. Στην συνέχεια, τα HEK293 επιμολύνονται με το πλασμίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή με το πλασμίδιο pcDNA3.1 (ενότητα 3.16) για ~5 h. Κατόπιν, απομακρύνεται το μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης και αντικαθίσταται από 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό). Επωάζονται σε αυτό το μέσο για 19 h και κατόπιν τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x και επωάζονται σε 0,2% BSA DMEM απουσία και παρουσία 100, 235 και 500  $\mu$ M PrYLKTK-mts για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται απομόνωση του RNA, όπως περιγράφεται από την ενότητα 3.22.

Αναστολή JAK2 και PI3K: Κύτταρα HEK 293 τοποθετούνται σε δίσκους 24 πηγαδιών επιστρωμένα με poly-D λυσίνη σε πυκνότητα  $10^5$  κύτταρα /πηγάδι σε 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS) απουσία αντιβιοτικών. 20 h μετά, ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο στα κύτταρα και επωάζονται για 4 h απουσία και παρουσία 30 και 100  $\mu$ M AG490 ή 0,1  $\mu$ M Βορτμανίνη. Στην συνέχεια, τα HEK293 επιμολύνονται με το πλασμίδιο pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ανθρώπινου μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1 (ενότητα 3.16) απουσία και παρουσία 30 και 100  $\mu$ M AG490 ή 0,1  $\mu$ M Βορτμανίνης για ~5 h. Κατόπιν, απομακρύνεται το μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/λιποφεκταμίνης και αντικαθίσταται από 0,5 mL θρεπτικό μέσο (DMEM, 10 % (v/v) FBS θερμικά ανενεργό) απουσία και παρουσία 30 και 100  $\mu$ M AG490 ή 0,1  $\mu$ M Βορτμανίνης. Επωάζεται σε αυτό το μέσο για 19 h και την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x και λύνονται με την προσθήκη 60  $\mu$ L / πηγάδι διαλύματος λύσης-δείγματος και έκθεση σε θάλαμο υπερήχων, αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7.

### **3.28 Μετασηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων E.coli XL1-Blue και BL21(DE3)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** πλασμιδιακό DNA που περιέχει το γονίδιο έκφρασης της rTEV, βακτηριακά κύτταρα E.coli XL1-Blue και BL21(DE3), βακτηριολογικός σωλήνας με καπάκι δυο θέσεων (14mL – Greiner Bio-one), θρεπτικό μέσο LB σε σκόνη. [Σύσταση /

1 L: 10g tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract] (Q BIOgene), διάλυμα LB [25 g σκόνης σε 1 L H<sub>2</sub>O, ακολουθεί αποστείρωση 121 °C, 30 min], αγαρ για βακτηριολογία (Applichem), καναμυκίνη (Applichem), διάλυμα LB-άγαρ [1,5% άγαρ σε διάλυμα LB, ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 30 min και κατόπιν προσθήκη καναμυκίνης σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL], SOC medium (Invitrogen) [Το μέσο αυτό είναι κατάλληλο για χρήση τελικού σταδίου κυτταρικού μετασχηματισμού, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αποδοτικότητα μετασχηματισμού E.coli (Hanahan, 1983). Το SOC medium περιέχει: 2% Tryptone, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose], διάλυμα καναμυκίνης (50 mg/mL), τρυβλία, φλόγιστρο, ειδική αποστειρωμένη γυάλινη ράβδος ειδική για ομοιόμορφο άπλωμα κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια, αποστειρωμένα tip.

**Όργανα:** Επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH), αυτόκαυστος Tuttnauer 3870 E.

**Αρχή της μεθόδου:** Μετασχηματισμός είναι η γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου που προκύπτει από την είσοδο-ενσωμάτωση και έκφραση ενός ξένου «γυμνού» γενετικού υλικού. Το γενετικό υλικό αφού εισέλθει μέσα στο βακτήριο εισάγεται σε ένα συγκεκριμένο σημείο του βακτηριακού DNA. Το ξένο DNA μπορεί να αντικαταστήσει ένα προϋπάρχον γονίδιο ή τμήμα του, με αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης του. Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιούνται είναι ικανά (competent) να προσλαμβάνουν ξένο DNA. Η τοποθέτηση των κυττάρων στον πάγο παρουσία δισθενών ιόντων, πχ Ca<sup>2+</sup> ή β-μερκαπτοεθανόλης, προετοιμάζει τα κύτταρα να γίνουν διαπερατά από το πλασμιδιακό DNA. Τα κύτταρα αφού επωαστούν στον πάγο, υπόκεινται σε θερμικό σοκ για σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να εισέλθει το DNA στα κύτταρα. Η διαδικασία είναι πολύ αποτελεσματική για κυκλικά μόρια DNA και όχι τόσο για γραμμικά μόρια, ίσως γιατί οι εξωνουκλεάσες του κυττάρου τα αποικοδομούν αμέσως. Προκειμένου να διακριθούν τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί, συνήθως στον φορέα υπάρχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Έτσι αν καλλιεργηθούν μετά σε θρεπτικό παρουσία αντιβιοτικού, θα επιβιώσουν μόνο αυτά που έχουν προσλάβει και ενσωματώσει το επιθυμητό DNA.

**Πειραματική διαδικασία:** Σε βακτηριολογικό σωλήνα τοποθετούνται 50 µL βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue ή BL21(DE3) (competent cells, κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν) και 100 ng του πλασμιδιακού DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, υφίσταται θερμικό shock στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 450 µL θρεπτικού LB (ή SOC medium) και επωάζεται η καλλιέργεια υπό

ανάδευση στους 37°C για 1 h. Τέλος 50, 100, 150 µL καλλιέργειας απλώνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου σε τρυβλίο στερεού θρεπτικού μέσου (LB-αγαρ) που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-18h.

### **3.29 Παραγωγή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων E.coli XL1-Blue μικρής έκτασης (mini prep)**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα E.coli XL1-Blue με το πλασμιδιακό DNA που περιέχει το γονίδιο έκφρασης της rTEV, αποστειρωμένα tip ή ειδικός αποστειρωμένος συλλέκτης αποικιών, θρεπτικό μέσο LB σε σκόνη [Σύσταση / 1 L: 10g tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract] (Q BIOgene), διάλυμα LB [25 g σκόνης σε 1 L H<sub>2</sub>O, ακολουθεί αποστείρωση 121°C, 30 min], καναμυκίνη (Applichem), διάλυμα καναμυκίνης (50 mg/mL), βακτηριολογικός σωλήνας με καπάκι δυο θέσεων (14mL – Greiner Bio-one), φλόγιστρο, κιτ καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (mini prep, QIAGene).

**Όργανα:** Επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH), αυτόκαυστος Tuttnauer 3870 E, φυγόκεντρος BIOFUGE fresco Heraeus.

**Αρχή της μεθόδου:** Για την παραγωγή πλασμιδιακού DNA πάντα πριν από το στάδιο της υγρής καλλιέργειας προηγείται η στερεά καλλιέργεια. Η επιλογή μιας μοναδικής αποικίας για κάθε υγρή καλλιέργεια εξασφαλίζει την μοναδικότητα του πλασμιδιακού DNA που θα ανακτήσουμε μετά την απομόνωση του (δεδομένης της πιθανής εμφάνισης διαφορετικών ή και καθόλου μεταλλάξεων σε κάθε κύτταρο μετά τον μετασχηματισμό). Το κιτ της QIAGene στοχεύει αρχικά στον διαχωρισμό των κυττάρων της καλλιέργειας από το θρεπτικό υλικό τους, το σπάσιμο των κυττάρων, τον διαχωρισμό γενωμικού από πλασμιδιακού DNA και τέλος την ικανότητα δέσμευσης του πλασμιδίου σε ειδικό φίλτρο στήλης.

**Πειραματική διαδικασία:** Από τρυβλίο στο οποίο έχει γίνει από προηγούμενη μέρα επιτυχημένος μετασχηματισμός (ενότητα 3.28), επιλέγεται μοναδική αποικία είτε με την βοήθεια αποστειρωμένου tip είτε με ειδικό αποστειρωμένο συλλέκτη αποικιών. Η αποικία μεταφέρεται στον ειδικό βακτηριολογικό σωλήνα, οποίος περιέχει διάλυμα 5 mL LB και καναμυκίνης (50 µg/mL) και επωάζεται στους 37°C για 16-18h στα 220 rpm. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρείται η καλλιέργεια (θα πρέπει να έχει θολώσει) στις 12500 rpm, 4 °C, 10 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε 250 µL διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA). Στη συνέχεια προστίθεται 250 µL διάλυμα P2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση, 350 µL

διαλύματος N3 με επίσης ήπια ανάδευση και φυγοκεντρείται το διάλυμα στις 12500 rpm, 4 °C, 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στην ειδική στήλη του kit QIAprep και φυγοκεντρείται στις 12500 rpm, 4 °C, 1 min. Στη συνέχεια, (αφού απομακρύνουμε την υγρή φάση) προστίθενται 750 µL διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση (δύο φορές) στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, μεταφέρεται η στήλη σε καθαρό eppendorf και εκλούεται το DNA μετά από προσθήκη 50 µL διαλύματος έκλουσης EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) (ή H<sub>2</sub>O), επώαση 1 min στην στήλη σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12500 rpm, 4 °C, 1 min.

### **3.30 Παραγωγή ανασυγκροτημένης πρωτεΐσης rTEV (reconstituted Tobacco Etched Viral) σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της *Escherichia coli*.**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα E.coli BL21(DE3) με το πλασμιδιακό DNA που περιέχει το γονίδιο έκφρασης της rTEV (ενότητα 3.28), αποστειρωμένα tip ή ειδικός αποστειρωμένος συλλέκτης αποικιών, θρεπτικό μέσο LB σε σκόνη [Σύσταση / 1 L: 10g tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract] (Q BIOgene), διάλυμα LB [25 g σκόνης σε 1 L H<sub>2</sub>O, ακολουθεί αποστείρωση 121°C, 30 min], καναμυκίνη (Applichem), διάλυμα καναμυκίνης (50 mg/mL), βακτηριολογικός σωλήνας με καπάκι δυο θέσεων (14mL – Greiner Bio-one), φλόγιστρο, κωνικές φιάλες αποστηρωμένες, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (invitrogen).

**Όργανα:** Επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH), αυτόκαυστος Tuttnauer 3870 E, φωτόμετρο (Thermo Electron Corporation), φυγόκεντρος για δοχεία 250 mL (RC5C Sorvall Instruments Du Pont), κεφαλή υπερφυγοκέντρου (GSA10).

**Αρχή της μεθόδου:** Η αρχή παραγωγής της πρωτεΐσης rTEV βασίζεται αρχικά στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA που περιέχει το γονίδιο έκφρασης της rTEV με μετασχηματισμό σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της *Escherichia coli* (ενότητα 3.28) και επαγωγή της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου (rTEV). Η επαγωγή επιτυγχάνεται με χρήση IPTG. Το IPTG χρησιμοποιείται ως μοριακός μιμητής της αλλολακτόζης, έναν μεταβολίτη της λακτόζης που δρα σαν εκκινητής της μεταγραφής του οπερονίου της λακτόζης. Σε αντίθεση με την αλλολακτόζη, το IPTG περιέχει ένα άτομο θείου που σχηματίζει έναν χημικό δεσμό που δεν υδρολύεται από το κύτταρο και το καθιστά πολύ σταθερό χωρίς να επηρεάζεται η διαδικασία μεταγραφής του οπερονίου της λακτόζης. Το IPTG προσδένεται στον καταστολέα της λακτόζης, ο οποίος αποδεσμεύεται από τους 3 χειριστές του οπερονίου της λακτόζης και επιτρέπει την RNA πολυμεράση, η οποία είναι από πριν προσδεμένη με τον υποκινητή του οπερονίου, να ξεκινήσει την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης. Το πλασμιδιακό DNA που

χρησιμοποιείται, περιέχει τον υποκινητή της λακτόζης δίπλα από το γονίδιο της rTEV, οπότε όταν προστίθεται IPTG, επάγεται η έκφραση αυτού του γονιδίου.

**Πειραματική διαδικασία:** Από τρυβλίο στο οποίο έχει γίνει από προηγούμενη μέρα επιτυχημένος μετασχηματισμός (ενότητα 3.28), επιλέγεται μοναδική αποικία είτε με την βοήθεια αποστειρωμένου tip είτε με ειδικό αποστειρωμένο συλλέκτη αποικιών. Η αποικία μεταφέρεται στον ειδικό βακτηριολογικό σωλήνα, οποίος περιέχει διάλυμα 5 mL LB και καναμυκίνης (50 µg/mL) και επωάζεται στους 37°C για 16-18h στα 220 rpm. Την επόμενη μέρα, μεταφέρεται από 1 mL καλλιέργειας σε 3 αποστηρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν από σε 99 mL φρέσκου LB και καναμυκίνης (50 µg/mL). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C στα 220 rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα 0,4-0,6 στα 600 nm οπότε και επωάζονται απουσία ή παρουσία 0,1 και 1 mM IPTG. Γίνεται συλλογή δείγματος πριν προστεθεί το IPTG, καθώς και 2h και 4h μετά την προσθήκη του IPTG. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4000 xg, για 15 min, στους 4°C, για να διαχωρίσουμε τα κύτταρα από το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα, αν θέλουμε μπορούμε να τα φυλάξουμε στους -80 °C, αλλιώς μπορούμε να συνεχίσουμε την πειραματική διαδικασία.

### **3.31 Καθαρισμός ανασυγκροτημένης πρωτεΐσης rTEV (reconstituted Tobacco Etched Viral) σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της *Escherichia coli*.**

**Αντιδραστήρια-υλικά:** Βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) στα οποία έχει παραχθεί η rTEV(ενότητα 3.30), Tris (Applichem), NaCl (Applichem), ιμιδαζόλιο (Sigma), β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma), EDTA (Fluka), DTT (Sigma), Triton X-100 (Merck), γλυκερόλη (Sigma), ρητίνη νικελίου (Qiagen), διάλυμα λύσης [50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl], διάλυμα ιμιδαζολίου 1M, διάλυμα εξισορρόπησης ρητίνης νικελίου [50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζολίου, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη], διάλυμα έκπλυσης ρητίνης νικελίου [50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζολίου, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη], διάλυμα έκλουσης ρητίνης νικελίου [50 mM Tris-HCl, pH8, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζολίου, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη], διάλυμα αλλαγής [100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100], διάλυμα αποθήκευσης [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,05% Triton X-100, γλυκερόλη 50%], σωληνάρια υπερφυγοκέντρου.

**Όργανα:** Φυγόκεντρος για σωληνάρια falcon Kubota 7780, συσκευή συμπύκνωσης με φίλτρο πόρων 10kDa χωρητικότητας 15 mL (Millipore), συσκευή περιστροφής σωληναρίων τύπου φάλκον (Stuart Scientific, blood tube rotator SB1), στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, συσκευή λύσης κυττάρων French Press (SLM-

AMINCO,USA), ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος (L-90K, Beckman Coulter), κεφαλή υπερφυγοκέντρου (50.2 Ti).

**Αρχή της μεθόδου:** Για να απομονωθεί και να καθαριστεί η rTEV, τα κύτταρα πρέπει πρώτα να λυθούν με μια διαδικασία που αφορά την άσκηση μεγάλης μηχανικής δύναμης (French Press), όπου σπάει το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και έτσι η επιθυμητή πρωτεΐνη απελευθερώνεται στο διάλυμα λύσης, όπου το επόμενο στάδιο είναι να καθαριστεί. Ο καθαρισμός της rTEV βασίζεται στην χρωματογραφία συγγένειας. Η στήλη που χρησιμοποιείται περιέχει ρητίνη νικελίου. Η rTEV του λύματος των βακτηριακών κυττάρων δεσμεύονται στην στήλη για το λόγο ότι περιέχει στο άκρο της ετικέτα ιστιδίνης, η οποία και συνδέεται με το νικέλιο που είναι προσδεμένο στην ρητίνη. Κατόπιν έκπλυσης της στήλης, η rTEV εκλούεται από τη στήλη με διάλυμα που περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται την πρόσδεση της His της rTEV στο νικέλιο. Έτσι έχουμε διαχωρήσει την επιθυμητή πρωτεΐνη (rTEV) από το διάλυμα λύματος των βακτηριακών κυττάρων.

**Πειραματική διαδικασία:** Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε διάλυμα λύσης και ακολουθεί λύση των κυττάρων με άσκηση μεγάλης μηχανικής δύναμης με το μηχάνημα του French Press. Τα αναδιαλυμένα κύτταρα εισάγονται στην ειδική μεταλική οβίδα του μηχανήματος, το οποίο έχει εσωτερικά ένα κινούμενο έμβολο, μια οπή εξόδου και μια στρόφιγγα από όπου ρυθμίζεται ο ρυθμός εξόδου του λύματος. Η οβίδα τοποθετείται καλά κλειστή πάνω σε μια ειδική τράπεζα (το έμβολο βρίσκεται από πάνω) και αφού ρυθμιστεί η επιθυμητή πίεση άσκησης (600PSI), ενεργοποιείται η συσκευή. Η ειδική τράπεζα κινείται προς τα πάνω και το έμβολο που βρίσκει αντίσταση, αρχίζει να εισέρχεται στο εσωτερικό της οβίδας. Αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται ο όγκος στο εσωτερικό της οβίδας, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πίεση που ασκείται. Όταν η ένδειξη της πίεσης φτάσει στο επιθυμητό, ανοίγεται η στρόφιγγα και αρχίζει το λύμα να εξέρχεται μέσω της οπής εξόδου. Ο ρυθμός εξόδου ρυθμίζεται έτσι ώστε η πίεση στο εσωτερικό της οβίδας να παραμένει σταθερή (600PSI). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά και στην συνέχεια ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στα 100.000 xg, για 1 h, στους 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο και προστίθεται ιμιδαζόλιο και β-μερκαπτοαιθανόλη με τελική συγκέντρωση 10 mM για το κάθε ένα. Προστίθεται το υπερκείμενο σε χρωματογραφική στήλη που περιέχει την ρητίνη νικελίου. Η ρητίνη νικελίου έχει προετοιμαστεί να βρίσκεται σε διάλυμα εξισορρόπησης ρητίνης νικελίου. Αφού φύγει το υπερκείμενο, ξεπλένεται η ρητίνη νικελίου με 5 όγκους στήλης και στη συνέχεια προστίθενται 10 όγκους στήλης από το διάλυμα έκλυσης συγκέντρωσης

250mM ιμιδαζολίου. Το έκλουσμα συλλέγεται, προστίθεται σε συσκευή συμπύκνωσης με φίλτρο πόρων 10kDa και φυγοκεντρείται στα 6000 xg, στους 4°C, μέχρι να μείνει στην συσκευή όγκος ~500 μL, προστίθονται 15 mL διαλύματος αλλαγής και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες τρεις φορές. Τέλος, αφού μετρηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και DTT με τελική συγκέντρωση 5 mM, μοιράζεται σε σωλήνες erpendorf και φυλάσσεται στους -80°C.

### **3.32 Πληθυσμός ασθενών**

#### **3.32.1 Άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL**

Τα άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL που μελετήθηκαν ήταν ετεροζυγώτες, διπλά ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες για μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες apoA-I, ABCA1 και LCAT. Έγινε επίσης λήψη ορού από κάποια άτομα των οικογενειών των ασθενών, οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλάξεις για τα παραπάνω γονίδια (άτομα αναφοράς). Όλες οι οικογένειες ήταν ολλανδικής καταγωγής. Ελήφθη έγγραφη συγκατάθεση από τα άτομα για την λήψη και αποθήκευση αίματος, καθώς και πραγματοποίηση γενετικής και βιοχημικής ανάλυσης. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής & δεοντολογίας του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ.

#### **3.32.2 Άτομα με στεφανιαία νόσο**

Μελετήθηκαν άτομα με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease), άτομα με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), καθώς και άτομα αναφοράς, δεν έχουν κάποιο από τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου). Η ηλικία των ατόμων ήταν μεταξύ 40 και 70 ετών και συμμετείχαν συνεχόμενα στην μελέτη του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης. Η διάγνωση των ατόμων με SCAD και ACS έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικάνικης Καρδιολογικής Εταιρείας [226,227]. Συνοπτικά, από τα άτομα με ACS λήφθηκε αίμα εντός 12 h από την στιγμή της έναρξης των συμπτωμάτων τους και βρίσκονταν σε νηστεία για τουλάχιστον 12 h. Ασθενείς δεν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη εάν υπήρχε ένδειξη συνύπαρξης μόλυνσης, φλεγμονώδους ή αυτοάνοσης διαταραχής, διαβήτη, προχωρημένης νεφρικής ή ηπατικής ανεπάρκειας, νεοπλαστικής διαταραχής ή ιστορικού σοβαρού χειρουργείου ή τραύματος τον προηγούμενο μήνα. Η επιλογή των ατόμων αναφοράς που συμμετείχαν έγινε με κριτήριο την αντίστοιχη ηλικία και φύλο με τους ασθενείς και πραγματοποιήθηκε από την Υπηρεσία Δωρεάς Αίματος του



Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης. Τα άτομα αναφοράς δεν είχαν κάποιο από τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου (σύμφωνα με το ιστορικό τους, τις κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις) ή άλλες διαταραχές. Ελήφθη έγγραφη συγκατάθεση από τα άτομα πριν την συμμετοχή τους στην μελέτη και η μελέτη εγκρίθηκε από το τοπική επιτροπή ηθικής (Kantonale Ethik-Kommission, Zurich, Switzerland).

### **3.33 Στατιστική ανάλυση**

Όλες οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι μεταβλητές ανάμεσα σε δυο ομάδες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το unpaired, two-tailed *t*-test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p < 0,05$ . Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού στατιστικής Graph Pad Prism 4.0.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**4.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HDL από άτομα με συγκεκριμένες διαταραχές του μεταβολισμού της HDL ή από άτομα με στεφανιαία νόσο.**

**4.1.1 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και των υποπληθυσμών της που περιέχουν apoA-I από άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL**

Την περασμένη δεκαετία, έχουν εμφανιστεί στο προσκήνιο δεδομένα που υποδηλώνουν ότι γενετικοί παράγοντες ρυθμίζουν τόσο τα επίπεδα της HDL-c όσο και την λειτουργικότητα της HDL [228]. Επίσης, ένας ολοένα αυξανόμενος όγκος δεδομένων υποδηλώνουν ότι οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL προσδιορίζονται καλύτερα από την ποιότητα της παρά από την ποσότητα της [228]. Μεταλλάξεις σε διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβολισμού της HDL μπορούν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές και να αναστείλλουν την βιογένεση της HDL ή / και να οδηγήσουν σε σχηματισμό HDL σωματιδίων με ανώμαλη σύσταση, σχήμα, μέγεθος ή και λειτουργίες.

Σε προηγούμενη μελέτη μας είχαμε κάνει έναν αρχικό χαρακτηρισμό των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και των HDL υποπληθυσμών από άτομα με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες apoA-I, ABCA1 και LCAT που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της HDL [203]. Στην παρούσα μελέτη επεκτείναμε τον χαρακτηρισμό 1) εξετάζοντας μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια ABCA1 και LCAT) και 2) αναλύοντας που οφείλονται οι αλλαγές στις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL. Για να συγκρίνουμε τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL ατόμων με μεταλλάξεις στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL και ατόμων αναφοράς χρησιμοποιήσαμε την φθορισμομετρική δοκιμασία του DCF (ενότητα 3.2). Στη δοκιμασία αυτή η ποσότητα της HDL που χρησιμοποιήθηκε κανονικοποιήθηκε για τις διαφορές της συγκέντρωσης της σε χοληστερόλη. Έτσι, οποιαδήποτε διαφορά παρατηρήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν αποτέλεσμα της μειωμένης λειτουργικότητας της HDL και όχι των μειωμένων επιπέδων της HDL. Επιπλέον, για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω τις

αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL, μετρήσαμε την δραστικότητα των ενζύμων της HDL PON1, PAF-AH και LCAT και τα επίπεδα των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (κυρίως μηλονική-δι-αλδεΐδη, MDA: malondialdehyde). Τέλος, μετρήσαμε τα επίπεδα των προφλεγμονωδών μορίων PAF και SAA της HDL [141,229].

Τα άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL που μελετήθηκαν ήταν ετεροζυγώτες, διπλά ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες για μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες apoA-I, ABCA1 και LCAT. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκε ορός από 3 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.L202P στο γονίδιο της apoA-I (apoA-I Het) (NM\_000039) (που ονομαζόταν μέχρι πρόσφατα L178P) [230], 6 ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο του ABCA1 (NM\_005502) (ABCA1 Het) (p.C1477R, n=3; p.L1056P, n=3), 2 διπλά ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο του ABCA1 (ABCA1 Com) (p.C1477R/IVS25+1G>C; p.Q1038X/p.N1800H), 1 ομοζυγώτη για μετάλλαξη στο γονίδιο του ABCA1 p.L1056P (ABCA1 Hom), 12 ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT (LCAT Het) (NM\_000229) (p.P34Q, n=1; p.Y107X, n=1; p.T147I, n=4; p.N155D, n=2; p.I202T, n=1; p.R322C, n=2, p.V333M, n=1), 3 διπλά ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT (LCAT Com) p.T147I/IVS4-22T>C και 1 ομοζυγώτη για τη μετάλλαξη p.N155D στο γονίδιο του LCAT (LCAT Hom). Έγινε επίσης λήψη ορού από κάποια άτομα των οικογενειών των ασθενών, οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλάξεις για τα παραπάνω γονίδια (άτομα αναφοράς) (n=3 για τους φορείς της μετάλλαξης της apoA-I, n=8 για τους φορείς των μεταλλάξεων του ABCA1, n=7 για τους φορείς των μεταλλάξεων της LCAT) και χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση. Όλες οι οικογένειες ήταν ολλανδικής καταγωγής και όλες έχουν περιγραφεί προηγουμένως [230-241] εκτός από την μετάλλαξη p.R322C της LCAT. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τους συνεργάτες μας στο εργαστήριο του Dr. Jan Albert Kuivenhoven, στο τμήμα Αγγειακής Ιατρικής, του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ.

#### **4.1.1.1 Ετεροζυγώτες για την apoA-I[p.L202P] και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών**

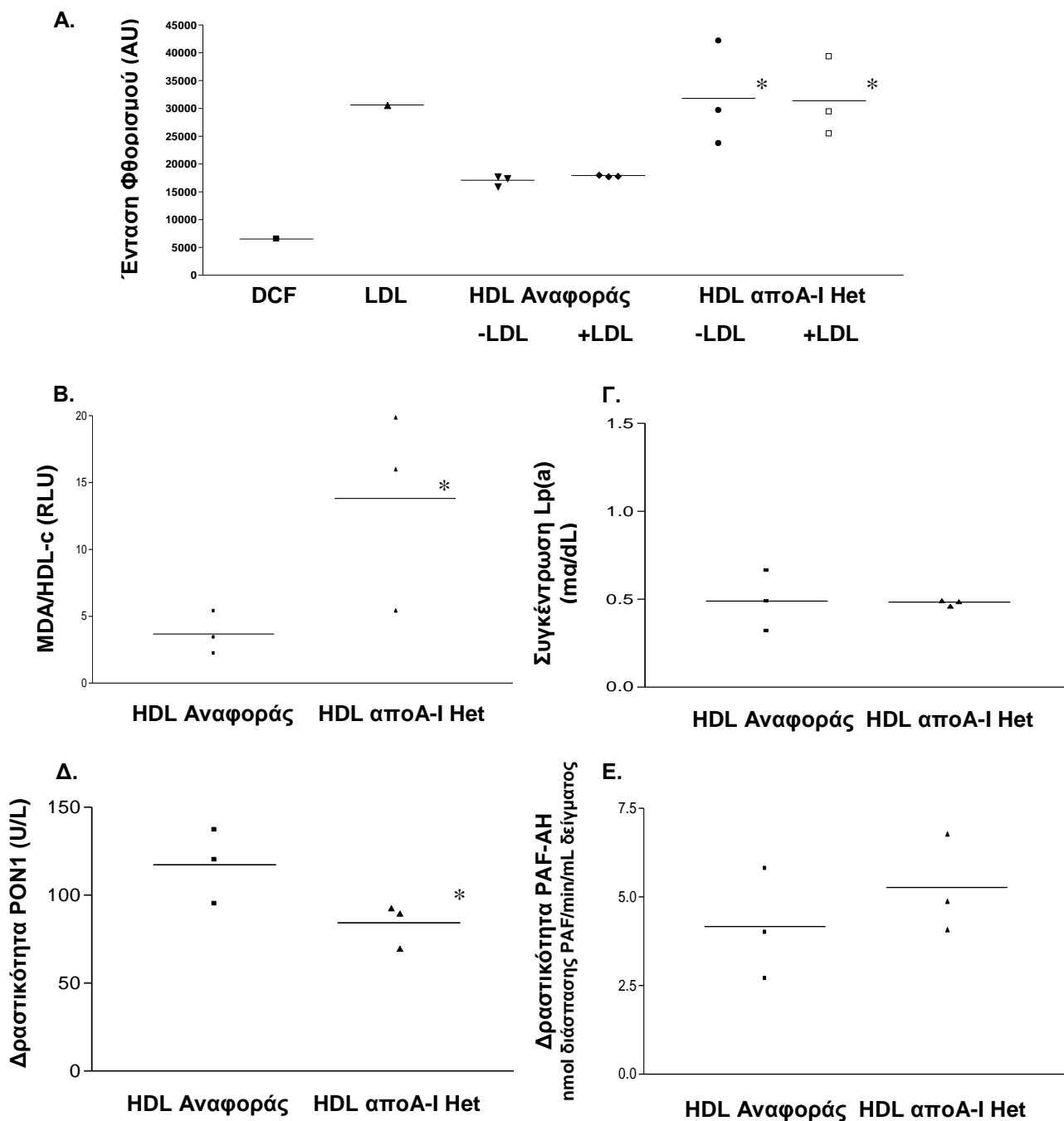
Οι ετεροζυγώτες για την apoA-I[p.L202P] (apoA-I Het) (N=3) παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα της HDL-c, της apoA-I, της apoA-II και τις ολικής χοληστερόλης (TC) 56%, 47%, 37% και 21% αντίστοιχα, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (N=3) (Πίνακας 4.1). Αφού έγινε απομόνωση της HDL από τον ορό των ατόμων με τη διαδικασία καθίζησης μέσω θειϊκής δεξτράνης-Mg<sup>2+</sup> (ενότητα 3.1), χαρακτηρίστηκαν οι

αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL των αποΑ-I Ηet όπως περιγράφεται παρακάτω και συγκρίθηκαν με αυτές των ατόμων αναφοράς.

Όπως είχαμε δείξει (**Εικόνα 4.1A**) [203] φαίνεται ότι η HDL των ατόμων αναφοράς που επωάστηκαν απουσία LDL, προστατεύει την οξειδωση του DCFH και την απελευθέρωση του DCF, δίνοντας χαμηλό σήμα φθορισμού συγκριτικά με το σήμα που παράγεται από την οξειδωμένη LDL. Επιπλέον, η HDL των ατόμων αναφοράς επωασμένη με την οξειδωμένη LDL ήταν ικανή να μειώσει το σήμα φθορισμού.

**Πίνακας 4.1. Συγκεντρώσεις των λιπιδίων και των απολιποπρωτεϊνών του ορού ατόμων με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL και ατόμων αναφοράς των οικογενειών των ασθενών.** Οι τιμές αφορούν μέσους όρους, συμπεριλαμβανομένου τυπικής απόκλισης, με μονάδα μέτρησης το mg/dL.nd: μη ανιχνεύσιμο, Διπλά Ετεροζυγώτης 1: ABCA1[p.C1477R/IVS25+1GNC], Διπλά Ετεροζυγώτης 2: ABCA1[p.Q1038X/ p.N1800H]. Οι αστερίσκοι υποδικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

	Άρρεν/ Θήλυ	TC	HDL-c	αποΑ-I	αποΑ-II	LDL-c	αποB	TG
<b>Μεταλλάξεις στην αποΑ-I</b>								
Άτομα αναφοράς (n=3)	1/2	179±27	45±3	163±13	30±1	131±22	97±15	97±25
Ετεροζυγώτες (n=3)	1/2	141±12*	20±14*	87±38*	19±6*	113±5	85±6	97±45
<b>Μεταλλάξεις στον ABCA1</b>								
Άτομα αναφοράς (n=8)	4/4	171±56	57±15	160±29	30±4	111±23	84±12	85±20
Ετεροζυγώτες (n=6)	3/3	179±64	37±7**	124±12**	28±2	129±35	98±22	90±44
Διπλά Ετεροζυγώτης 1 (n=1)	1/0	54	6	4	2	44	75	138
Διπλά Ετεροζυγώτης 2 (n=1)	0/1	220	3	7	nd	173	192	387
Ομοζυγώτης (n=1)	0/1	63	0.8	nd	nd	61	81	87
<b>Μεταλλάξεις στην LCAT</b>								
Άτομα αναφοράς (n=7)	5/2	199±32	49±13	166±19	31±2	134±28	100±20	123±58
Ετεροζυγώτες (n=12)	8/4	166±47	32±11**	122±27***	26±5*	122±38	97±28	115±49
Διπλά Ετεροζυγώτες (n=3)	0/3	140±24*	5±1***	48±8***	3.8±0.3***	118±17	102±27	244±103*
Ομοζυγώτης (n=1)	1/0	107	3	58	4	77	118	279



**Εικόνα 4.1.** Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών για την apoA-I [p.L202P] (apoA-I Het) καθώς και των ατόμων αναφοράς. **A).** Αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL που μετρήθηκαν με την δοκιμασία του DCF. Η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης του DCFH. Ελέγχθηκε η επίδραση της HDL στην ένταση του φθορισμού παρουσία και απουσία οξειδωμένης LDL, η οποία μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο. \* $p < 0.05$  για την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των apoA-I Het συγκριτικά με την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. AU: αυθαίρετες μονάδες. **B)** Επίπεδα MDA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c. \* $p < 0.05$  για την HDL των apoA-I Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. RLU: σχετικές μονάδες. **Γ)** Συγκέντρωση Lp(a) στις απομονωμένες HDL. **Δ)** Δραστηκότητα του ενζύμου PON1 της HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL των apoA-I Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. **Ε)** Δραστηκότητα του ενζύμου PAF-AH της HDL. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

Αντιθέτως, η HDL των αποΑ-I Het επωασμένη απουσία ή παρουσία της LDL αύξησε το σήμα φθορισμού κατά 86% ( $p=0.027$ ) and 75% ( $p=0.015$ ), αντιστοίχως συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η HDL των αποΑ-I Het έχει μειωμένη αντι-οξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Το γεγονός ότι η HDL των αποΑ-I Het έχει μειωμένη αντι-οξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, όπως βρέθηκε με την δοκιμασία του DCF, δεν οφειλόταν σε συναπομόνωση μαζί με την HDL άλλων λιποπρωτεϊνών χαμηλότερης πυκνότητας, οι οποίες αν ήταν οξειδωμένες θα συνεισέφεραν στην αύξηση της έντασης φθορισμού στην δοκιμασία του DCF. Αυτό διαπιστώθηκε μέσω ελέγχου της ύπαρξη της λιποπρωτεΐνης α [Lp(a)] στην απομονωμένη HDL με την ένζυμο-σύνδετη ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία τύπου «sandwich» (ενότητα 3.5). Η Lp(a) είναι μια λιποπρωτεΐνη που ομοιάζει με την LDL και θεωρείται παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου [242]. Εντοπίστηκαν πολύ μικρές συγκεντρώσεις της, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ ατόμων αναφοράς και αποΑ-I Het (**Εικόνα 4.1Γ**), επομένως δεν μπορούμε να αποδώσουμε την αύξηση της έντασης φθορισμού στα άτομα αυτά στην συναπομόνωση Lp(a).

Γιατί όμως οι αποΑ-I Het να έχουν πιο οξειδωμένες/προφλεγμονώδεις HDL συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς; Σε μια προσπάθεια να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, προσδιορίστηκαν οι δραστηριότητες των ενζύμων PON1 (ενότητα 3.4), PAF-AH (ενότητα 3.3) και LCAT [203] και τα επίπεδα του SAA (ενότητα 3.5), του PAF (ενότητα 3.5) και της MDA (ενότητα 3.6) στην HDL των ατόμων. Επίσης έγινε κανονικοποίηση των επιπέδων της MDA και του SAA ως προς τα επίπεδα της HDL-c (MDA/HDL-c και SAA/HDL-c), καθώς μπορεί τα επίπεδα του MDA και του SAA να ήταν παρόμοια σε αποΑ-I Het και άτομα αναφοράς, αλλά επειδή τα άτομα αυτά έχουν λιγότερη HDL, θα μπορούσαν να βρίσκονται αυτοί οι παράγοντες σε μεγαλύτερη πυκνότητα στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων τους και να επηρεάζουν έτσι τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL.

Η PON1 είναι εστεράση και υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια, ενώ η PAF-AH υδρολύει φωσφολιπίδια που είναι οξειδωμένα στην sn-2 θέση τους. Και οι δυο συνεισφέρουν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL [243,244]. Η LCAT έχει δραστηριότητα φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> (PL-A<sub>2</sub>) και μπορεί να απομακρύνει οξειδωμένες ακυλο-αλυσίδες κυρίως από φωσφατιδυλο-χολίνη (PC), παράγοντας λυσο-φωσφατιδυλο-χολίνη και προϊόντα οξειδωσης λιπαρών οξέων [145]. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια επάγουν περαιτέρω την οξειδωση και την φλεγμονή [142]. Επίσης, η ύπαρξη SAA και PAF στην HDL υποστηρίζεται πως αντανακλά στην αθηρογονικότητα

της [245,246], ενώ το MDA είναι ένα φυσικά απαντώμενο προϊόν υπεροξειδωσής των λιπιδίων και χρησιμοποιείται σαν δείκτης οξειδωτικού στρες σε κύτταρα και ιστούς [205,206]. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων, τα οποία προέρχονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι ασταθή και διασπώνται για να σχηματίσουν μια σειρά από συμπλέγματα ενώσεων, τα οποία περιλαμβάνουν δραστικές καρβονυλικές ενώσεις, όπως είναι το MDA.

Στην HDL των αποΑ-I Het βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική 37% μείωση της δραστικότητας της PON1 ( $p=0,032$ ) (**Εικόνα 4.1Δ**), στατιστικά σημαντική αύξηση 94% των επιπέδων PAF ( $p=0,039$ ) (**Εικόνα 4.2Γ**) και στατιστικά σημαντική αύξηση 277% του λόγου MDA/HDL-c ( $p=0,042$ ) (**Εικόνα 4.2Γ**), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη δραστικότητα της PAF-AH ( $p=0,20$ ) (**Εικόνα 4.1Ε**), στην δραστικότητα της LCAT [203] και στα επίπεδα SAA/HDL-c ( $p=0,15$ ) (**Εικόνα 4.2Α**). Συνολικά τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι οι αποΑ-I Het έχουν οξειδωμένη / προφλεγμονώδη HDL λόγω της μειωμένης δραστικότητας PON1 και των αυξημένων επιπέδων PAF της HDL σε σχέση με τα άτομα αναφοράς.

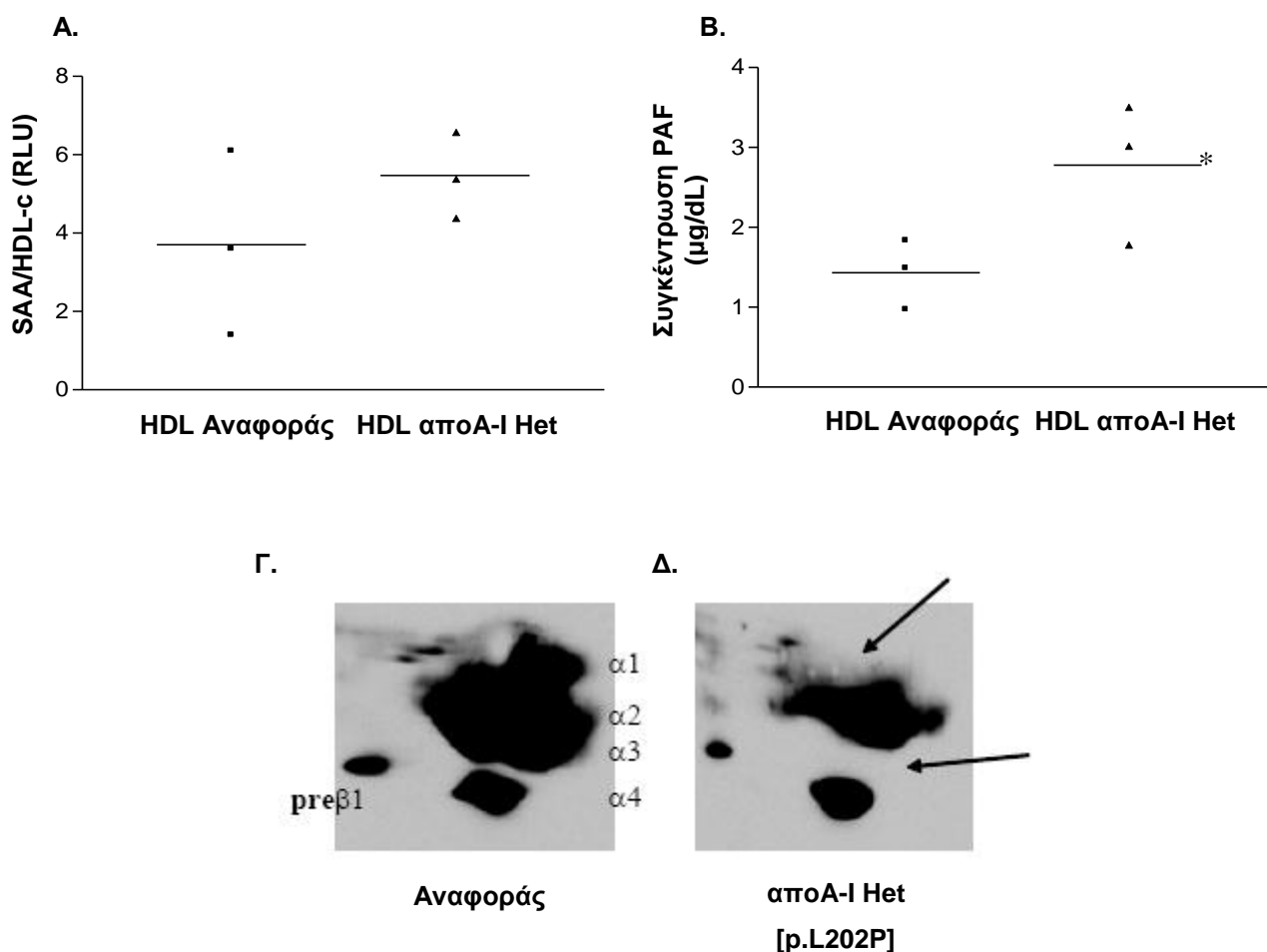
Όσον αφορά την ανάλυση των HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποΑ-I με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, οι αποΑ-I Het παρουσίασαν έλλειψη του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού που περιέχει αποΑ-I (**Εικόνα 4.2Ε**), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.2Δ**). Επίσης, παρατηρήθηκε μια ευδιάκριτη μείωση του  $\alpha_3$  υποπληθυσμού που περιέχει αποΑ-I στους αποΑ-I Het συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς.

#### **4.1.1.2 Φορείς μεταλλάξεων στον ABCA1, καθώς και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών**

Όπως φαίνεται στον **πίνακα 4.1**, οι ABCA1 Het παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση της HDL-c (35%) και της αποΑ-I (23%) συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Σε αντίθεση με τους αποΑ-I Het, δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της αποΑ-II από τους ABCA1 Het, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Οι ABCA1 Comp ή Hom εμφάνισαν υπερβολικά χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HDL-c, αποΑ-I και αποΑ-II στον ορό τους, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς.

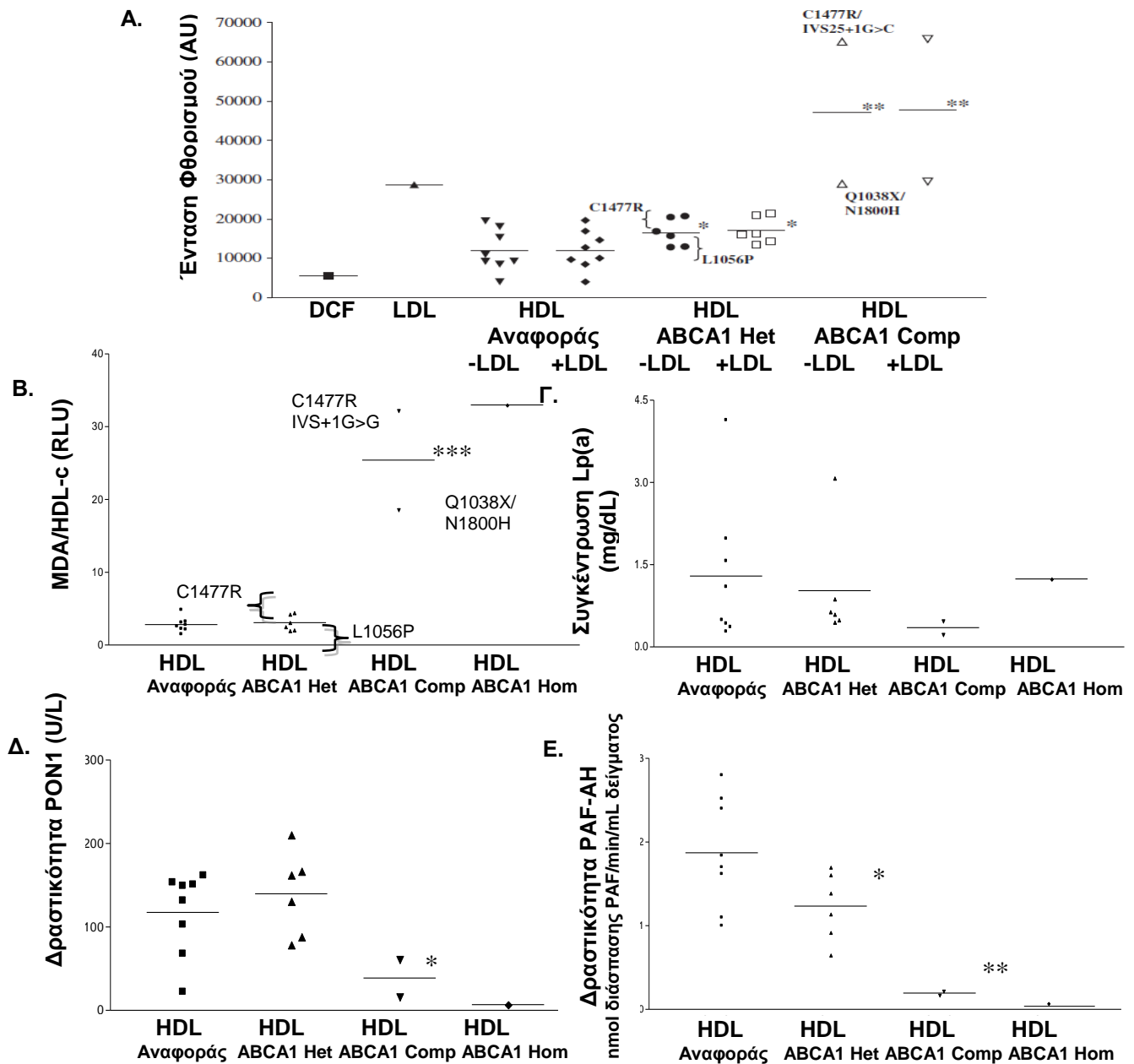
Όπως είχαμε δείξει [203,247], επώαση της HDL των ατόμων αναφοράς απουσία ή παρουσία της LDL είχε σαν αποτέλεσμα στην παραγωγή χαμηλού σήματος φθορισμού συγκριτικά με το σήμα που παράχθηκε από την οξειδωμένη LDL (**Εικόνα 4.3Α**). Επώαση της HDL των ABCA1 Het (p.C1477R, p.L1056P) απουσία ή παρουσία της LDL

οδήγησε στην αύξηση του σήματος φθορισμού κατά 39% ( $p=0.043$ ) και 41% ( $p=0.029$ ), αντίστοιχα,



**Εικόνα 4.2.** Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και ανάλυση των υποπληθυσμών της HDL ετεροζυγωτών για την apoA-I[p.L202P] (apoA-I Het) καθώς και των ατόμων αναφοράς. **A)** Επίπεδα SAA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c στην HDL. RLU: Σχετικές μονάδες **B)** Επίπεδα της PAF της HDL. \* $p<0.05$  για την HDL των apoA-I Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. **Γ-Δ)** Ανάλυση του ορού των apoA-I Het καθώς και των ατόμων αναφοράς με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων και ανοσοαποτύπωση κατά western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης apoA-I. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.





**Εικόνα 4.3.** Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για τον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των ατόμων αναφοράς. **A.** Αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL που μετρήθηκαν με την δοκιμασία του DCF. Η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης του DCFH. Ελέγχθηκε η επίδραση της HDL στην ένταση του φθορισμού παρουσία και απουσία οξειδωμένης LDL, η οποία μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο. \* $p < 0.05$  για την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ABCA1 Het συγκριτικά με την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. \*\* $p < 0.01$  για την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ABCA1 Comp συγκριτικά με την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. AU: αυθαίρετες μονάδες. **B.** Επίπεδα MDA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c. \*\*\* $p < 0.0001$  για την HDL των ABCA1 Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. RLU: σχετικές μονάδες. **Γ.** Συγκέντρωση Lp(a) στις απομονωμένες HDL. **Δ.** Δραστικότητα του ενζύμου PON1 της HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL των αποA-I Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. \* $p < 0.05$  για την HDL των ABCA1 Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. **Ε.** Δραστικότητα του ενζύμου PAF-AH της HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL των ABCA1 Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς.

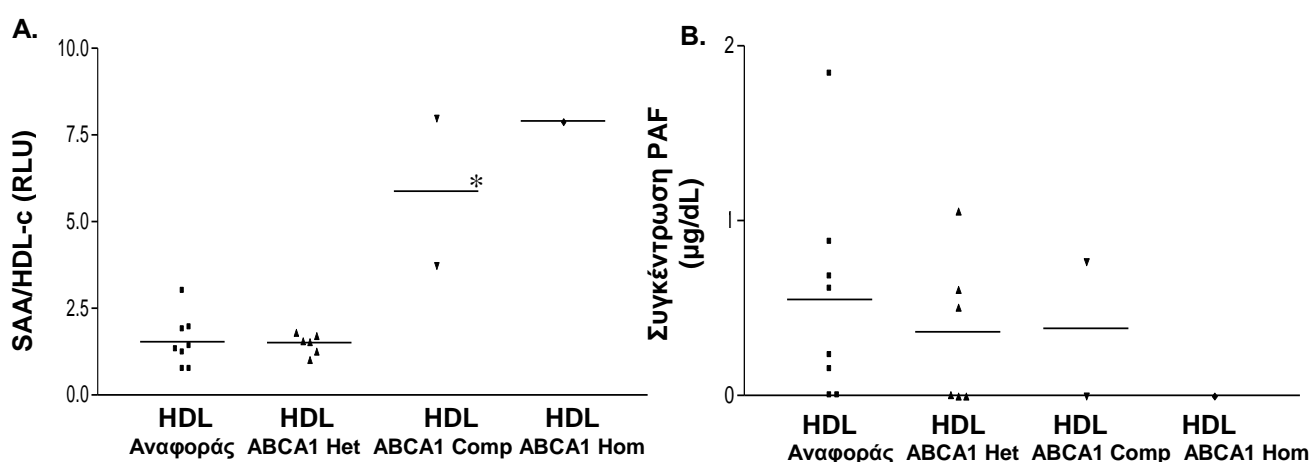
\*\* $p < 0.01$  για την HDL των ABCA1 Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Μάλιστα, οι ABCA1 Het (p.C1477R) είχαν μεγαλύτερο σήμα φθορισμού (απουσία και παρουσία LDL) συγκριτικά με τους ABCA1 Het (p.L1056P). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της Lp(a) ανάμεσα στους ABCA1 Het, Comp, Hom και άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.3B-Γ**). Με εκτενέστερη ανάλυση των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των ατόμων αυτών, παρατηρήθηκε στην HDL των ABCA1 Het στατιστικά σημαντική μείωση 32% της PAF-AH ( $p=0,047$ ) (**Εικόνα 4.3E**) Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην δραστικότητα της PON1 ( $p=0,214$ ) (**Εικόνα 4.3Δ**), στη δραστικότητα της LCAT [203,247], στα επίπεδα SAA/HDL-c ( $p=0,469$ ) (**Εικόνα 4.4A**), στα επίπεδα του PAF ( $p=0,275$ ) (**Εικόνα 4.4B**) και τα επίπεδα του MDA/HDL-c ( $p=0,325$ ) (**Εικόνα 4.3B**), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και ο μέσος όρος των επιπέδων MDA/HDL-c στους ABCA1 Het δεν αυξήθηκε συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, παρατηρήθηκε ότι οι ABCA1 Het p.C1477R είχαν μεγαλύτερα επίπεδα MDA/HDL-c συγκριτικά με τους ABCA1 Het p.L1056P, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την δοκιμασία του DCF. Συνολικά φαίνεται ότι η μείωση της δραστικότητας της PAF-AH της HDL των ABCA1 Het θα μπορούσε να εξηγήσει την ύπαρξη πιο οξειδωμένων/προφλεγμονωδών HDL, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς.

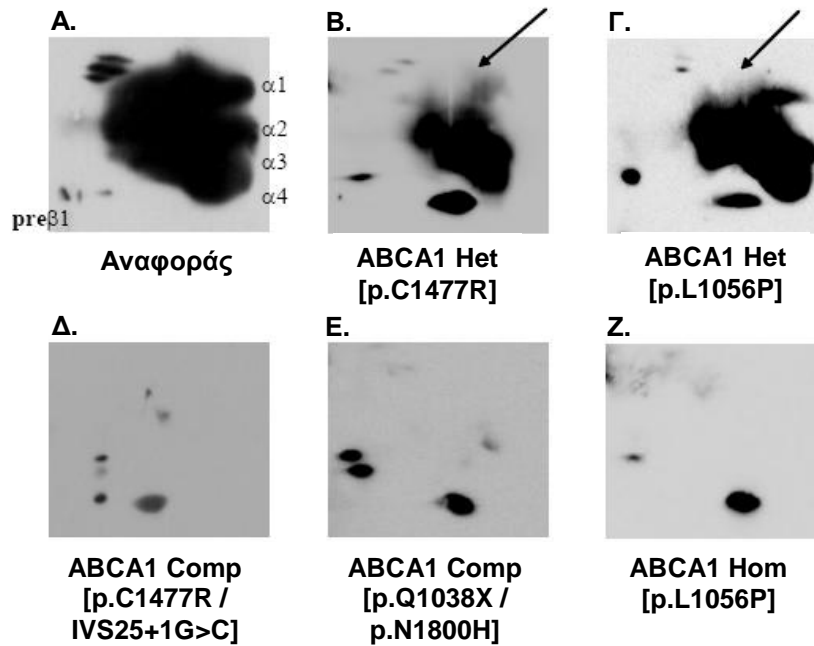
Επώαση HDL των ABCA1 Comp απουσία ή παρουσία της LDL οδήγησε σε παραγωγή σήματος φθορισμού αντίστοιχου ή μεγαλύτερου από αυτό που παράχθηκε από την οξειδωμένη LDL (**Εικόνα 4.3A**) [203,247]. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της Lp(a) ανάμεσα στους ABCA1 Het και άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.3Γ**). Στους ABCA1 Comp παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστικότητας τόσο της PON1 κατά 67% ( $p=0,036$ ) (**Εικόνα 4.3Δ**), όσο και της PAF-AH κατά 89% ( $p=0,0061$ ) (**Εικόνα 4.3E**). Τα επίπεδα των SAA/HDL-c και MDA/HDL-c ήταν αυξημένα κατά 296% ( $p=0,0015$ ) (**Εικόνα 4.4A**) και 803% ( $p < 0,0001$ ) (**Εικόνα 4.3B**), αντίστοιχα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην δραστικότητα του ενζύμου LCAT [203,247] και στα επίπεδα του PAF ( $p=0,37$ ) (**Εικόνα 4.4B**). Παρόμοια με τους διπλά ετερόζυγους αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν και στον ομόζυγο. Πιο συγκεκριμένα, αν και δεν έγινε ανάλυση των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL αυτού του ατόμου με την δοκιμασία του DCF, επειδή τα επίπεδα της HDL ήταν υπερβολικά χαμηλά, παρατηρήθηκε 1072% αύξηση των επιπέδων MDA/HDL-c (**Εικόνα 4.3B**), 451% αύξηση του λόγου SAA/HDL-c (**Εικόνα 4.4A**), 96% μείωση της δραστικότητας του ενζύμου PAF-AH (**Εικόνα 4.3E**), 94% μείωση της δραστικότητας του ενζύμου PON1

(**Εικόνα 4.3Δ**) και 60% μείωση στην δραστικότητα του ενζύμου LCAT [203,247], συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ τα επίπεδα του PAF δεν ήταν ανιχνεύσιμα (**Εικόνα 4.4B**). Επομένως η μείωση της δραστικότητας της PON1 και της PAF-AH και τα αυξημένα επίπεδα SAA της HDL μπορούσαν να δικαιολογήσουν την ύπαρξη πιο οξειδωμένων/προφλεγμονωδών HDL στους ABCA1 Comp / Hom συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς.

Τέλος, έγινε ανάλυση των HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποΑ-I με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, όπως είχαμε δείξει και παλαιότερα [203,247]. Οι ABCA1 Het παρουσίασαν μια εκτεταμένου βαθμού μείωση του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού που περιέχει αποΑ-I (**Εικόνα 4.5 B-Γ**), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.5 A**). Στους ABCA1 Comp και Hom παρατηρήθηκε η ύπαρξη μόνο των υψηλής κινητικότητας  $\alpha_4$  και προ- $\beta$  HDL υποπληθυσμών που περιέχει αποΑ-I (**Εικόνα 4.5 Δ-Z**), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.5 A**). Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι μεταλλάξεις στον ABCA1 επηρεάζει την δομή και τις λειτουργίες της HDL και πως ο ABCA1 μπορεί να συνεισφέρει στις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL.



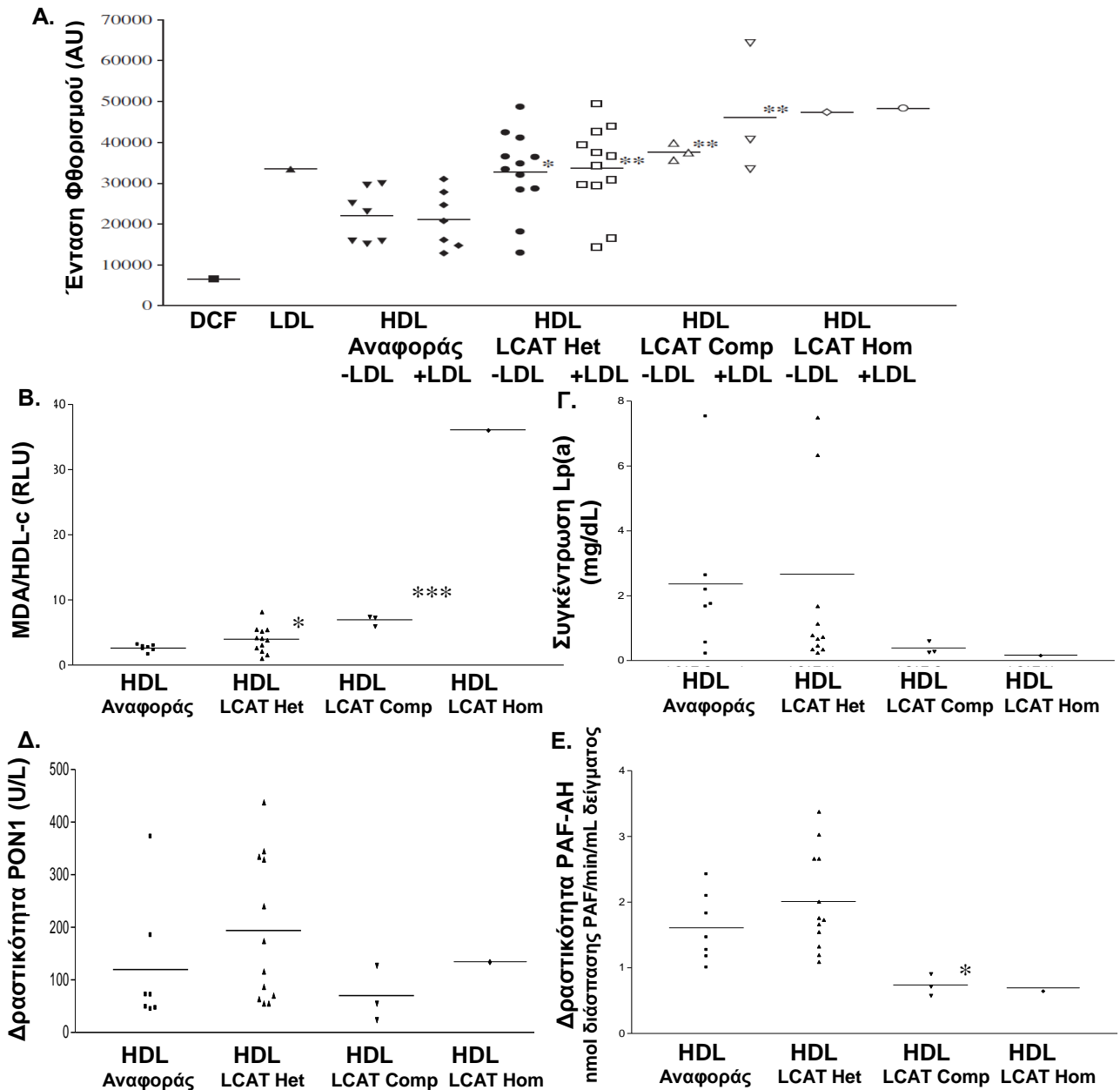
**Εικόνα 4.4.** Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για τον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των ατόμων αναφοράς. **A)** Επίπεδα SAA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c στην HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL των ABCA1 Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. RLU: Σχετικές μονάδες **B)** Επίπεδα της PAF της HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.



**Εικόνα 4.5.** Ανάλυση των υποπληθυσμών της ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για μεταλλάξει στον ABCA1 (Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1), καθώς και των απόμων αναφοράς. Ανάλυση του ορού των Het ABCA1, Comp ABCA1, Hom ABCA1 καθώς και των απόμων αναφοράς με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων και ανοσοαποτύπωση κατά western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης αποA-I.

#### 4.1.1.3 Φορείς μεταλλάξεων στην LCAT, καθώς και άτομα αναφοράς των οικογενειών των ασθενών

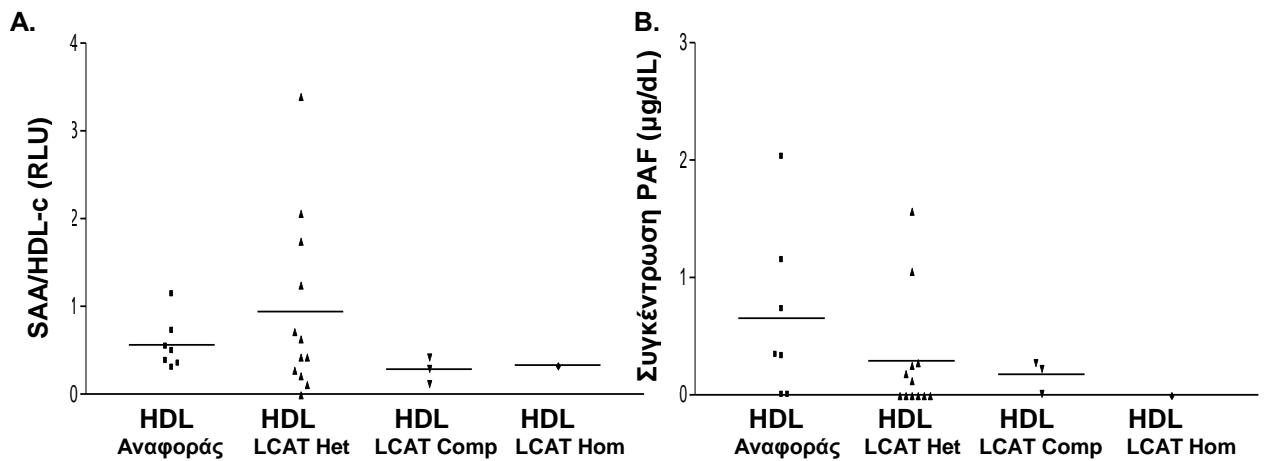
Οι LCAT Het εμφάνισαν σημαντική μείωση της HDL-c (35%), της αποA-I (27%) και της αποA-II (16%) συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Πίνακας 4.1**). Οι LCAT Comp και Hom είχαν πολύ μεγάλη μείωση της HDL-c (90%), της αποA-I (71%) και της αποA-II(88%) συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Πίνακας 4.1**). Η HDL από τους LCAT Het που επωάστηκε απουσία και παρουσία οξειδωμένης LDL αύξησε, κατά μέσο όρο το σήμα φθορισμού σε αντίστοιχο επίπεδο με αυτό της οξειδωμένης LDL (**Εικόνα 4.6A**). Η HDL από τους LCAT Comp και Hom απουσία και παρουσία οξειδωμένης LDL οδήγησε σε παραγωγή σήματος φθορισμού αντίστοιχο ή υψηλότερο από αυτό της οξειδωμένης LDL (**Εικόνα 4.6A**).



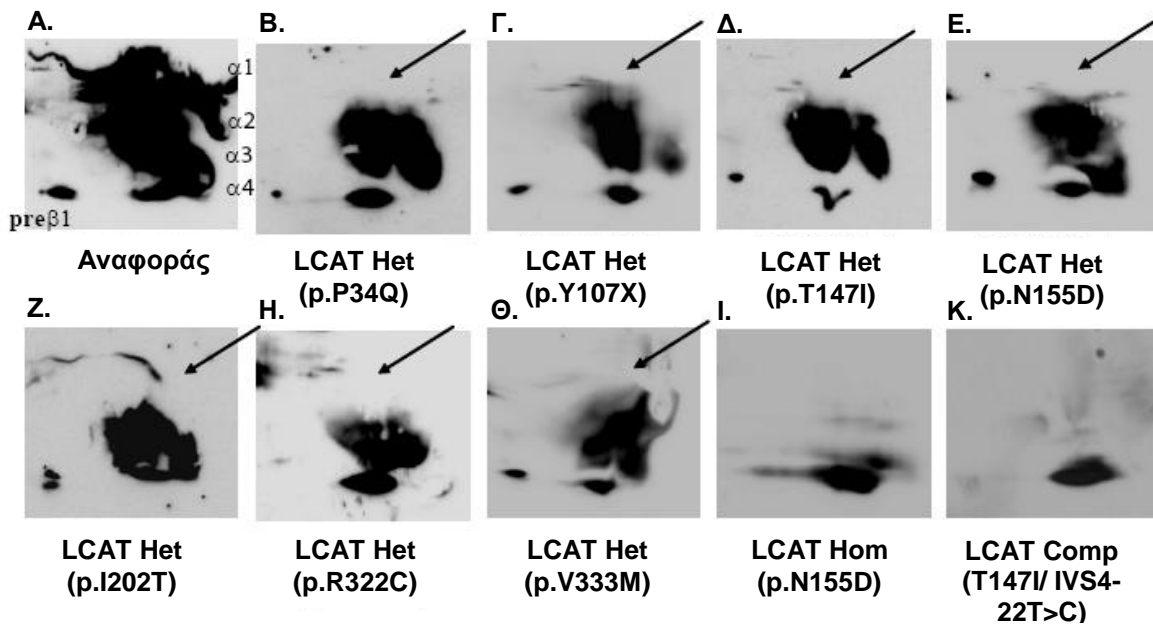
**Εικόνα 4.6.** Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για την LCAT (Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς. **A).** Αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL που μετρήθηκαν με την δοκιμασία του DCF. Η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης του DCFH. Ελέγχθηκε η επίδραση της HDL στην ένταση του φθορισμού παρουσία και απουσία οξειδωμένης LDL, η οποία μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο. \* $p < 0.05$  για την HDL (απουσία LDL) των LCAT Het συγκριτικά με την HDL (απουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. \*\* $p < 0.01$  για την HDL (παρουσία LDL) των LCAT Het συγκριτικά με την HDL (παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. \*\* $p < 0.01$  για την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των LCAT Comp συγκριτικά με την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. AU: αυθαίρετες μονάδες. **B)** Επίπεδα MDA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c. RLU: σχετικές μονάδες. \* $p < 0.05$  για την HDL των LCAT Het συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. \*\*\* $p < 0.0001$  για την HDL των LCAT Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. **Γ)** Συγκέντρωση Lp(a) στις απομονωμένες HDL. **Δ)** Δραστηκότητα του ενζύμου PON1 της HDL. **Ε)** Δραστηκότητα του ενζύμου PAF-AH της HDL. \* $p < 0.05$  για την HDL των LCAT Comp συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της Lp(α) ανάμεσα στους LCAT Het και στα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.6Γ**), ενώ η μείωση των επιπέδων της Lp(α) στους LCAT Comp και Hom, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.6Γ**), δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της δοκιμασίας του DCF. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως η HDL των LCAT Het, Comp και Hom είχαν 50% ( $p=0.04$ ), 166% ( $p<0.0001$ ) και 1280 % υψηλότερα επίπεδα MDA/ HDL-c, αντίστοιχα, σε σχέση με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.6B**). Επίσης, η δραστικότητα του ενζύμου LCAT της HDL μειώθηκε κατά 39% ( $p<0.0001$ ) στους LCAT Het, 94% ( $p<0.0001$ ) στους LCAT Comp και 80% στον LCAT Hom, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς ([203] και από συνεργάτες στο εργαστήριο του Dr Jan Albert Kuivenhoven). Η δραστικότητα του ενζύμου PAF-AH της HDL μειώθηκε επίσης κατά 54% ( $p=0.0126$ ) στους LCAT Comp και κατά 55% στον LCAT Hom, αλλά παρέμεινε ανεπηρέαστη στους LCAT Het συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς (**Εικόνα 4.6E**). Η δραστικότητα του ενζύμου PON1 (**Εικόνα 4.6Δ**) και των επιπέδων SAA/HDL-c (**Εικόνα 4.7A**) παρέμειναν ανεπηρέαστα σε όλους τους ασθενείς. Τα επίπεδα του PAF της HDL δεν επηρεάστηκαν στους LCAT Het, ενώ δεν μπόρεσαν να ανιχνευτούν στους LCAT Comp και Hom (**Εικόνα 4.7Γ**). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι οι LCAT Het έχουν οξειδωμένη /προφλεγμονώδη HDL λόγω της μειωμένης δραστικότητας LCAT και οι LCAT Comp και Hom λόγω της δραματικά μειωμένης δραστικότητας LCAT και PAF-AH σε σύγκριση με τα άτομα αναφοράς.

Τέλος, έγινε ανάλυση των HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποA-I με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Οι LCAT Het παρουσίασαν μια εκτεταμένου βαθμού μείωση του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού που περιέχει αποA-I (**Εικόνα 4.8B-H**) και σε ορισμένες περιπτώσεις εμφάνισαν επίσης μείωση του  $\alpha_2$  υποπληθυσμού (**Εικόνα 4.8Z-H**). Στους LCAT Comp και Hom η αποA-I βρέθηκε κυρίως στους γρήγορης κινητικότητας  $\alpha_4$  HDL υποπληθυσμούς, ενώ μικρή ποσότητα αποA-I βρέθηκε στον  $\alpha_3$  υποπληθυσμό (**Εικόνα 4.8I-K**).



**Εικόνα 4.7.** Χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL ετεροζυγωτών, διπλά ατόμων αναφοράς. **A)** Επίπεδα SAA της HDL κανονικοποιημένα προς HDL-c στην HDL. RLU: Σχετικές μονάδες **B)** Επίπεδα της PAF της HDL. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.



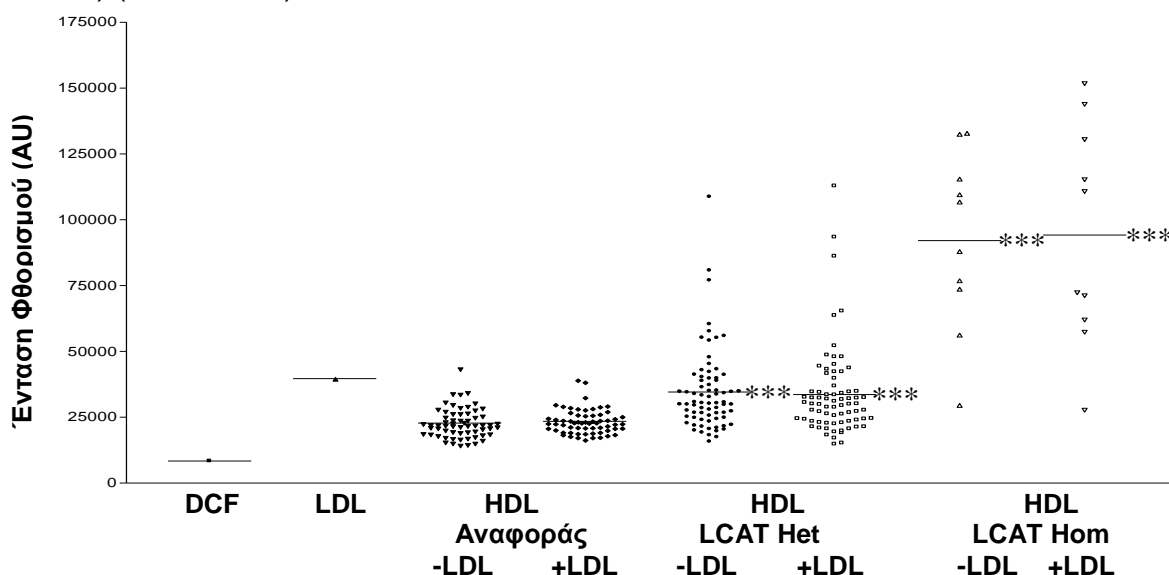
**Εικόνα 4.8.** Ανάλυση των υποπληθυσμών της ετεροζυγωτών, διπλά ετεροζυγωτών και ομοζυγώτη για μεταλλάξεις στην LCAT (Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς. Ανάλυση του ορού των Het LCAT, Comp LCAT, Hom LCAT καθώς και των ατόμων αναφοράς με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων και ανοσοαποτύπωση κατά western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης apoA-I.

#### 4.1.2 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από μεγάλο αριθμό ατόμων με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT

Σε μια προσπάθεια να διευκρινιστούν καλύτερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL στα άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT, εξετάστηκε μεγαλύτερο μέγεθος πληθυσμού προς επιβεβαίωση των προηγούμενων

αποτελεσμάτων. Έτσι μελετήθηκαν 74 Het, 10 Hom και 62 άτομα αναφοράς (άτομα με συγγένεια πρώτου, δευτέρου ή τρίτου βαθμού με τα άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT, καθώς και σύζυγοι. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τους συνεργάτες μας στο εργαστήριο του Dr. Jan Albert Kuivenhoven, στο τμήμα Αγγειακής Ιατρικής, του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ. Ελήφθη έγγραφη συγκατάθεση από τα άτομα για την λήψη και αποθήκευση αίματος, καθώς και πραγματοποίηση γενετικής και βιοχημικής ανάλυσης. Όλες οι οικογένειες ήταν ολλανδικής καταγωγής και η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής & δεοντολογίας του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ.

Τα επίπεδα της HDL-c και της apoA-I στους Het ήταν 40% και 21% χαμηλότερα, ενώ στους Hom η μείωση έφτασε στο 92% και 68%, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Οι Het είχαν μειωμένη δραστικότητα στην LCAT (29%), συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ οι Hom παρουσίασαν δραματική μείωση στην δραστικότητα αυτού του ενζύμου (97%) [248]. Τόσο οι Het, όσο και οι Hom είχαν πιο οξειδωμένες HDL απουσία της LDL, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς ( $p < 0,0001$  και στις 2 περιπτώσεις, αύξηση κατά 47% και 304%) (Εικόνα 4.9), και παρουσία της LDL, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς ( $p < 0,0001$  και στις 2 περιπτώσεις, αύξηση κατά 43% και 302%) (Εικόνα 4.9).



**Εικόνα 4.9.** Αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την LCAT (LCAT Het, LCAT Hom), καθώς και των ατόμων αναφοράς με την δοκιμασία του DCF. Η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης του DCFH. Ελέγχθηκε η επίδραση της HDL στην ένταση του φθορισμού παρουσία και απουσία LDL, η οποία μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο. \*\*\* $p < 0.0001$  για την HDL (απουσία και παρουσία LDL) των LCAT Het και LCAT Hom έναντι HDL (απουσία και παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. AU: αυθαίρετες μονάδες. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

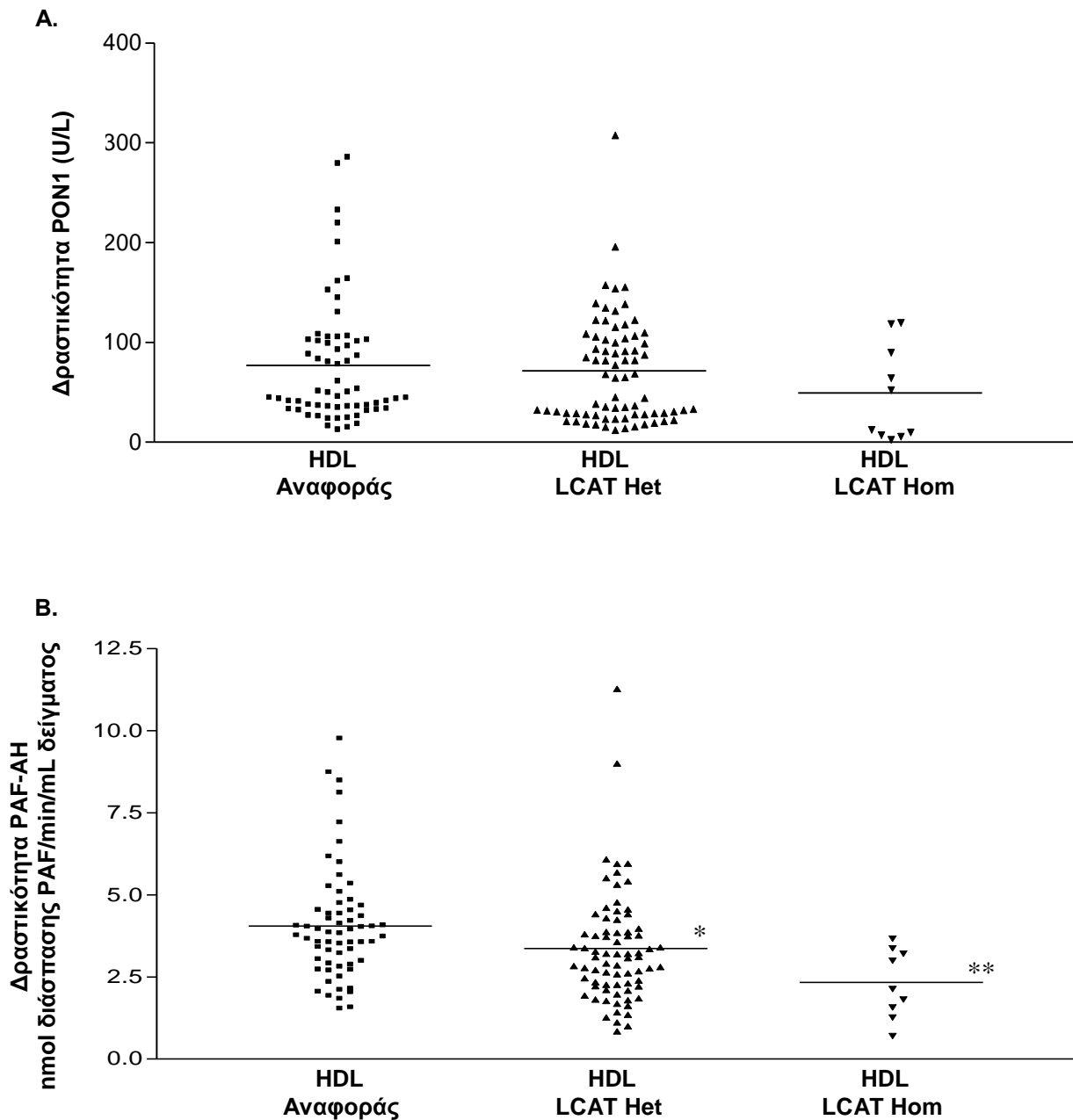


Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.9**, ο βαθμός της μείωσης της ικανότητα της HDL να αναστείλει τον σχηματισμό του DCF εξαρτάται από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (gene-dose-dependent). Αυτή η δόσοεξαρτώμενη μείωση της αντιοξειδωτικής ιδιότητας της HDL παρέμεινε και όταν συνεκτιμήθηκε η ηλικία, το φύλο, η μάζα δείκτης σώματος και η λήψη στατινών ( $P < 0.001$ ) [248].

Η δραστικότητα της PAF-AH παρουσιάστηκε μειωμένη στους Het και Hom κατά 17% ( $p = 0,01$ ) και 43% ( $p = 0,0023$ ) (**Εικόνα 4.10B**), αντίστοιχα, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ η δραστικότητα της PON1 έμεινε ανεπηρέαστη (**Εικόνα 4.10A**). Παρατηρήθηκε επομένως και η μείωση της δραστικότητας της PAF-AH να εξαρτάται από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (gene-dose-dependent).

Η παραπάνω μελέτη έγινε σε συνεργασία με τις ομάδες του Dr. Jan Albert Kuivenhoven από το τμήμα Αγγειακής Ιατρικής, του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ και το Κέντρο Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Γκρόνινγκεν, Τμήμα Παθολογίας και Ιατρικής Βιολογίας, Τομέα Ιατρικής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική, του Dr. Stanley Hazen από το Κέντρο Καρδιαγγειακής Διάγνωσης & Πρόληψης, της Κλινικής του Κλίβελαντ στο Οχάιο, του Dr Joseph Witztum και του Dr Sotirios Tsimikas από τους Τομείς Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού και Τομέα Καρδιαγγειακών Ασθενειών, του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας στο Σαν Ντιέγκο. Από την μελέτη αυτή βρέθηκε επίσης αύξηση των επιπέδων των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη Β (αποΒ) στους LCAT Het (17%;  $P < 0.001$ ), αλλά όχι στους LCAT Hom, ενώ το αραχιδονικό οξύ και τα οξειδωμένα παράγωγα του στον ορό και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη (α) (απο(α)) μειώθηκαν και μάλιστα αυτή η μείωση εξαρτάται από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Τα συνολικά αποτελέσματα της συνεργασίας έδειξαν ότι άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT παρουσίασαν σημαντικές μειώσεις στην δραστικότητα του ενζύμου LCAT, στα επίπεδα HDL-c, στα επίπεδα αποΑ-I, στην δραστικότητα της PAF-AH και στην αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL (δοκιμασία του DCF), αλλά αυτές οι μειώσεις δεν σχετίζονται με παραμέτρους αυξημένης υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα προϊόντα υπεροξειδωσης του αραχιδονικού οξέος, του λινολεϊκού οξέος, των ανοσοδραστικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απο(α), και αυτοαντισωμάτων IgM και IgG έναντι της MDA των LDL. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δραστικότητα του ενζύμου LCAT του ορού, η δραστικότητα της

PAF-AH της HDL και η HDL-c, μπορεί να μην επηρεάζουν τα επίπεδα των προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων του πλάσματος.



**Εικόνα 4.10.** Δραστικότητα A) του ενζύμου PON1 και B) του ενζύμου PAF-AH της HDL ετεροζυγωτών, και ομοζυγωτών για την LCAT (Het LCAT, Hom LCAT), καθώς και των ατόμων αναφοράς. \* $p=0.01$  για την HDL των LCAT Het έναντι HDL των ατόμων αναφοράς, όσον αφορά την δραστικότητα του ενζύμου PAF-AH. \*\* $p<0.0005$  για την HDL των LCAT Hom έναντι HDL των ατόμων αναφοράς. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

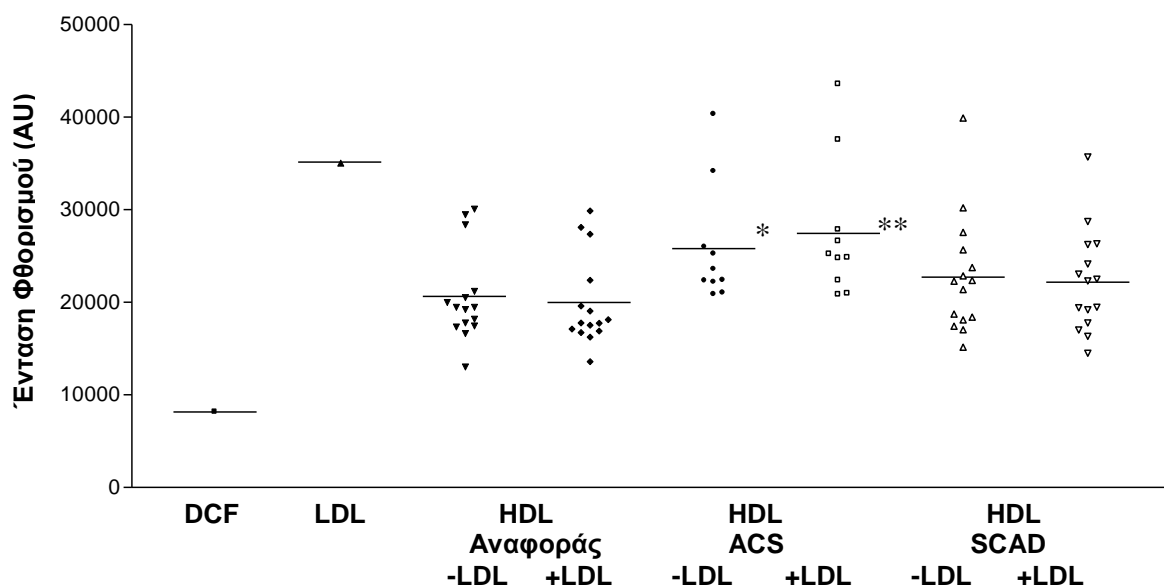
#### 4.1.3 Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από άτομα με στεφανιαία νόσο και της ικανότητας της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1

Μελετήθηκαν άτομα με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease) (N=15), άτομα με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome) (N=10), καθώς και άτομα αναφοράς, δεν έχουν κάποιο από τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου) (N=15). Η ηλικία των ατόμων ήταν μεταξύ 40 και 70 ετών και συμμετείχαν συνεχόμενα στην μελέτη του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης. Η διάγνωση των ατόμων με SCAD και ACS έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικάνικης Καρδιολογικής Εταιρείας [226,227].

Στόχος ήταν να δούμε αν επηρεάζονταν κάποιες από τις ιδιότητες της HDL των ατόμων αυτών, και πιο συγκεκριμένα οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες και η ικανότητα τους να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1 από κύτταρα μακροφάγων J774 και κυττάρων HEK293 (ενότητες 3.15 & 3.17).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.11**, και η HDL από τα άτομα με SCAD και η HDL από τα άτομα με ACS και η HDL από τα άτομα αναφοράς παρήγαγαν παρουσία και απουσία LDL φθορισμό μικρότερο από την οξειδωμένη LDL. Οι HDL των ατόμων με ACS είχαν πιο οξειδωμένες HDL συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς παρουσία και απουσία LDL ( $p=0,0028$  και  $p=0,0166$ , αντίστοιχα). Οι HDL των ατόμων με SCAD είχαν μεν πιο οξειδωμένες/προφλεγμονώδεις HDL συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς παρουσία και απουσία LDL, αλλά οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p=0,1294$  και  $p=0,1637$ , αντίστοιχα).

Έπειτα εξετάστηκε αν επηρεάζεται η ικανότητα της HDL ατόμων με στεφανιαίο νόσο να επάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η μη ειδική εκροή χοληστερόλης (ολική εκροή - κύτταρα τα οποία δεν επωάστηκαν με το *cpt-cAMP*) και η εκροή χοληστερόλης ύστερα από ενεργοποίηση του ABCA1 (κύτταρα που επωάστηκαν με το *cpt-cAMP*) από μακροφάγα μυός J774 παρουσία HDL ατόμων με στεφανιαία νόσο ή HDL ατόμων αναφοράς.

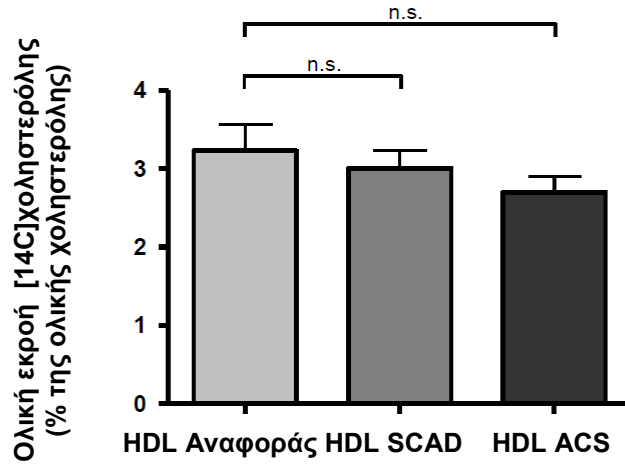


**Εικόνα 4.11.** Αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease), καθώς και των ατόμων αναφοράς με την δοκιμασία του DCF. Η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης του DCFH. Ελέγχθηκε η επίδραση της HDL στην ένταση του φθορισμού παρουσία και απουσία LDL, η οποία μετρήθηκε φθορισμομετρικά. \* $p < 0.05$  για την HDL (απουσία LDL) των ατόμων με ACS έναντι HDL (απουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. \*\* $p < 0.01$  για την HDL (παρουσία LDL) των ατόμων με ACS έναντι HDL (παρουσία LDL) των ατόμων αναφοράς. AU: αυθαίρετες μονάδες. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο.

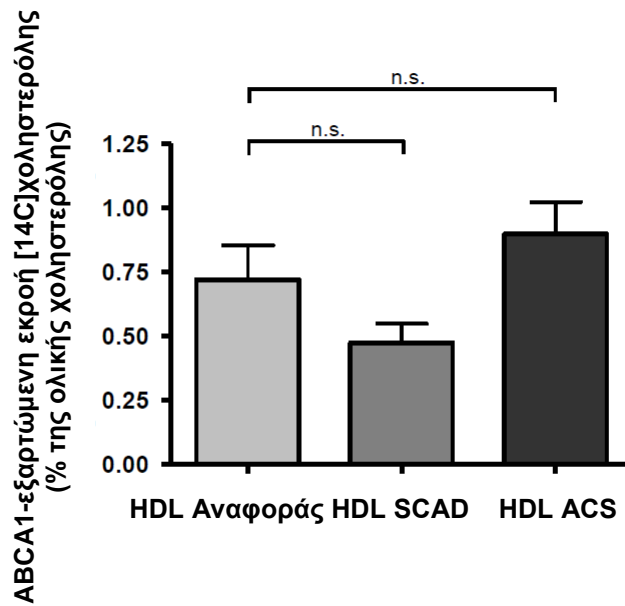
Είναι γνωστό πως ο κύριος αποδέκτης της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα κύτταρα μέσω ABCA1 είναι η μη λιπιδιωμένη αποA-I και η λίγο λιπιδιωμένη αποA-I (προ-β-HDL) [24]. Αντίθετα οι HDL δεν οδηγούν σε εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1. Σε καταστάσεις στεφανιαίας νόσου θα μπορούσε να επηρεαστεί η σύσταση της HDL (πχ αύξηση των λιγότερων λιπιδιωμένων HDL υποπληθυσμών) και να επηρεαστεί συνεπώς η ικανότητα της HDL να προάγει μη ειδική εκροή χοληστερόλης ή εκροή χοληστερόλης ύστερα από ενεργοποίηση του ABCA1. Η ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης (net) υπολογίζεται αφαιρώντας από το ποσοστό της εκροής χοληστερόλης ύστερα από ενεργοποίηση του ABCA1 το ποσοστό της μη ειδικής εκροής χοληστερόλης.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.12A** δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ολική εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μους J774 παρουσία HDL από άτομα με ACS ή παρουσία HDL από άτομα με SCAD, σε σύγκριση με τις HDL από άτομα αναφοράς ( $p=0,1686$  ή  $p=0,3501$  αντίστοιχα). Ανεπηρέαστη έμεινε επίσης η ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης (net) παρουσία HDL από άτομα με ACS ή παρουσία HDL από άτομα με SCAD, σε σύγκριση με τις HDL από άτομα αναφοράς ( $p=0,3060$  ή  $p=0,1922$ , αντίστοιχα) (**Εικόνα 4.12B**). Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκε διαφορο-

A.



B.



Εικόνα 4.12. Ολική και εξαρτώμενη από ABCA1 (net) εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 10μg/mL HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome) (n=10), ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease) (n=10) και ατόμων αναφοράς (n=10). Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο. n.s: Μη στατιστικώς σημαντική διαφορά.

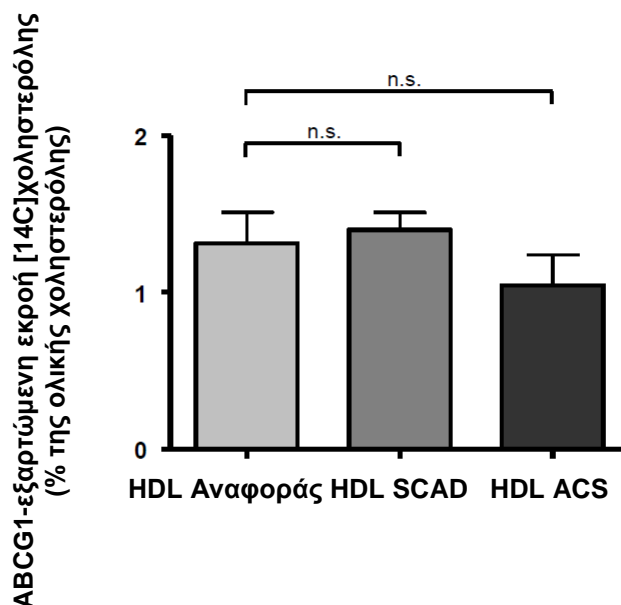
ποίηση στην ολική εκροή χοληστερόλης ή στην εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία HDL από άτομα με ACS ή παρουσία HDL από άτομα με SCAD, σε σύγκριση με τις HDL από άτομα αναφοράς.

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν επηρεάστηκε η ικανότητα των HDL των ατόμων με ACS ή με SCAD να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1. Η εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 πραγματοποιείται με την διευκόλυνση από τον ABCG1 της πρόσληψης χοληστερόλης από HDL. Υπολογίστηκε η εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK 293 που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pcDNA 3.1 (Mock) ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και η εξαρτώμενη από τον ABCG1 εκροή χοληστερόλης (net) παρουσία 1μM HDL ατόμων αναφοράς και HDL ατόμων με ACS και SCAD.

Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) ABCG1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, το ποσοστό εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1, αφαιρείται από το ποσοστό εκροής χοληστερόλης κυττάρων τα οποία επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία είναι πως πιθανόν τα άτομα με ACS ή SCAD να έχουν HDL με τροποποιημένη σύσταση, σχήμα, μέγεθος και συνεπώς διαταραγμένη ικανότητα πρόσληψης χοληστερόλης μέσω του ABCG1.

Η καθαρά εξαρτώμενη από τον ABCG1 εκροή χοληστερόλης (net) ήταν παρόμοια παρουσία HDL από ACS ή SCAD άτομα συγκριτικά με την εκροή χοληστερόλης παρουσία HDL από άτομα αναφοράς ( $p=0,2405$  και  $p=0,4125$ , αντίστοιχα) (**Εικόνα 4.13**).

Η παραπάνω μελέτη έγινε σε συνεργασία με την ομάδα του Dr. Ulf Landmesser, από το Καρδιαγγειακό Κέντρο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης. Από την ομάδα αυτή βρέθηκε ότι σε απόλυτη αντίθεση με την HDL από τα άτομα αναφοράς ( $HDL_{Healthy}$ ), η HDL από τα άτομα με ACS ή SCAD ( $HDL_{CAD}$ : Coronary Artery Disease) ανέστειλε αντί να διεγείρει την παραγωγή ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (NO) και την ενδοθηλιακή επιδιόρθωση.



**Εικόνα 4.13.** Εξαρτώμενη από ABCG1 (net) εκροή χοληστερόλης από HEK 293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1 παρουσία 1μM HDL ατόμων αναφοράς (n=10) και HDL ατόμων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome) (n=10) και ατόμων με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease) (n=10). Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο. n.s: Μη στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Η ικανότητα της HDL να διεγείρει την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO είναι κρίσιμη για τις ενδοθηλιακές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις και την προαγωγή της ενδοθηλιακής επιδιόρθωσης. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η HDL<sub>CAD</sub>, σε αντίθεση με την HDL<sub>Healthy</sub>, ενεργοποιεί την ενδοθηλιακή πρωτεϊνική κινάση C (PKC)-β<sub>2</sub>, μέσω του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τα μονοπάτια ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (eNOS) και την εξαρτώμενη από eNOS παραγωγή NO. Επιπρόσθετα, η μειωμένη δραστηριότητα παραοξονάσης 1 (PON1) της HDL, αναγνωρίστηκε ως η μοριακή βάση που οδηγεί σε HDL με ικανότητα ενεργοποίησης της ενδοθηλιακή PKC-β<sub>2</sub>, τουλάχιστον εν μέρει λόγω του σχηματισμού MDA στην HDL. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφορές στην ικανότητα των HDL των ατόμων με ΣΝ και των ατόμων αναφοράς να επάγουν εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα συμβαδίζει με την άποψη ότι η μειωμένη ικανότητα της HDL να διεγείρει την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO σχετίζεται με την εξαρτώμενη από την ενδοθηλιακή LOX-1 ενεργοποίηση του PKC-β<sub>2</sub> και όχι με μια μεγάλη διαταραχή της ικανότητας της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης που σε άλλες μελέτες είχε βρεθεί να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της παραγωγής NO από HDL [249-251].

## **4.2 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I στην αλληλεπίδραση μεταξύ της HDL και του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 που οδηγεί στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Μελέτη του ρόλου του ABCG1 σε φλεγμονώδεις αποκκρίσεις**

Οι μοριακοί μηχανισμοί και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ABCG1 και HDL δεν έχουν διασαφηνιστεί. Δεν είναι ξεκάθαρο, για παράδειγμα, αν η η αποΑ-I εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της HDL με τον ABCG1 που οδηγεί στην εκροή χοληστερόλης. Επίσης δεν είναι γνωστό αν ο ABCG1 επηρεάζει τα επίπεδα διάφορων κυτταροκινών παρουσία ή απουσία HDL και αν ναι, θα θέλαμε να μάθουμε αν συμβαίνει μέσω κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού (όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ABCA1) [51,52]. Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε α) αν συγκεκριμένες περιοχές της αποΑ-I επηρεάζουν την ικανότητα της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης ή 7-κετο-χοληστερόλης μέσω ABCG1 και β) αν ο ABCG1, μέσω αλληλεπίδρασης με την HDL ή ανεξάρτητα αυτής της αλληλεπίδρασης, επηρεάζει φλεγμονώδεις αποκκρίσεις.

### **4.2.1 Μελέτη του ρόλου της αποΑ-I αγρίου τύπου (WT) και διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της ως απαραίτητο συστατικό των ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL) στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή στερολών**

Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να αναλύσουμε τις αλληλεπιδράσεις του ABCG1 με ανασυγκροτημένα σωματίδια HDL (rHDL) που περιέχει την αγρίου τύπου (WT) ή διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I στην εκροή στερολών (χοληστερόλης ή 7-κετο-χοληστερόλης) σε ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα HEK293 και μακροφάγα μυός J774 που υπερεκφράζουν τον ABCG1. Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I ήταν ελλειμματικές στο αμινο-τελικό άκρο ή/και στο καρβοξυ-τελικό άκρο, ελλειμματικές σε εσωτερικές περιοχές ή έφεραν σημειακές μεταλλάξεις. Απώτερος στόχος μας είναι να χαρτογραφήσουμε τις περιοχές της αλληλουχίας της αποΑ-I που εμπλέκονται στην εξαρτώμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.

Σε μια προσπάθεια να εμβαθύνουμε στους μηχανισμούς λειτουργίας του ABCG1, ακολούθησε μέτρηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης κυττάρων HEK293 που υπερέκφραζαν τον ABCG1 παρουσία ή απουσία χοληστερόλης ή 7-κετοχοληστερόλης, ενώ τέλος μελετήθηκε η εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 παρουσία rHDL που περιείχαν την WT αποΑ-I και είχαν επωαστεί με πλασμίνη. Η πλασμίνη είναι πρωτεάση που εντοπίζεται στον ανθρώπινο εσωτερικό αρτηριακό χιτώνα, και έχει βρεθεί ότι μπορεί να αποικοδομεί την αποΑ-I που περιέχεται σε HDL3 σωματίδια *in vitro* και έτσι πιθανώς να επηρεάζει την επαγόμενη από HDL εκροή χοληστερόλης από αφρώδη μακροφάγα [173,174,177,221].



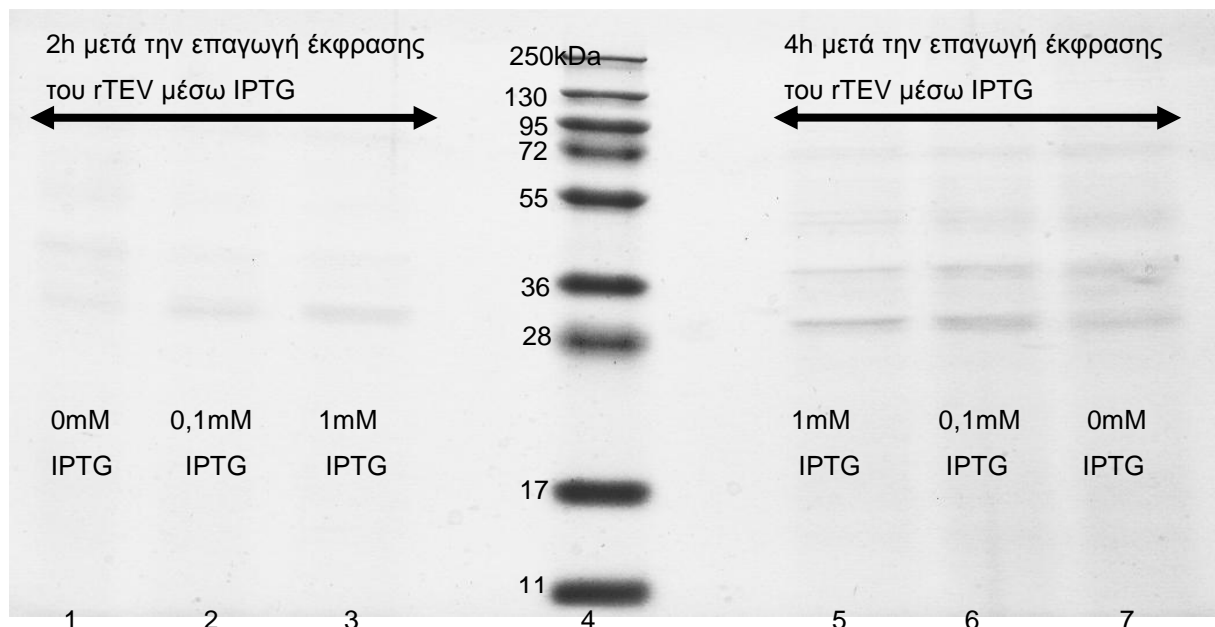
#### 4.2.1.1 Προετοιμασία των απολιποπρωτεϊνών (αποΑ-I) πριν την παρασκευή ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αποΑ-I, οι οποίες είχαν παρασκευαστεί από την Δρ. Αγγελική Χρόνη στο εργαστήριο του καθηγητή Βασίλη Ζαννή στον τομέα Μοριακής Γενετικής του Whitaker Cardiovascular Institute του Πανεπιστημίου της Βοστώνης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η WT αποΑ-I και μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I ελλειμματικές στο αμινο-τελικό άκρο [ $\Delta(1-41)$ ,  $\Delta(1-59)$ ], ελλειμματικές στο καρβοξυ-τελικό άκρο [ $\Delta(185-243)$ ,  $\Delta(220-243)$ ,  $\Delta(232-243)$ ], ελλειμματικές στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο [ $\Delta(1-41)\Delta(185-243)$ ,  $\Delta(1-59)\Delta(185-243)$ ], ελλειμματικές σε εσωτερικές περιοχές [ $\Delta(61-78)$ ,  $\Delta(89-99)$ ,  $\Delta(144-165)$ ] ή με σημειακές μεταλλάξεις (E110A/E111A, L141R, D102A/D103A, R160V, H162A). Οι αποΑ-I παρασκευάστηκαν με το σύστημα έκφρασης του βακίλοιού και ο καθαρισμός τους βασίστηκε σε χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη νικελίου. Οι συγκεκριμένες αποΑ-I έχουν στο αμινο-τελικό τους άκρο μια ετικέτα ιστιδινών, που τους επιτρέπει να προσδένονται σε ρητίνη νικελίου και να διαχωρίζονται έτσι από τα υπόλοιπα συστατικά του κυτταρικού λύματος.

Επειδή η ετικέτα ιστιδίνης θα μπορούσε να επηρεάσει τις ιδιότητες των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I ελλειμματικών στο αμινο-τελικό άκρο, έπρεπε να απομακρυνθεί. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη πρωτεάση TEV (rTEV), η οποία αναγνωρίζει και πέπτει την αλληλουχία Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) που φέρει η ανασυνδυασμένη αποΑ-I μεταξύ της ετικέτας ιστιδίνης και της αλληλουχίας της ώριμης αποΑ-I.

Η παραγωγή πρωτεάσης rTEV έγινε σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της *Escherichia coli*, ύστερα από επιμόλυνση με πλασμίδιο που περιέχει το cDNA της rTEV (ενότητες 3.29-3.31) και κατόπιν επαγωγή με IPTG. Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες παραγωγής της rTEV, έγινε συλλογή θρεπτικού υλικού από καλλιέργειες, στις οποίες είχαν προστεθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13%. Στην **Εικόνα 4.14**, φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων που λήφθηκαν 2 και 4 h μετά την επαγωγή της έκφρασης της rTEV με 0,1mM και 1mM IPTG. Παρατηρήθηκαν στα 29kDa, που είναι το μοριακό βάρος της rTEV, ζώνες που είναι πιο έντονες στις 4 ώρες (δεξιά πλευρά της πηκτής) και 2 ώρες (αριστερή πλευρά της πηκτής) μετά την επαγωγή έκφρασης της rTEV μέσω IPTG (και με τις δυο συγκεντρώσεις) απ'ότι απουσία IPTG, γεγονός που

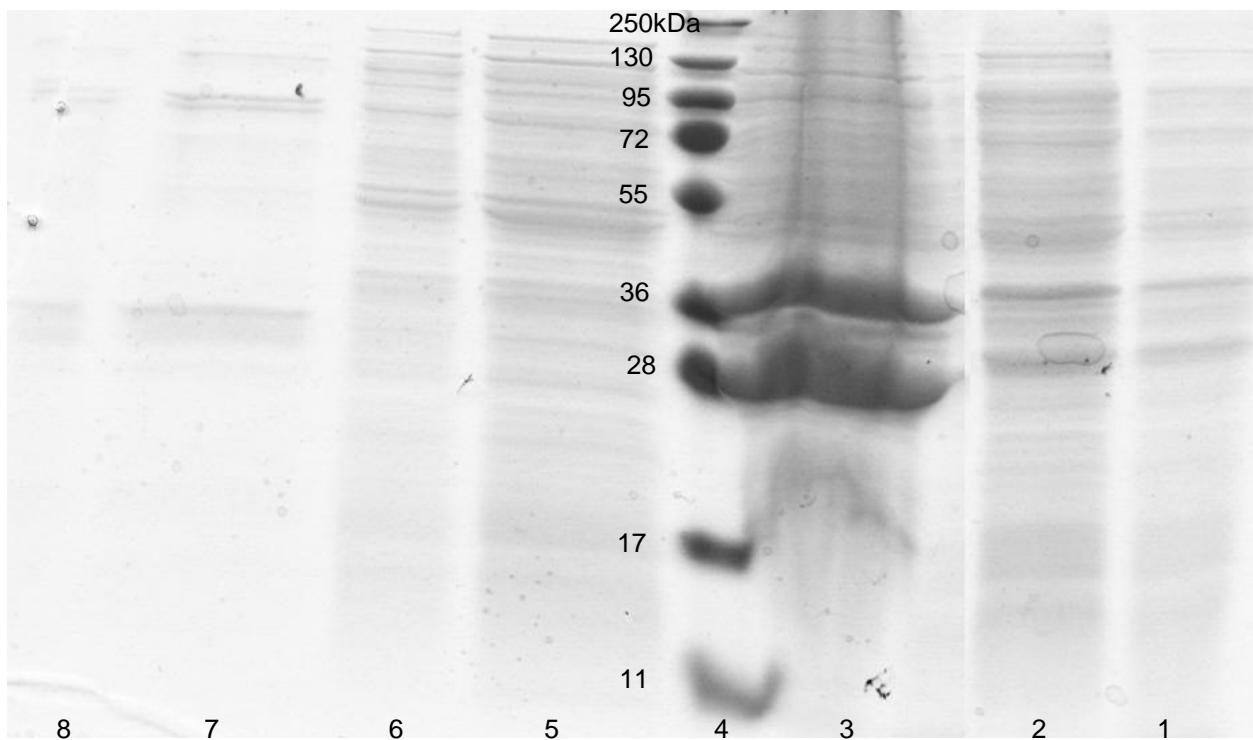
επιβεβαιώνει την έκφραση της rTEV. Η επαγωγή με 0,1mM και 1mM IPTG φαίνεται ότι οδηγεί σε αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της rTEV, ενώ η επαγωγή για 4h οδηγεί σε μεγαλύτερη έκφραση. Οπότε ο καθαρισμός της rTEV έγινε από καλλιέργειες κυττάρων που επωάστηκαν με 0,1mM και 1mM IPTG για 4 ώρες.



**Εικόνα 4.14.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) της *Escherichia Coli* που λήφθηκαν 2h μετά την επαγωγή έκφρασης της rTEV με IPTG συγκέντρωσης (1) 0mM, (2) 0,1mM και (3) 1mM και 4h μετά την επαγωγή έκφρασης της rTEV με IPTG συγκέντρωσης (5) 1mM, (6) 0,1mM και (7) 0mM, (4) πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

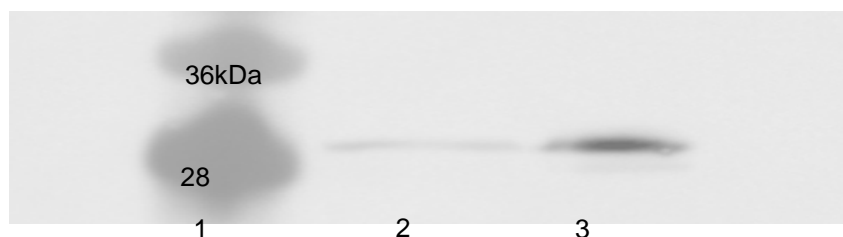
Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, λύθηκαν και καθαρίστηκε το ένζυμο από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των βακτηρίων με στήλη που περιείχε ρητίνη νικελίου, καθώς η rTEV περιέχει ετικέτα ιστιδίνης. Το έκλουσμα που περιείχε το ένζυμο, συμπυκνώθηκε με φυγοκέντρηση σε συσκευή με φίλτρο που είχε πόρους 10kDa, που επιτρέπει να απομακρυνθούν νερό και μόρια μικρότερης διαμέτρου, ενώ το ένζυμο που διατηρήθηκε σε μικρότερο όγκο φυλάχτηκε στους -80°C, σε 50% γλυκερόλη.

Στην **Εικόνα 4.15** παρατηρούμε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων που λήφθηκαν σε διαφορετικά στάδια της απομόνωσης και καθαρισμού της rTEV που εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3) της *Escherichia coli*. Παρατηρούμε την παραγωγή και την καθαρότητα της rTEV στο τελικό έκλουσμα πριν την συμπύκνωση (διαδρομή 8) και μετά την συμπύκνωση (διαδρομή 9).



**Εικόνα 4.15.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% από δείγμα καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3) της *Escherichia Coli* (1) πριν την επαγωγή με IPTG, (2) μετά την λύση και φυγοκέντρηση των κυττάρων, (3) δείγμα από τα κύτταρα πριν λυθούν, (4) πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, (5) δείγμα από το λύμα που δεν προσδένεται στην ρητίνη νικελίου, (6) δείγμα από την έκπλυση της ρητίνης νικελίου με διάλυμα, πριν την έκλυση του ενζύμου, (7) δείγμα από έκλουσμα rTEV πριν την συμπύκνωση του διαλύματος (φορτώθηκε το 0,77% της συνολικής πρωτεΐνης), (8) δείγμα από έκλουσμα rTEV μετά την συμπύκνωση του διαλύματος (φορτώθηκε το 0,68% της συνολικής πρωτεΐνης).

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της παραγωγής και απομόνωσης της rTEV, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά western (ενότητα 3.9) με χρήση αντισώματος έναντι 6 καταλοίπων ιστιδίνης. Στην **Εικόνα 4.16**, παρουσιάζεται η ανοσοαποτύπωση κατά western δείγματος από έκλουσμα rTEV πριν και μετά την συμπύκνωση του διαλύματος που επιβεβαιώνει την παραγωγή του ενζύμου.

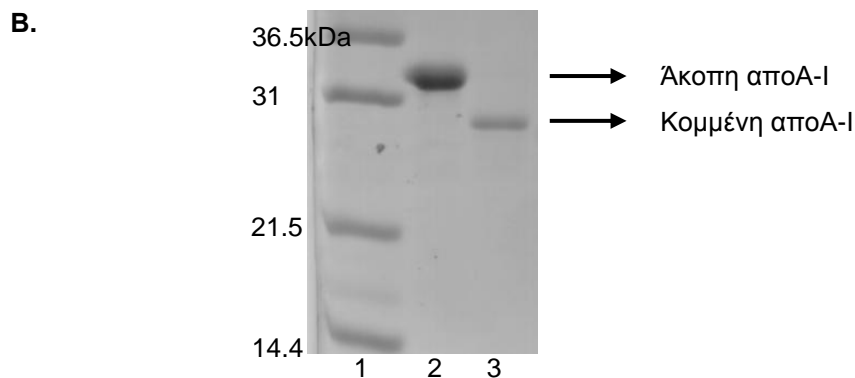
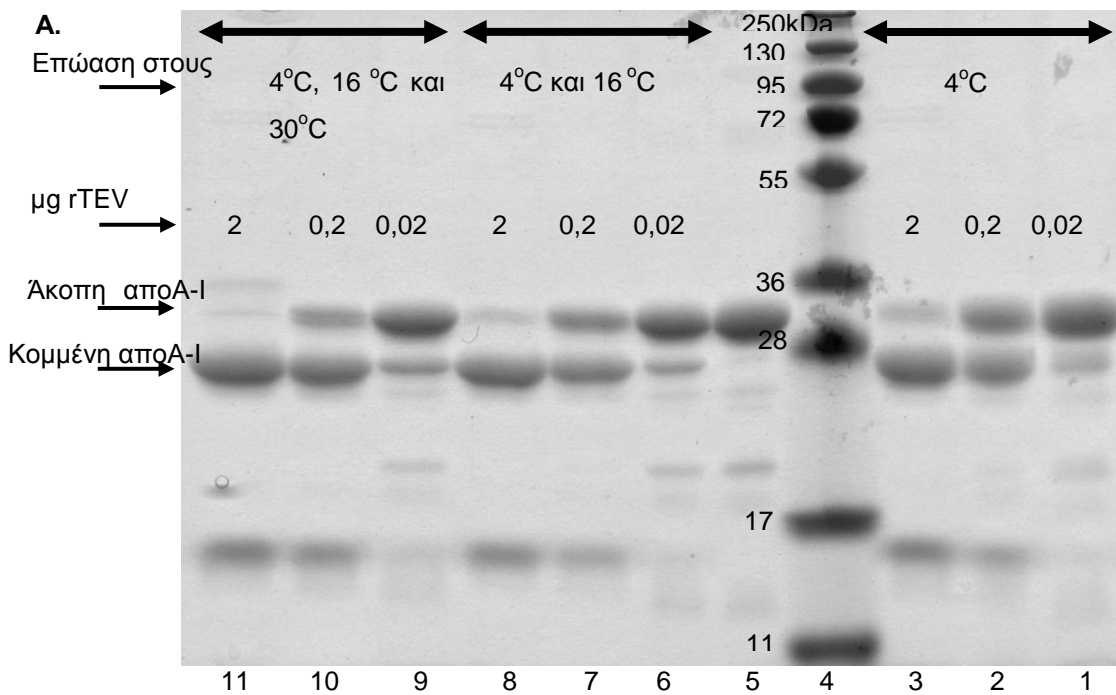


**Εικόνα 4.16.** Ανοσοαποτύπωση κατά western δείγματος από έκλουσμα rTEV (2) πριν την συμπύκνωση του διαλύματος και (3) μετά την συμπύκνωση του διαλύματος με χρήση αντισώματος έναντι 5 καταλοίπων ιστιδίνης. (1) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

Στην συνέχεια, ακολούθησε δοκιμαστικά πέψη μιας μορφής της απολιποπρωτεΐνης A-I (επιλέξαμε την WT μορφή) με rTEV προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών. Οι συνθήκες που τροποποιήσαμε ήταν η θερμοκρασία και ο χρόνος της πέψης (με ολονύχτια επώαση στους 4°C, με ολονύχτια επώαση στους 4°C και μετά επώαση στους 16 °C για 1ώρα, με ολονύχτια επώαση στους 4°C, επώαση στους 16°C για 1ώρα και επώαση στους 30°C για ακόμα 1ώρα), καθώς και διαφορετική ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε (0,02μg, 0,2 μg και 2 μg) σε ίση ποσότητα αποA-I (125μg). Δείγματα από τις 9 αυτές διαφορετικές συνθήκες (3x3) αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13%. Στην **Εικόνα 4.17A** παρατηρούμε ότι με χρήση 2 μg ενζύμου (αναλογία ενζύμου πρωτεΐνης 1:62.5) και μετά από επώαση στους 4°C, 16°C και 30°C παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης πέψη της αποA-I, συγκριτικά με την άκοπη.

Το τελικό στάδιο πριν την παρασκευή rHDL ήταν να απομακρυνθούν οι ετικέτες ιστιδίνης των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I ελλειμματικών στο αμινο-τελικό άκρο αποA-I[Δ(1-41)], αποA-I[Δ(1-59)], αποA-I[Δ(1-41)Δ(185-243)], αποA-I[Δ(1-59)Δ(185-243)], καθώς η ετικέτα ιστιδίνης θα μπορούσε να επηρεάσει τις ιδιότητες τους. Επίσης έγινε πέψη των WT αποA-I και αποA-I[Δ(185-243)] με σκοπό να παρασκευαστούν rHDL και να συγκρίθηκαν με άλλες rHDL που περιέχουν τις ίδιες πρωτεΐνες, των οποίων οι ετικέτες ιστιδίνης δεν έχουν κοπεί και να εξεταστεί αν επηρεάζονται οι ιδιότητες αυτών των rHDL από την ύπαρξη ετικέτας ιστιδίνης.

Ο διαχωρισμός της κομμένης αποA-I (δεν φέρει ετικέτα ιστιδίνης) από τυχόν άκοπη (φέρει ετικέτα ιστιδίνης) και την rTEV (επίσης φέρει ετικέτα ιστιδίνης) έγινε σε στήλη ρητίνης νικελίου. Στη συνέχεια, για να επιβεβαιώσουμε ότι η αποA-I που πήραμε από την στήλη δεν είχε την ετικέτα ιστιδίνης αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% (**Εικόνα 4.17B**). Για σύγκριση, αναλύθηκε και άκοπη αποA-I.

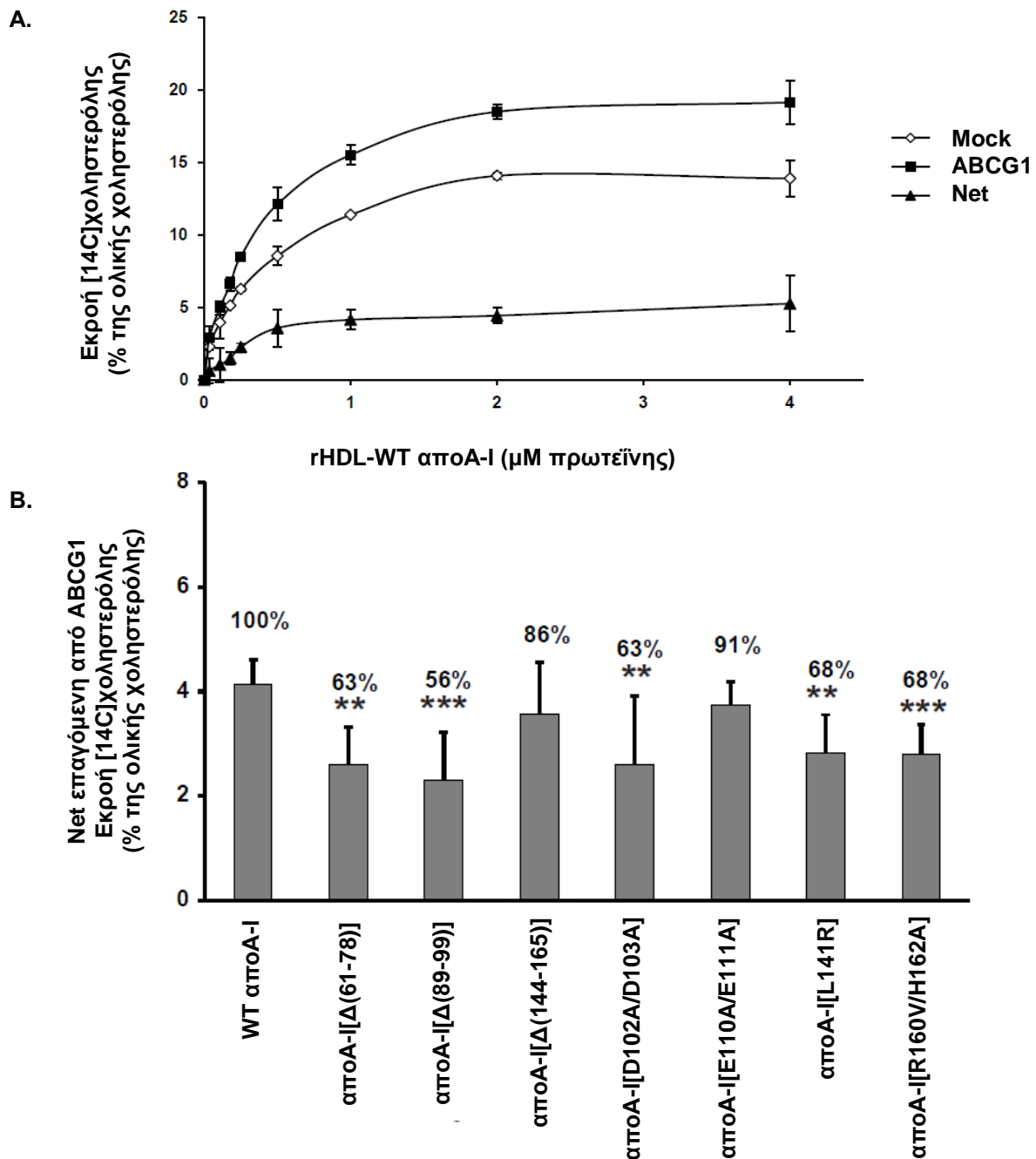


**Εικόνα 4.17.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 13% δειγμάτων **A)** από πέψεις WT apoA-I 125μg με ολονύχτια επώαση στους 4°C (διαδρομές 1-3), με ολονύχτια επώαση στους 4°C και μετά επώαση στους 16 °C για 1h (διαδρομές 6-8), με ολονύχτια επώαση στους 4°C, επώαση στους 16°C για 1h και επώαση στους 30°C για ακόμα 1h (διαδρομές 9-11) με 0,02μg (διαδρομές 1, 6, 9) 0,2μg (διαδρομές 2, 7, 10) και 2μg rTEV (διαδρομές 3, 8, 11). Στην διαδρομή 5 υπάρχει δείγμα από άκοπη apoA-I και στην διαδρομή 4 είναι πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. **B)** από τον καθαρισμό της apoA-I σε στήλη ρητίνης νικελίου ύστερα από πέψη της με rTEV (διαδρομή 3), από άκοπη apoA-I (διαδρομή 2) και από πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (διαδρομή 1).

#### 4.2.1.2 Μελέτη της ικανότητας των rHDL να προάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1: Η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I ελλειματικών στο αμινο-τελικό άκρο, καρβοξυ-τελικό άκρο, σε εσωτερικές περιοχές ή με σημειακές μεταλλάξεις

Αρκετές παλαιότερες μελέτες έχουν εξετάσει τον ρόλο της ελεύθερης λιπιδίων ή λιπιδιωμένης αποΑ-I στις διαδικασίες εκροής χοληστερόλης μέσω ABCA1 ή SR-BI, αντίστοιχα [38,43,252-254]. Όμως, ο ρόλος της αποΑ-I στην επαγόμενη από HDL εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 δεν έχει διευκρινιστεί. Για να εξετάσουμε εάν συγκεκριμένες περιοχές της αποΑ-I επηρεάζουν την ικανότητα των rHDL να προάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1, προετοιμάσαμε rHDL που περιείχαν την WT ή διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη με αρχική μοριακή αναλογία POPC:χοληστερόλη (C):αποΑ-I 100:10:1, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.10. Μια μεγάλη ποικιλία μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I ελλειματικών στο αμινο-τελικό άκρο, καρβοξυ-τελικό άκρο, στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο, σε εσωτερικές περιοχές, καθώς και με σημειακές μεταλλάξεις σε κεντρικές έλικες του μορίου χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες. HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]-χοληστερόλη και επωάστηκαν παρουσία αυτών των rHDL. Η επαγόμενη (net) από ABCG1 εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1. Παρακολουθώντας την εκροή χοληστερόλης παρουσία rHDL που περιέχει την WT αποΑ-I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (αποΑ-I), φαίνεται ότι η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης φτάνει σε κορεσμό (plateau) πάνω από την συγκέντρωση των 0.5μM αποΑ-I (**Εικόνα 4.18A**).

Η τιμή του ποσοστού της (net) επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης παρουσία rHDL που περιέχει την WT αποΑ-I (σε συγκέντρωση 1μM αποΑ-I) ήταν αντίστοιχη με αυτή που έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες [85,86]. Για να διευκολυνθεί η ανάλυση της εκροής χοληστερόλης από rHDL που περιέχουν διαφορετικές μορφές της αποΑ-I, οι τιμές της (net) επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης παρουσία rHDL που περιέχει την WT αποΑ-I τέθηκε ως 100%. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.18B** rHDL (σε συγκέντρωση κορεσμού 1μM) που περιέχουν



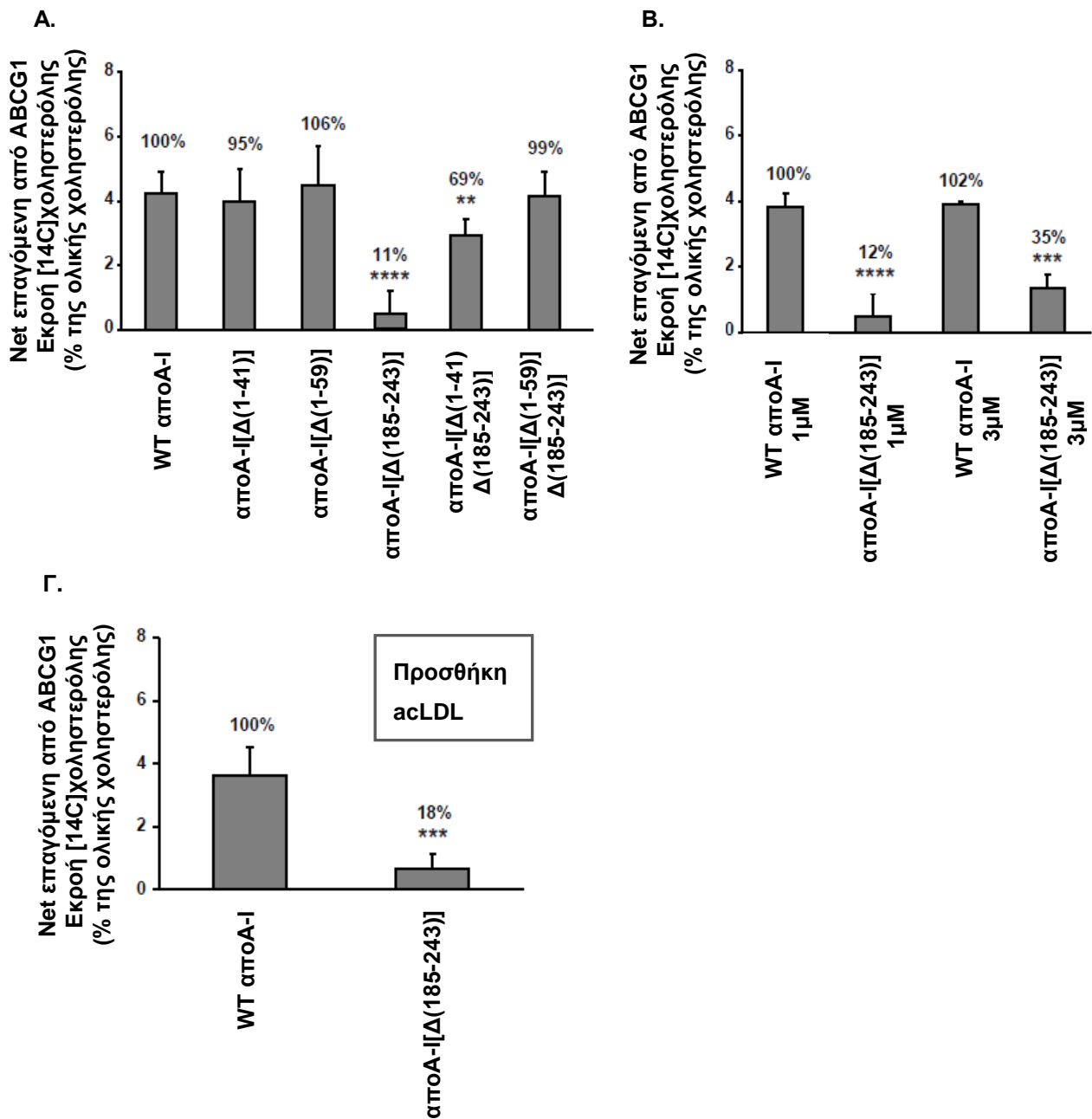
**Εικόνα 4.18. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I ελλειματικές σε εσωτερικές περιοχές ή apoA-I με σημειακές μεταλλάξεις στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.** (A, B) HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη για 19-20 h και επώαστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την WT apoA-I ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (A) ή 1 μM apoA-I (B) για 4 h. Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης (net) υπολογίστηκε αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1. Οι αριθμοί στην κορυφή των στηλών αντιπροσωπεύουν το ποσοστό της Net επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης, όπου παρουσία rHDL WT apoA-I τέθηκε ως 100%. (B) Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*\*, p < 0.01 έναντι WT apoA-I; \*\*\*, p < 0.001 έναντι WT apoA-I.



αρκετές μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I ελλειματικές σε εσωτερικές περιοχές ή αποΑ-I με σημειακές μεταλλάξεις (αποΑ-I[Δ(61-78)], αποΑ-I[Δ(89-99)], αποΑ-I[Δ(144-165)], αποΑ-I[D102A/D103A], αποΑ-I[E110A/E111A], αποΑ-I[L141R] και αποΑ-I[R160V/H162A]) μείωσαν 9-44% την (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, συγκριτικά με rHDL που περιέχουν την WT αποΑ-I. Η ανάλυση της επίδρασης των rHDL που περιέχει την μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-I ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό της άκρο αποΑ-I[Δ(185–243)] (σε συγκέντρωση κορεσμού 1μM) έδειξε 89% μείωση στην (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης (**Εικόνα 4.19A**).

Για να αντισταθμιστεί οποιαδήποτε διαφορά στο μέγεθος και την σύσταση των σωματιδίων η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε παρουσία της rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)] σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση (3μM) από την εκτιμώμενη συγκέντρωση κορεσμού. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.19B** η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης εξακολουθεί να είναι πολύ χαμηλή (65% μείωση) παρουσία 3μM της rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)]. Εν συνεχεία, σε πείραμα όπου τα κύτταρα σημάνθηκαν με [14C]-χοληστερόλη και 30μg/mL acLDL δείχθηκε ότι η rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)] (σε συγκέντρωση 1μM αποΑ-I) έχει πολύ μειωμένη ικανότητα (82%) να προάγει (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης (**Εικόνα 4.19Γ**). Μέτρηση της σύστασης των λιπιδίων (ενότητες 3.11-3.12) και της πρωτεΐνης (ενότητα 3.13) των rHDL έδειξε ότι τα rHDL-αποΑ-I WT και rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)] έχουν παρόμοια τελική μοριακή αναλογία POPC:C:αποΑ-I (86:9:1 για την αποΑ-I WT, 91:10:1 για την αποΑ-I[Δ(185-243)], δείχνοντας έναν ελαφρύ εμπλουτισμό σε POPC) και τα μεγέθη τους διαφέρουν ελαφρώς όπως προσδιορίστηκε από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (πληθυσμοί των ~12.2nm και ~10nm για τα rHDL-αποΑ-I WT, ~12.2nm, ~11nm και ~9nm για τα rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)]). Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση φωσφολιπιδίων ή πρωτεΐνης τα rHDL με μεγέθη που κυμαίνονται από 7,8 έως 17 nm έχουν παρόμοια ικανότητα επαγωγής εκροής χοληστερόλης από κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 [255]. Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης δεν επηρεάζεται από την αναλογία φωσφολιπιδίων: πρωτεΐνης [256] ή ότι αυξήθηκε παρουσία αποδέκτη με αυξημένο περιεχόμενο σε φωσφολιπίδια [257].



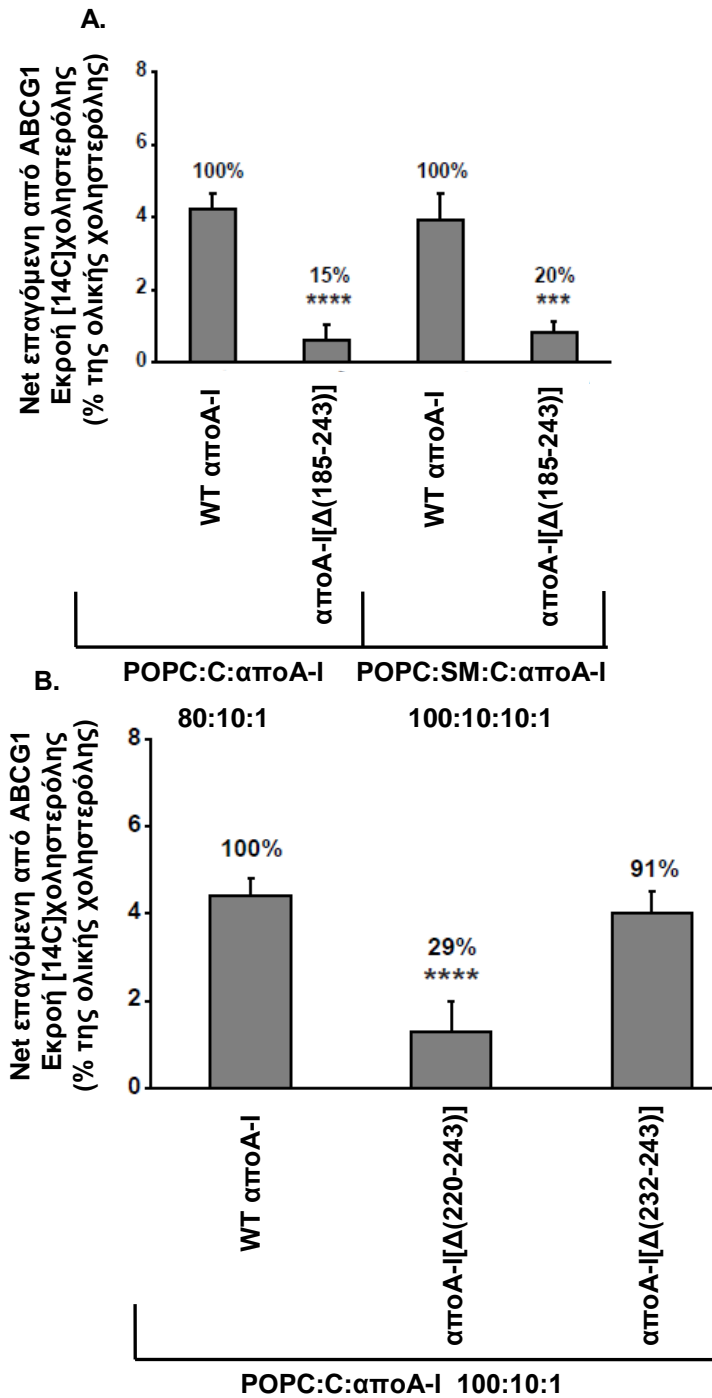


**Εικόνα 4.19Α-Γ.** Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I ελλειματικές στο αμινο-τελικό άκρο, στο καρβοξυ-τελικό άκρο ή στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1). HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη απουσία (Α, Β) και παρουσία 30μg/ml acLDL (Γ) για 19-20 h και επώαστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την WT apoA-I ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I σε συγκέντρωση 1 μM apoA-I (Α, Γ) ή 3 μM apoA-I (Β) για 4 h. Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.18. (Α) Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από έξη (Α) ή τρία (Β) ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν ή δυο (Γ) ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. \*\*,  $p < 0.01$  έναντι WT apoA-I; \*\*\*,  $p < 0.001$  έναντι WT apoA-I; \*\*\*\*,  $p \leq 0.001$  έναντι WT.

Για αυτόν τον λόγο, και βασιζόμενοι στην σύσταση και το μέγεθος των rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ], κάποιος θα μπορούσε να περιμένει ότι αυτά τα σωματίδια επιδουκνύουν παρόμοια ή αυξημένη ικανότητα (net) επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης, συγκριτικά με την ικανότητα των rHDL WT αποA-I. Έτσι, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι δομικές αλλαγές της αποA-I των rHDL μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα των rHDL να δέχονται χοληστερόλη από κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω εάν το λιπιδικό περιεχόμενο των αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] rHDL σωματιδίων μπορεί να επηρεάσει την (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης προετοιμάσαμε rHDL που περιέχουν POPC:C:αποA-I με αρχική μοριακή αναλογία 80:10:1 ή POPC:σφιγγομυελίνη (SM):C:αποA-I με αρχική μοριακή αναλογία 100:10:10:1. Μέτρηση της σύστασης των λιπιδίων και της πρωτεΐνης έδειξε ότι τα rHDL-αποA-I WT και τα rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] σωματίδια έχουν παρόμοια τελική μοριακή αναλογία POPC:C:αποA-I (72:8:1 και 71:9:1, αντίστοιχα, για rHDL-αποA-I WT και rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ]) και αντίστοιχη αναλογία POPC:SM:C:αποA-I (99:8:1 και 97:9:1, αντίστοιχα, για rHDL-αποA-I WT και rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ]). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4.20A** η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης παρουσία 1  $\mu$ M rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] που είχε παρασκευαστεί με αρχική μοριακή αναλογία POPC:C:αποA-I 80:10:1 ήταν μειωμένη κατά 85%. Η μείωση αυτή ήταν αντίστοιχη με την μείωση της εκροής χοληστερόλης παρουσία αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] που είχε παρασκευαστεί με αρχική μοριακή αναλογία POPC:C:αποA-I 100:10:1. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι όλα τα rHDL που περιέχουν διάφορες αναλογίες POPC:αποA-I 40-178:1 έχουν παρόμοια ικανότητα να προάγουν εκροή χοληστερόλης από κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 [255]. Επιπλέον, η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης μειώθηκε κατά 80% παρουσία 1  $\mu$ M rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] που είχε παρασκευαστεί με αρχική μοριακή αναλογία POPC:SM:C:αποA-I 100:10:10:1 (**Εικόνα 4.20A**). Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι τα rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] σωματίδια που μελετήσαμε, τα οποία παρασκευάστηκαν με διαφορετικό περιεχόμενο φωσφολιπιδίων ή με διαφορετικές αναλογίες λιπιδίων πρωτεΐνης, παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλή ικανότητα (80-89%) να προάγουν (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης συγκριτικά με τα rHDL-αποA-I WT σωματίδια.

Για έναν πιο λεπτομερή προσδιορισμό της περιοχής του καρβοξυ-τελικού άκρου της αποA-I, η οποία όταν αφαιρεθεί επηρεάζει την ικανότητα του rHDL-αποA-I σωματιδίου



**Εικόνα 4.20A-B.** Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I ελλειμματικές στο καρβοξυ-τελικό άκρο στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1). HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη για 19-20 h και επώαστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την WT apoA-I ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I σε

συγκέντρωση 1 μM apoA-I για 4 h. Τα rHDL σωματίδια έχουν διάφορες αναλογίες λιπιδίων:apoA-I όπως αναφέρεται σε κάθε διάγραμμα. Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.18. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από έξι (B) ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν ή (A) δυο ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. \*\*\*,  $p < 0.001$  έναντι WT apoA-I; \*\*\*\*,  $p \leq 0.001$  έναντι WT apoA-I. POPC, 1-παλμιτούλ-2-ολεούλ-L-φωσφατίδυλοχολίνη; C, χοληστερόλη; SM, σφιγγομυελίνη.

να προάγει (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, μελετήσαμε την ικανότητα των rHDL-αποA-I[Δ(220-243)] και rHDL-αποA-I [Δ(232-243)] σωματιδίων (συγκέντρωση 1μM αποA-I) να προάγουν (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης. Η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης ήταν μόλις το 29% της τιμής του WT όταν απουσίαζε η περιοχή 220-243 της αποA-I και επανήλθε στο 91% της τιμής του WT, όταν απουσίαζε η περιοχή 232-243 (**Εικόνα 4.20B**). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 220–231 της αποA-I είναι τα πιο σημαντικά για την ικανότητα της πλήρους μήκους αποA-I σαν συστατικό των rHDL να επάγει (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.

Η ανάλυση της επίδρασης των rHDL (σε συγκέντρωση 1μM αποA-I) που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I ελλειματικών στο αμινο-τελικό άκρο αποA-I[Δ(1–41)] ή αποA-I[Δ(1–59)] έδειξε ότι η (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης δεν επηρεάστηκε, ενώ η εκροή χοληστερόλης επανήλθε στο 69–99 % της WT αποA-I, παρουσία των μεταλλαγμένων μορφής της αποA-I ελλειματικών και στο αμινο- και στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο αποA-I[Δ(1–41)Δ(185–243)] ή αποA-I[Δ(1–59)Δ(185–243)], υποδικνύοντας ότι rHDL που περιέχουν μόνο τις εσωτερικές έλικες της αποA-I μπορούν να προάγουν (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης (**Εικόνα 4.19A**). Συνολικά, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι υπάρχει σχέση δομής και λειτουργίας μεταξύ των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I στα rHDL και της (net) επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης.

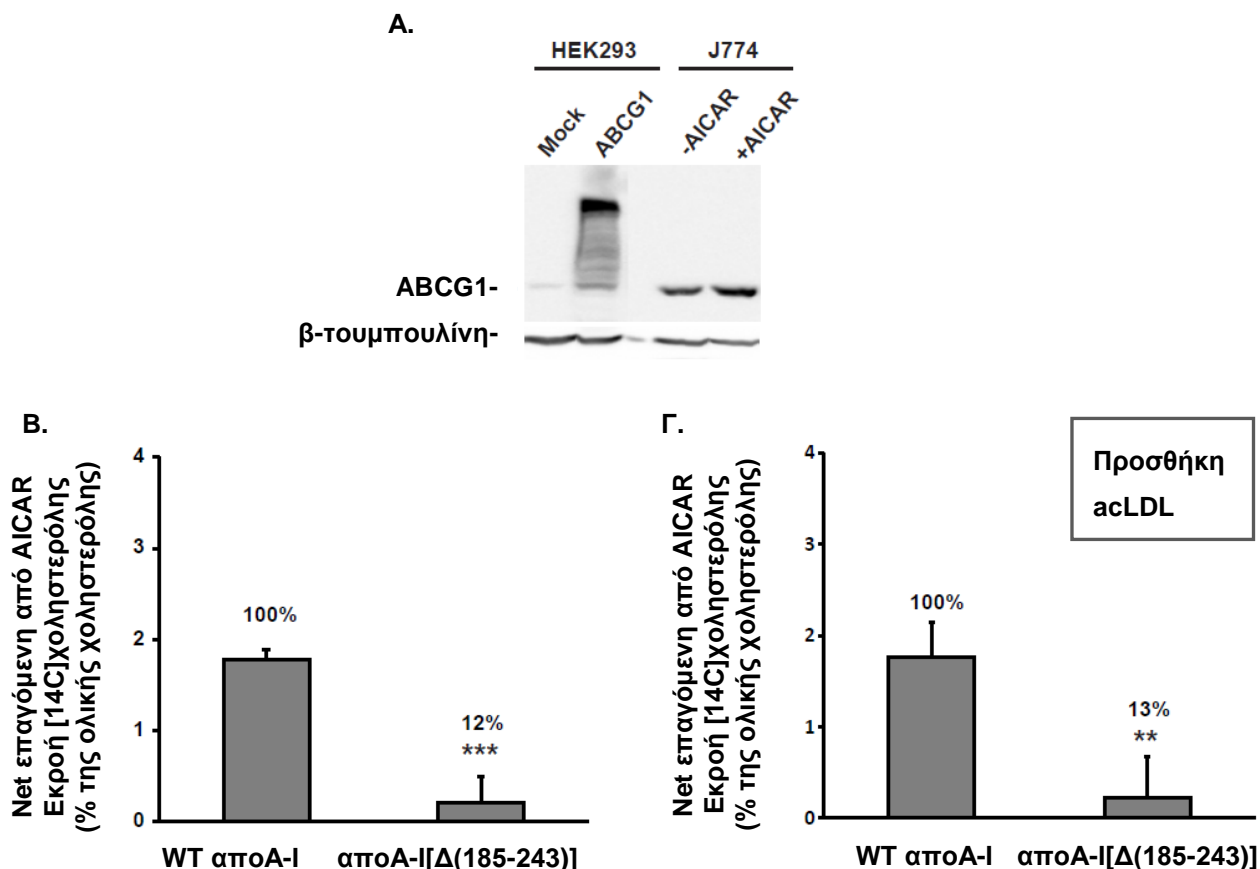
#### **4.2.1.3 Η επίδραση της ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποA-I αποA-I[Δ(185–243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774**

Για να επιβεβαιώσουμε την επίδραση της ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποA-I αποA-I[Δ(185–243)] στην (net) επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης σε έναν άλλο πιο φυσιολογικά σχετικό κυτταρικό τύπο, μετρήσαμε την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 που σημάνθηκαν με [14C]-χοληστερόλη και επώαστηκαν παρουσία ή απουσία του 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). Το AICAR έχει αναφερθεί ότι αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του ABCG1, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα των mRNA και των πρωτεϊνών του ABCA1, των υποδοχέων εκκαθαριστών, περιλαμβανομένου του υποδοχέα εκκαθαριστή A, του CD36 και SR-BI και γονιδίων που σχετίζονται με την συνθεση χοληστερόλης σε J774 μακροφάγα μυός [99]. Η επώαση μακροφάγων

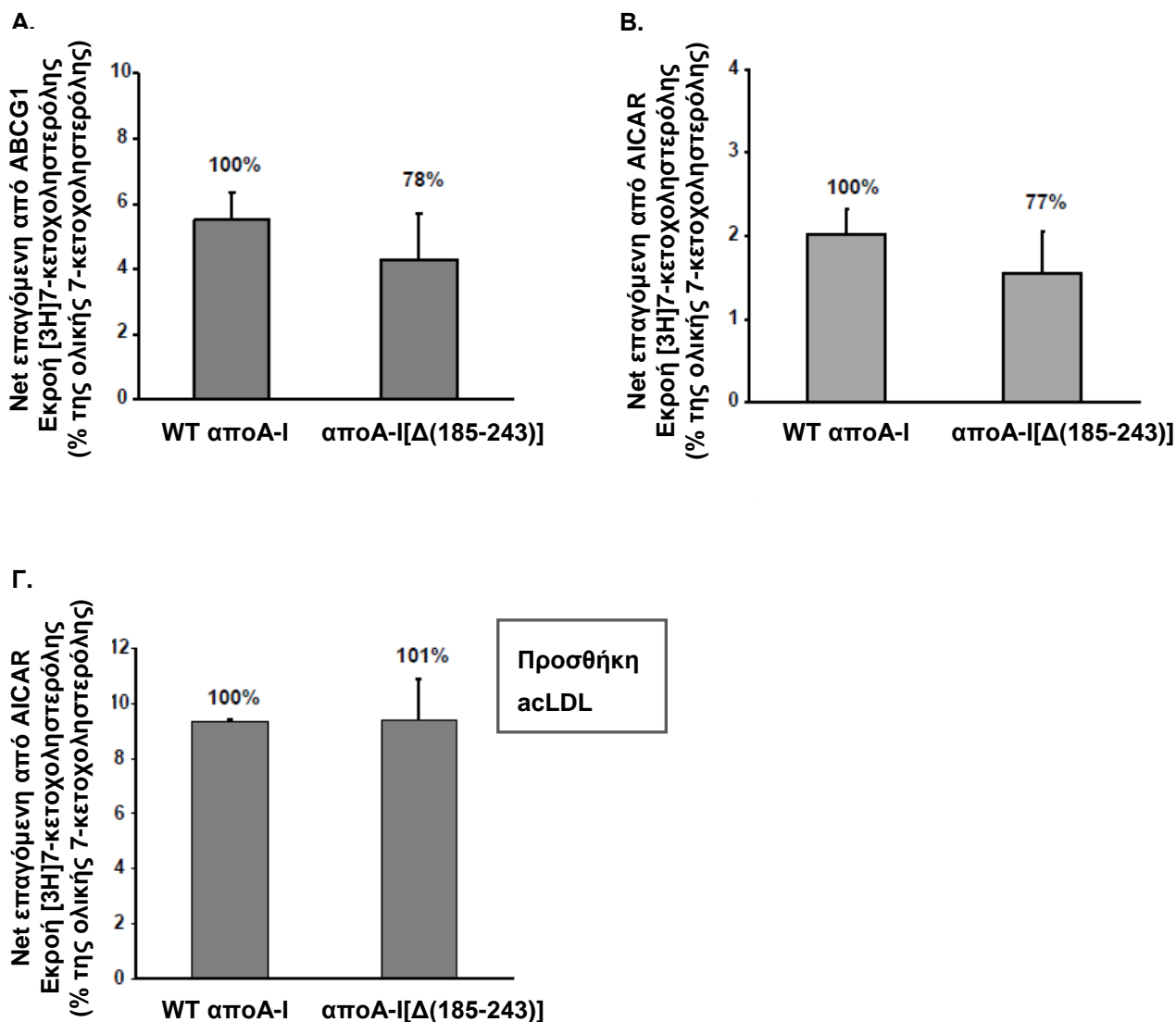
κυττάρων μυός J774 με AICAR οδήγησε σε διπλασιασμό των επιπέδων έκφρασης του ABCG1 (**Εικόνα 4.21A**), όπως έχει αναφερθεί και παλαιότερα [99]. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4.21B**, λήφθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με τα πειράματα εκροής χοληστερόλης στα HEK293 κύτταρα, καθώς παρουσία rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] η επαγόμενη από AICAR (επαγόμενη από ABCG1) εκροή χοληστερόλης από J774 μακροφάγα κύτταρα μυός μειώθηκε κατά 88%. Επιπλέον, μετρήσαμε και την επαγόμενη από AICAR (επαγόμενη από ABCG1) εκροή χοληστερόλης από J774 μακροφάγα κύτταρα μυός που είχαν σημανθεί με [ $^{14}\text{C}$ ]-χοληστερόλη και 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  acLDL, στα οποία η χοληστερόλη μπορεί να προέρχεται από διαφορετική κυτταρική δεξαμενή συγκριτικά με τα J774 μακροφάγα που είχαν σημανθεί μόνο με [ $^{14}\text{C}$ ]-χοληστερόλη [258]. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4.21Γ** η επαγόμενη από AICAR (επαγόμενη από ABCG1) εκροή χοληστερόλης είναι πάλι έντονα μειωμένη (87%) παρουσία rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ]. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι στην πλήρους μήκους αποA-I ως συστατικό των rHDL απαιτείται η καρβοξυ-τελική της περιοχή προκειμένου να προάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης μέσω ABCG1.

#### **4.2.1.4 Η επίδραση της ελλειμματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποA-I αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 και από μακροφάγα μυός J774**

Εκτός της εκροής χοληστερόλης, ο ABCG1 έχει δείχθει να προάγει την κυτταρική εκροή της 7-κετο-χοληστερόλης και άλλων σχετιζόμενων οξυστερολών [98,99]. Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν η ελλειμματική στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποA-I αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] επηρεάζει την εκροή χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης με παρόμοιο τρόπο, πραγματοποιήσαμε μελέτη εκροής 7-κετο-χοληστερόλης σε HEK293 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) παρουσία rHDL-αποA-I WT ή rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ]. Η ανάλυση έδειξε ότι, σε αντίθεση με την επίδραση της στην εκροή χοληστερόλης, η rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] μειώνει ελαφρώς μόνο (κατά 22%) την επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης (**Εικόνα 4.22A**). Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν στα HEK293 κύτταρα, η rHDL-αποA-I [ $\Delta(185-243)$ ] μειώνει επίσης ελαφρώς (κατά 23%) ή δεν επηρεάζει την επαγόμενη από AICAR (επαγόμενη από ABCG1) εκροή 7-κετο-χοληστερόλης από J774 μακροφάγα μυός που είχαν σημανθεί μόνο με [ $^3\text{H}$ ]-7-κετο-χοληστερόλη ή είχαν σημανθεί με [ $^3\text{H}$ ]-7-κετο-χολη-



**Εικόνα 4.21.** Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I WT ή την ελλειμματική στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της apoA-I apoA-I[Δ(185-243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης J774 μακροφάγα μυός. J774 μακροφάγα μυός σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη (A, B) ή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη και 30μg/ml acLDL (Γ) για 24 h και στην συνέχεια επώαστηκαν με 1 mM AICAR για άλλες 24 h. Στο τέλος αυτής της περιόδου τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 h στους 37°C με 1μM rHDL που περιέχουν την WT apoA-I ή apoA-I[Δ(185–243)]. Η net επαγόμενη από AICAR (επαγόμενη από ABCG1) εκροή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης υπολογίστηκε ως η διαφορά του ποσοστού της εκροής χοληστερόλης μεταξύ κυττάρων που επώαστηκαν απουσία και παρουσία του AICAR. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*\*, p < 0.01 έναντι WT apoA-I; \*\*\*, p < 0.001 έναντι WT apoA-I. Έγινε ανοσοαποτύπωση κατά western (A) για να δειχθεί η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης του ABCG1 ύστερα από επώαση J774 μακροφάγων μυός με AICAR. Επίσης παρουσιάζονται για σύγκριση τα επίπεδα πρωτεΐνης του ABCG1 από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1). Η ανοσοαποτύπωση κατά western πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.9.



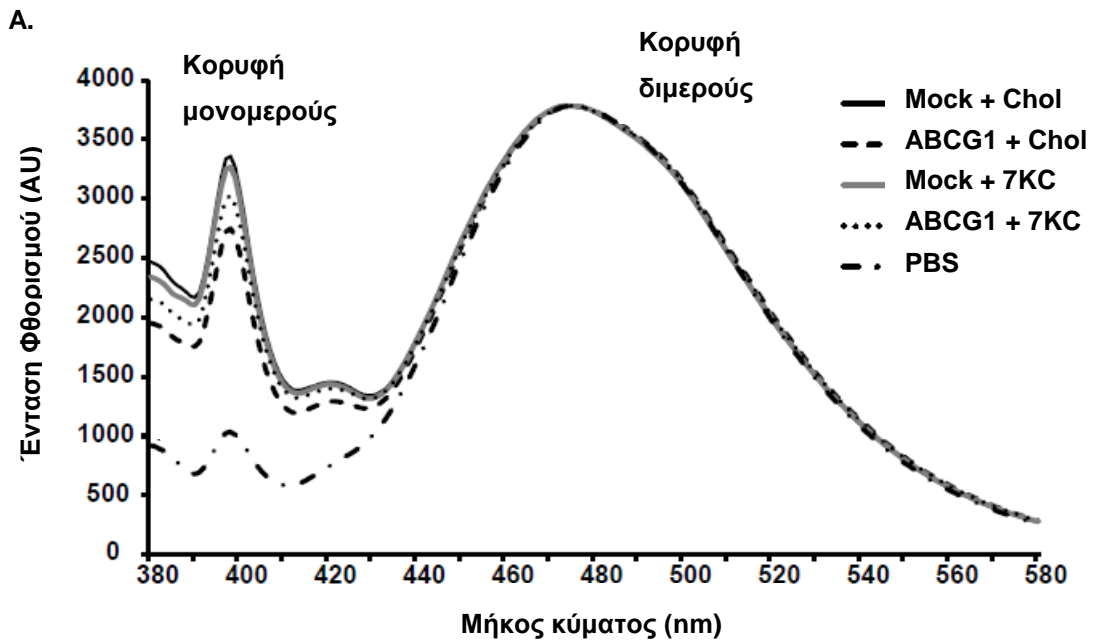
**Εικόνα 4.22Α-Γ.** Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I WT ή την ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της απA-I αποA-I[Δ(185-243)] στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης από HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και από J774 μακροφάγα μυός. (Α) HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), σημάθηκαν με [<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη για 19-20 h και επώαστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την WT αποA-I ή αποA-I[Δ(185-243)].σε συγκέντρωση 1 μM αποA-I για 4 h. (Β, Γ) J774 μακροφάγα κύτταρα μυός σημάθηκαν με [<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη (Β) ή με [<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλη και 30μg/ml acLDL (Γ) για 24 h και μετά επώαστηκαν με 1 mM AICAR για άλλες 24 h. Στο τέλος αυτής της περιόδου τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 h στους 37°C με 1μM rHDL που περιέχουν την WT αποA-I ή αποA-I[Δ(185-243)]. Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή [<sup>3</sup>H]7-κετο-χοληστερόλης υπολογίστηκε ως η διαφορά του ποσοστού της εκροής 7-κετο-χοληστερόλης μεταξύ (Α) κυττάρων που επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) και το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), (Β, Γ) κυττάρων που επώαστηκαν απουσία και παρουσία του AICAR, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.20. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

στερόλη και 30μg/mL acLDL, αντίστοιχα (**Εικόνα 4.22B-Γ**). Τα ευρήματα μας υποδεικνύουν ότι αναλόγως του τύπου της στερόλης δομικές αλλαγές στην apoA-I της rHDL επηρεάζουν διαφορετικά την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης.

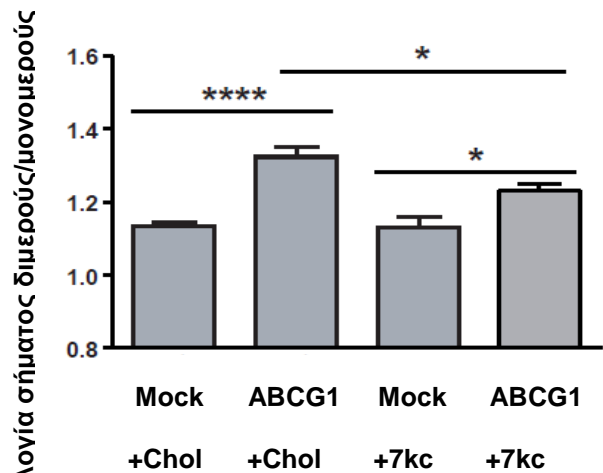
#### **4.2.1.5 Η επίδραση της χοληστερόλης και της 7-κετο-χοληστερόλης στην ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης από HEK293 που εκφράζουν τον ABCG1 και έχουν σημειωθεί με 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ**

Προκειμένου να διερευνήσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και μεμβράνης που επιτρέπουν τα rHDL-apoA-I [ $\Delta(185-243)$ ] να απομακρύνουν 7-κετο-χοληστερόλη αλλά όχι χοληστερόλη από κύτταρα που εκφράζουν τον ABCG1 μετρήσαμε την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης αυτών των κυττάρων. Η πλευρική και εγκάρσια ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να μεταβληθεί από αλλαγές της λιπιδικής σύστασης της μεμβράνης. Το 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκό οξύ, το οποίο σε υδατικό διάλυμα απαντάται ως διμερές, όταν εισέλθει στην πλασματική μεμβράνη και ανάλογα με την κινητικότητα του "σπάει" σε μονομερές, το οποίο δίνει διαφορετικό φάσμα φθορισμού και αυτή η ιδιότητα έχει χρησιμοποιηθεί για να διερευνήσουμε την κατάσταση της ρευστότητας της μεμβράνης [259-261]. Για να διευκρινίσουμε τις ιδιότητες της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης κυττάρων HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) όταν σημειώθηκαν με χοληστερόλη ή 7-κετο-χοληστερόλη μετρήσαμε τον φθορισμό του 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκού οξέος που προστέθηκε στο εναιώρημα αυτών των κυττάρων (ενότητα 3.19). Δεν βρήκαμε καμία αλλαγή του λόγου διμερούς/μονομερούς του 1-πυρένιο-δωδεκανοϊκού οξέος μεταξύ HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) και είχαν σημειωθεί με χοληστερόλη ή 7-κετο-χοληστερόλη. Αντιθέτως, βρέθηκε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στον λόγο διμερούς/μονομερούς 17% μεταξύ HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) και HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και είχαν σημειωθεί με χοληστερόλη, ενώ η αύξηση αυτή ήταν 8%, όταν είχαν σημειωθεί με 7-κετο-χοληστερόλη (**Εικόνα 4.23**). Αυτά τα ευρήματα, υποδεικνύουν διαφορετικές αλλαγές στην πλευρική και εγκάρσια ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και σημειώθηκαν με χοληστερόλη και 7-κετο-χοληστερόλη. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να σχετίζονται με διαφορετική κατανομή στην κυτταρική μεμβράνη της χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης σε κύτταρα που εκφράζουν τον ABCG1





B.



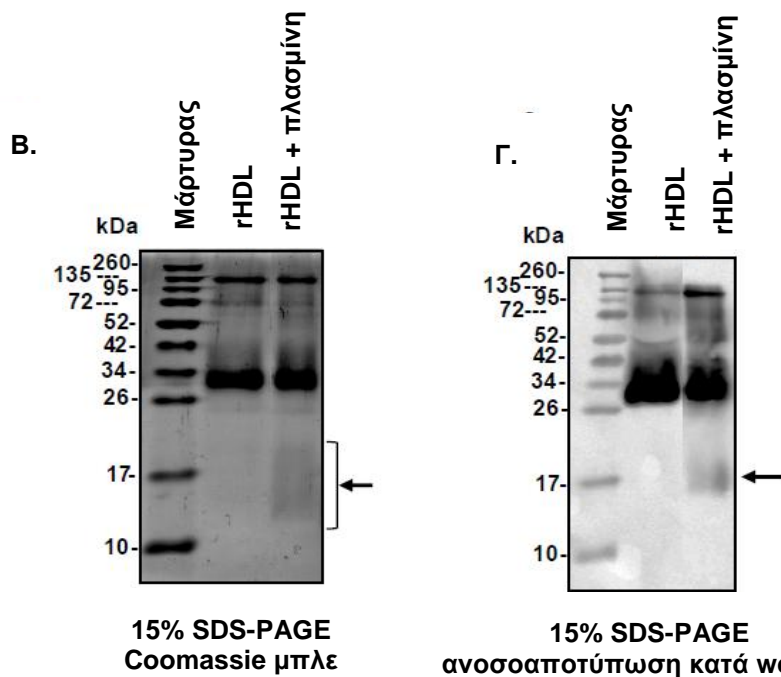
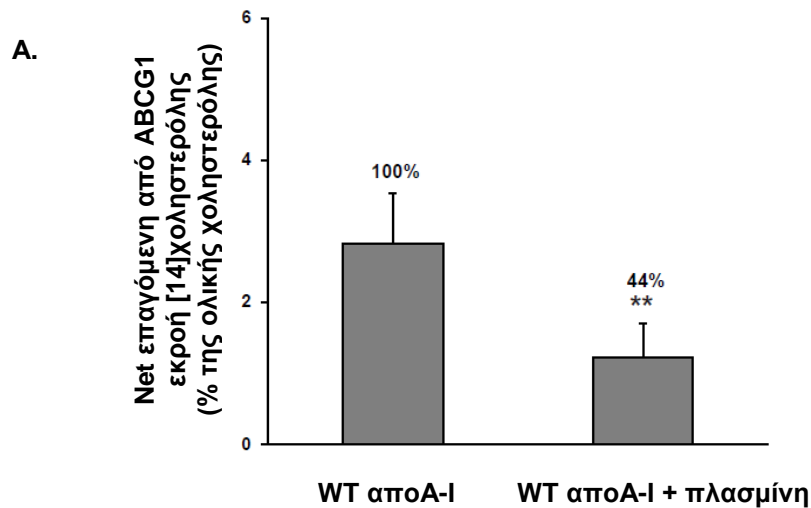
Εικόνα 4.23. Η ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης των HEK293 κυττάρων που επωάστηκαν με χοληστερόλη και 7-κετοχοληστερόλη μελετήθηκε με 1-πυρενο-δωδεκανοϊκό οξύ. HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), για 4-5 h, επωάστηκαν με χοληστερόλη και 7-κετοχοληστερόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις και

συνθήκες όπως και στα πειράματα εκροής στερολών και στην συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε PBS και αναμίχθηκαν με το 1 πυρενο-δωδεκανοϊκό οξύ. (A) Φθορίζον φάσμα εκπομπής του 1 πυρενο-δωδεκανοϊκού οξέος παρουσία και απουσία HEK293 κυττάρων. Το φάσμα εκπομπής του 1 πυρενο-δωδεκανοϊκού οξέος παρουσιάζει 2 κορυφές με μέγιστο στα 475 nm και μια στα 397 nm που αντιστοιχούν στη διμερή και μονομερή κατάσταση της ουσίας. Η κορυφή του μονομερούς είναι χαμηλή, όταν το 1 πυρενο-δωδεκανοϊκό οξύ βρίσκεται στην υδατική φάση, αλλά αυξάνεται σημαντικά όταν το 1 πυρενο-δωδεκανοϊκό οξύ προστεθεί στο εναιώρημα των κυττάρων. Παρουσιάζεται χαρακτηριστικό φάσμα 6-9 ξεχωριστών πειραμάτων. (B) Αναλογία σήματος της τιμής της κορυφής του διμερούς προς την τιμή της κορυφής του μονομερούς που υπολογίστηκε από HEK293 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και κατόπιν επωάστηκαν με χοληστερόλη ή 7-κετοχοληστερόλη. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση από 6-9 ανεξάρτητα πειράματα. Chol: χοληστερόλη; 7KC: 7-κετο-χοληστερόλη. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

που θα μπορούσε να επηρεάσει την προσβασιμότητα των στερολών και την ικανότητα πρόσληψης στερολών από την αποA-I[Δ(185–243)] της rHDL.

#### **4.2.1.6 Η επίδραση της πρωτεόλυσης της αποA-I στην ικανότητα των rHDL να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης**

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι αρκετές πρωτεάσες (μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάριας ύλης, πλασμίνη, καλλικρεΐνη, καθώς και χυμάση και τρυππάση ιστιοκυττάρων), οι οποίες εντοπίζονται στον ανθρώπινο εσωτερικό αρτηριακό χιτώνα, μπορούν να αποικοδομούν την αποA-I που περιέχεται σε HDL3 σωματίδια *in vitro* και έτσι να επηρεάζουν την επαγόμενη από HDL εκροή χοληστερόλης από αφρώδη μακροφάγα κύτταρα [173,174,177,221]. Επίσης έχει δειχθεί ότι η πρωτεόλυση της λιπιδιωμένης αποA-I από την πλασμίνη και κάποιες συγκεκριμένες μεταλλοπρωτεάσες παράγουν θραύσματα αποA-I με έλλειψη στο C-τελικό άκρο [172,173]. Έτσι, εξετάσαμε εάν η πρωτεολυτική αποικοδόμηση της αποA-I της rHDL μπορεί να επηρεάσει την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από rHDL. Για αυτόν το σκοπό, επώασαμε 1  $\mu$ M rHDL-αποA-I WT με 0.008 U/mL ανθρώπινης πλασμίνης στους 37°C για 1 h και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως αποδέκτης χοληστερόλης στην διαδικασία εκροής χοληστερόλης σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) και HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) (**Εικόνα 4.24A**). Η πλασμίνη σε συγκέντρωση 0,008 U/mL προκάλεσε ήπια πρωτεόλυση, όπως φαίνεται από την μικρή απώλεια της αποA-I της rHDL και την ασθενή ζώνες μοριακού βάρους 14-21kDa (**Εικόνα 4.24B-Γ**), όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως [172,174]. Μικρότερη συγκέντρωση πλασμίνης (0,004 U/mL), δεν είχε κάποια εμφανή επίδραση στην αποA-I, ενώ υψηλότερη συγκέντρωση (0,04 U/mL) πρωτεόλυσε σχεδόν πλήρως την αποA-I. Η επώαση της rHDL με πλασμίνη προκάλεσε με μεγάλη μείωση (56%) της επαγόμενης από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, συγκριτικά με την εκροή χοληστερόλης παρουσία rHDL που δεν επώαστηκε με πλασμίνη (**Εικόνα 4.24A**). Η μείωση της ικανότητας της rHDL να προάγει εκροή χοληστερόλης δεν μπορεί να αποδωθεί στα παρατηρούμενα ελαφρώς μειωμένα επίπεδα της WT αποA-I, καθώς η συγκέντρωση της rHDL που χρησιμοποιήθηκε στην δοκιμασία εκροής χοληστερόλης είναι πάνω από το επίπεδο κορεσμού (**Εικόνα 4.18**), αλλά πιο πιθανά μπορεί να αποδωθεί στην απουσία περιοχών της αποA-I (εξαιτίας της πρωτεόλυσης), οι οποίες μπορεί να οδηγούν σε δομικές αλλαγές των αποA-I των rHDL που να επηρεάζουν την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.



**Εικόνα 4.24. Επίδραση της πλασμίνης στην ικανότητα των rHDL που περιέχουν την WT αποA-I να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.** (A) HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) για 4-5 h, σημάνθηκαν με [<sup>14</sup>C]χοληστερόλη για 19-20 h και επώαστηκαν για 4 h στους 37°C παρουσία 1 μM rHDL σωματιδίων που περιέχουν την WT αποA-I και έχουν προηγουμένως επωαστεί για 1 h απουσία και παρουσία 0,008 U/ml ανθρώπινης πλασμίνης στους 37°C. Στην συνέχεια, προσδιορίστηκε το ποσοστό της εκροής [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με pcDNA3.1 που φέρει το γονίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), καθώς και η επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης (net). Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή [<sup>14</sup>C]χοληστερόλης υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.20. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση από δυο ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η εκροή χοληστερόλης παρουσία rHDL σωματιδίων που δεν έχουν επωαστεί με πλασμίνη έχει θεωρηθεί ως 100%. \*\*, p < 0.01 έναντι WT αποA-I. (B, Γ) (B-Γ) Δείγματα από rHDL που επώαστηκαν ή όχι με πλασμίνη αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE. Η αποA-I ανιχνεύθηκε με τη χρωστική Coomassie μπλε (B) ή ανοσοαποτύπωση κατά western (Γ). Τα βέλη υποδεικνύουν τα θραύσματα της αποA-I.

Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως μια ενδεχόμενη πρωτεόλυση της κύριας πρωτεΐνης της HDL από πρωτεάσες του εσωτερικού αρτηριακού χιτώνα μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της HDL να προάγει επαγόμενη από ABCG1 εκροή κυτταρικής χοληστερόλης.

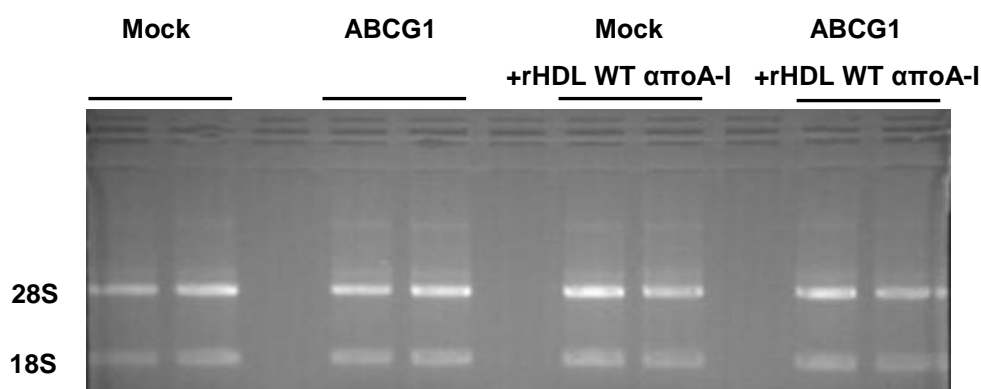
#### **4.2.2 Σχέση ABCG1 και φλεγμονής - ABCG1 & φλεγμονώδεις – αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες**

Ο ABCG1 έχει προταθεί πως έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς τα μακροφάγα που στερούνται του ABCG1, εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών [262,263]. Σε αυτό το σημείο θα θέλαμε να διερευνήσουμε αν η υπερέκφραση του ABCG1 επηρεάζει την έκφραση προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και αν τελικά ισχύει αυτό, θα θέλαμε να εξετάσουμε αν σχετίζεται με την συμμετοχή του ABCG1 στην εκροή λιπιδίων από τα μακροφάγα προς την HDL, καθώς μελέτες σε μύες που στερούνται τον ABCG1, δείχνουν να παρουσιάζουν αφρώδη μακροφάγα κύτταρα στους πνεύμονες τους σε συνδυασμό με φλεγμονή [97,263]. Έτσι, μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA των κυτταροκινών με προτεινόμενη φλεγμονώδη δράση TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και της κυτταροκίνης με προτεινόμενη αντιφλεγμονώδη δράση IL-10 σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία rHDL-WT αποA-I. Στη συνέχεια, επειδή η έκφραση των κυτταροκινών ξεκινά ύστερα από απόκριση σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικούς αναστολείς πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, σε μια προσπάθεια να αναγνωρίσουμε τον τρόπο με τον οποίο ο ABCG1 συμμετέχει στην φλεγμονή. Τέλος, σε προκαταρκτικά πειράματα μελετήσαμε τα επίπεδα του mRNA του TNF $\alpha$  σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ύστερα από τη διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNAi) (ενότητα 3.21).

##### **4.2.2.1 Μελέτη των επιπέδων mRNA διαφόρων κυτταροκινών σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία rHDL που περιέχει την WT αποA-I**

HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), επωάστηκαν παρουσία και απουσία 1  $\mu$ M rHDL WT αποA-I για 24 ώρες και κατόπιν απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων (ενότητα 3.22). Η συγκέντρωση του RNA στα δείγματα υπολογίσθηκε μετά από μέτρηση της απορρόφησης σε διάλυμα που έχει ουδέτερο pH, στο οποίο όταν η

τιμή της  $A_{260}$  του διαλύματος που περιέχει RNA είναι 1 τότε η συγκέντρωση του RNA είναι 44μg/mL RNA, (ενότητα 3.23). Το RNA που απομονώθηκε και καθαρίστηκε από τα κύτταρα, ελέγχθηκε ως προς τη καθαρότητά του με υπολογισμό του λόγου  $A_{260}/A_{280}$ . Σε όλα τα δείγματα η τιμή του λόγου ήταν 1,9-2,1, γεγονός που καταδεικνύει ότι το διάλυμα δεν ήταν επιμολυσμένο με πρωτεΐνες ή άλλα κυτταρικά συστατικά που απορροφούν στην περιοχή μηκών κύματος UV. Η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρησή σε πηκτική αγαρόζης (ενότητα 3.24). Στην **Εικόνα 4.25** φαίνεται ότι το ολικό RNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε από τα HEK293 κύτταρα επιτυχώς. Οι δύο ζώνες που εμφανίστηκαν στην πηκτική (18S και 28S) ήταν οξείες και η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στο 28S ριβοσωμικό RNA ήταν περίπου διπλάσια της έντασης της ζώνης που αντιστοιχεί στο 18S ριβοσωμικό RNA. Επιπλέον δεν εμφανίστηκαν απλωμένες ζώνες προς περιοχές μεγάλου μεγέθους RNA, γεγονός που δείχνει ότι το παρασκεύασμα δεν ήταν επιμολυσμένο με γενωμικό DNA.



**Εικόνα 4.25.** Ηλεκτροφορήματα RNA κυτάρων HEK293 που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), επωάστηκαν παρουσία και απουσία 1 μM rHDL WT αποA-I για 24 ώρες σε πηκτική αγαρόζης 1% (w/v) ύστερα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Από το ολικό RNA συντέθηκε cDNA (ενότητα 3.25) και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων (TNFα, IL-1β και IL-10) με real-time PCR (ενότητα 3.26). Η επιλογή εκκινήτων είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας από τον Δρ. Ιωάννη Δάφνη και τα κριτήρια επιλογής τους παρουσιάζονται αναλυτικά στην διδακτορική του διατριβή με τίτλο «Μελέτη της σχέσης δομής και λειτουργίας της απολιποπρωτεΐνης E στον εγκέφαλο» [220,261].

Τα ζεύγη πρόσθιων και ανάστροφων εκκινήτων, οι αλληλουχίες και τα τεχνικά χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον **πίνακα 4.2**. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase). Οι αλληλουχίες και τα τεχνικά

χαρακτηριστικά των εκκινητών για την GAPDH, παρουσιάζονται επίσης στον **πίνακα 4.2**.

**Πίνακας 4.2.** Η αλληλουχία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και το μήκος των τμημάτων επί των γονιδίων που περικλείουν ανά ζεύγη [220,261].

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5' → 3'	Tm (°C)	Ποσοστό GC (%)	Μήκος επί του γονιδίου που περικλείουν (bp)
<b>TNFα-F</b>	CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC	65	52,2%	150
<b>TNFα-R</b>	AGCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC	65	52,2%	
<b>IL-1β-F</b>	TCCCCAGCCCTTTTGTGGA	57	52,6%	91
<b>IL-1β-R</b>	TTAGAACCAAATGTGGCCGTG	60	47,6%	
<b>IL-10-F</b>	TGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC	60	37,5%	131
<b>IL-10-R</b>	AGTCGCCACCCTGATGTCT	60	57,9%	
<b>GAPDH-F</b>	CCTGCACCACCAACTGCTTA	60	55%	73
<b>GAPDH-R</b>	CATGAGTCCTTCCACGATACCA	62	50%	

Οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης PCR επιλέχθηκαν κατόπιν δοκιμαστικών πειραμάτων κατά τα οποία μελετήθηκαν η ποσότητα του cDNA, η συγκέντρωση των εκκινητών, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης και η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών-cDNA. Η ποσότητα του cDNA και η συγκέντρωση των εκκινητών που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3** και στην **Εικόνα 4.26**, αντίστοιχα.

Ο λόγος της σχετικής έκφρασης του γονιδίου στόχου (X= TNF-α, IL-1β ή IL-10) που εκφράζεται σε ένα δείγμα (κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 και επωάστηκαν παρουσία ή απουσία rHDL-αποA-I WT) έναντι ενός δείγματος αναφοράς (κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) απουσία

rHDL-αποΑ-I WT) συγκριτικά με ένα γονίδιο αναφοράς (R = GAPDH), υπολογίζεται όπως περιγράφεται από τον Pfaffl, 2001 χρησιμοποιώντας την εξίσωση  $\text{Λόγος} = (E_x)^{\Delta CT_x} / (E_R)^{\Delta CT_R}$  [264], όπου:

**E** είναι η αποδοτικότητα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου του μεταγραφόμενου γονιδίου στόχου ή αναφοράς,

**ΔCT<sub>x</sub>** είναι η διαφορά της τιμής του CT του δείγματος αναφοράς μείον της τιμής του CT του δείγματος του γονιδίου στόχου (CT<sub>x</sub> δείγματος αναφοράς- CT<sub>x</sub> δείγματος) και

**ΔCT<sub>R</sub>** είναι η διαφορά της τιμής του CT του δείγματος αναφοράς μείον της τιμής του CT του δείγματος του γονιδίου αναφοράς (CT<sub>R</sub> δείγματος αναφοράς – CT<sub>R</sub> δείγματος).

Οι τιμές του E κάθε γονιδίου υπολογίζονται όπως περιγράφηκε προηγουμένως από τον Rasmussen, 2001 [265] σύμφωνα με την εξίσωση  $E = 10[-1/\text{κλίση εξίσωσης}]$ , όπου η κλίση της εξίσωσης υπολογίζεται από την γραφική παράσταση του CT έναντι του  $\log(\text{ng του cDNA})$  του μεταγραφόμενου γονιδίου στόχου ή αναφοράς.

**Πίνακας 4.3.** Η ποσότητα cDNA και η συγκέντρωση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια στόχους και τη GAPDH των κυττάρων HEK293.

Γονίδιο	cDNA (ng)	Εκκινητών (nM)
TNFα	15	300
IL1-β	30	300
IL-10	30	300
GAPDH	15/30	200

Αρχική αποδιάταξη του cDNA	95 °C για 180 s	} 41 κύκλοι
Αποδιάταξη του cDNA	95 °C για 3 s	
Υβριδισμός εκκινητών- cDNA	64 °C για 20 s	
Επέκταση εκκινητών	72 °C για 10 s	

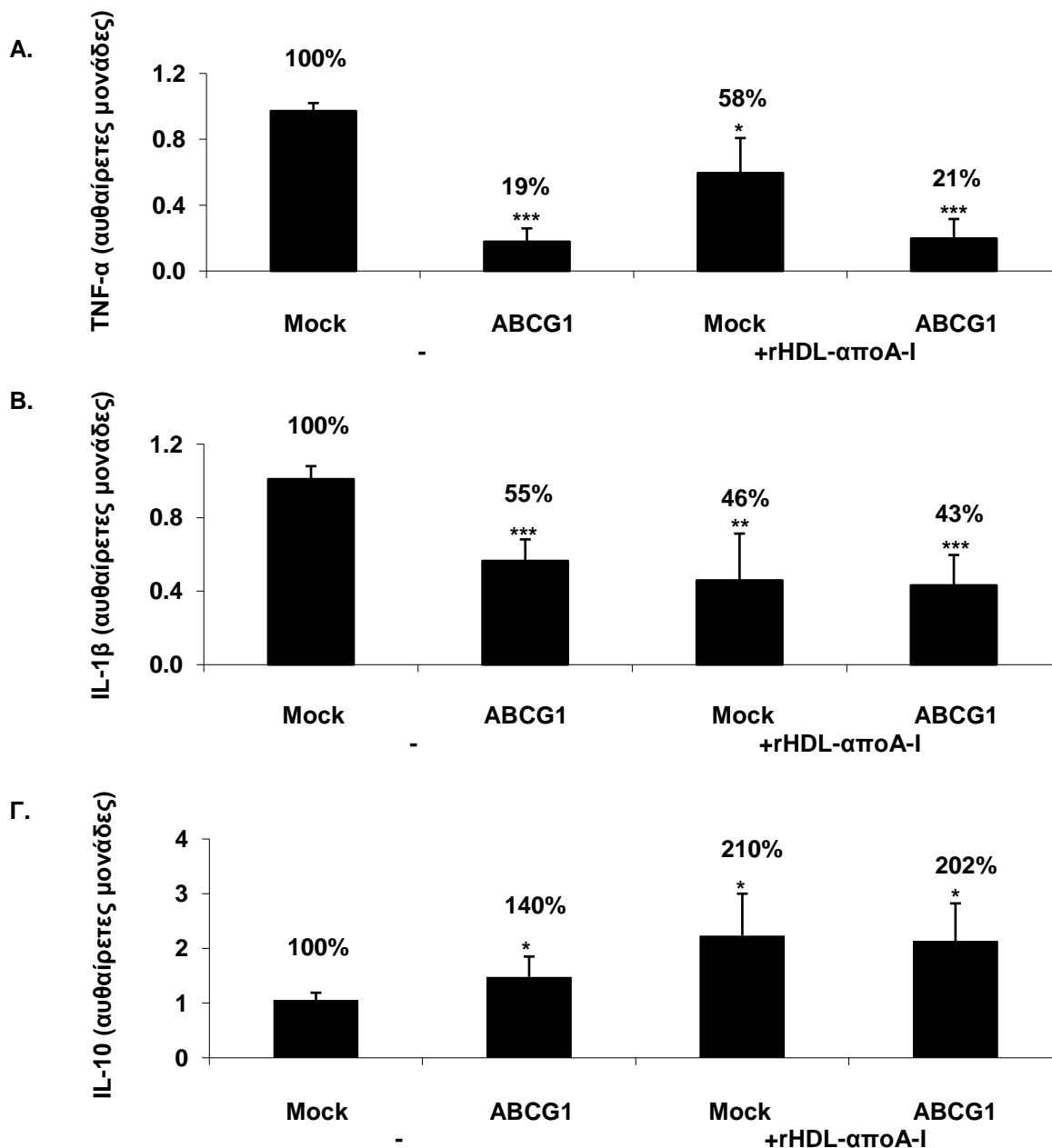
**Εικόνα 4.26.** Πρόγραμμα PCR σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων του TNFα, της IL-1β, της IL-10 και της GAPDH στα κύτταρα HEK293.

Στην **εικόνα 4.27 A και B** φαίνεται ότι όταν κύτταρα HEK293 επιμολύνονται με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1, τα επίπεδα mRNA των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNFα και IL-1β μειώνονται 81% και 45%, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα mock κύτταρα ( $p=0,0001$  και  $p=0,0006$ ). Επίσης, όταν mock κύτταρα επώαστηκαν με rHDL WT αποA-I, τα επίπεδα mRNA των TNFα και IL-1β μειώθηκαν 42% και 54%, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα mock κύτταρα απουσία επώασης με rHDL-αποA-I WT ( $p=0,04$  και  $p=0,0059$ ), ενώ όταν κύτταρα HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 επώαστηκαν με rHDL WT αποA-I, τα επίπεδα mRNA των κυτταροκινών αυτών μειώθηκαν 79% και 57%, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα mock κύτταρα ( $p=0,0005$  και  $p=0,0006$ ). Συνεπώς, φαίνεται ότι η έκφραση του ABCG1 απουσία rHDL οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερη μείωση (81%) των επιπέδων mRNA του TNFα συγκριτικά με τη μείωση που προκαλούν οι rHDL (42%) και παρόμοια μείωση των επιπέδων mRNA της IL-1β (45%), με αυτή της μείωσης που προκαλούν οι rHDL (54%). Έτσι, φαίνεται πως η έκφραση του ABCG1 παρουσία rHDL δεν προκαλεί πολύ μεγάλη περαιτέρω μείωση στα επίπεδα mRNA της IL-1β.

Στην **Εικόνα 4.27Γ** φαίνεται ότι όταν κύτταρα HEK293 επιμολυνθούν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1, τα επίπεδα mRNA της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 αυξήθηκαν κατά 40% ( $p=0,0393$ ), συγκριτικά με τα Mock κύτταρα. Επίσης, όταν Mock κύτταρα επώαστηκαν με rHDL-WT αποA-I, τα επίπεδα mRNA της IL-10 αυξήθηκαν κατά 110% ( $p=0,0222$ ), συγκριτικά με τα Mock κύτταρα απουσία rHDL-WT αποA-I, ενώ όταν κύτταρα HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 επώαστηκαν με rHDL WT αποA-I, τα επίπεδα mRNA της IL-10 αυξήθηκαν 102% ( $p=0,0126$ ), συγκριτικά με τα Mock κύτταρα. Έτσι, φαίνεται και σε αυτήν την κυτταροκίνη πως η παρουσία rHDL σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 δεν προκαλεί περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα mRNA της IL-10.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των κυτταροκινών (μείωση των TNF-α και IL-1β και αύξηση της IL-10), ύστερα από την υπερέκφραση του ABCG1, είναι ανεξάρτητες της μεταφοράς λιπιδίων από το κύτταρο από τον ABCG1, αφού η παρουσία rHDL δεν έχει καμία επιπρόσθετη δράση.





**Εικόνα 4.27.** Επίδραση της έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία rHDL-αποA-I WT στα επίπεδα του mRNA του TNFα (A), της IL-1β (B) και της IL-10 (Γ), σε κύτταρα HEK293. HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) για 4-5 h, έγινε αλλαγή του θρεπτικού και ακολούθησε επώαση για 19-20 h και τελικά επώαστηκαν για 24 h στους 37°C παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL-WT αποA-I. Έπειτα, απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων, ακολούθησε σύνθεση cDNA από το ολικό RNA και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων με αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*,  $p < 0.05$  έναντι Mock; \*\*,  $p < 0.01$  έναντι Mock; \*\*\*,  $p < 0.001$  έναντι Mock

#### 4.2.2.2 Μελέτη των επιπέδων mRNA του TNF-α σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία του αναστολέα της STAT3

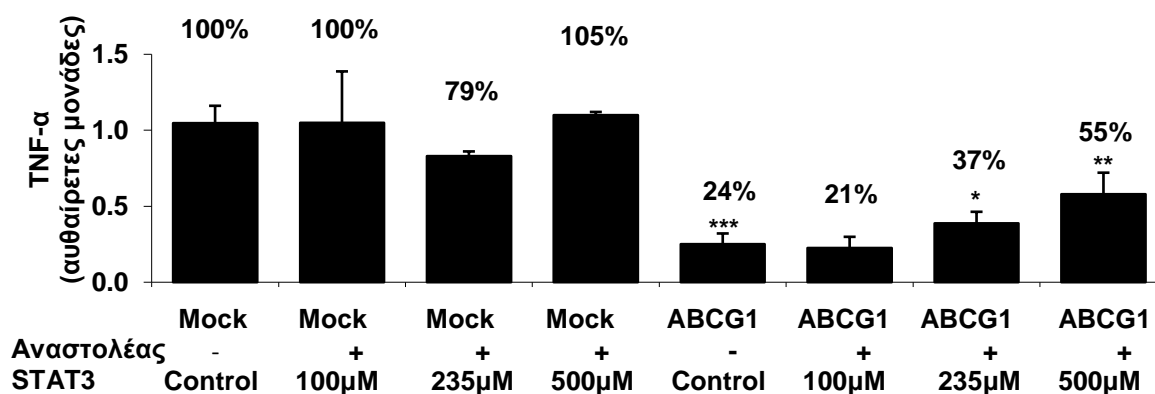
Οι μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription) είναι μια οικογένεια συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων που μεταγουν υψηλής ακρίβειας σήματα από προσδέτες και υποδοχείς οικογενειών κυτταροκινών [266]. Ο STAT3, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των STAT δρα, αφού φωσφορυλιωθεί. Η φωσφορυλιωμένη STAT3, βρέθηκε να δεσμεύεται με τον ABCA1 με έναν αποΑ-I εξαρτώμενο τρόπο. Μεταλλάξεις στον ABCA1 που επηρεάζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου ABCA1/STAT3, δεν επηρέασαν την μέσω ABCA1 εκροή χοληστερόλης, αλλά εμπόδισαν την ικανότητα του ABCA1 να καταστείλει την έκκριση κυτταροκινών σε απόκριση του LPS [51]. Βέβαια έχει αναφερθεί ότι τόσο ο ABCA1 όσο και ο ABCG1 συμμετέχουν στην καταστολή της φλεγμονής έμμεσα με την συμμετοχή τους στην εκροή χοληστερόλης προς αποΑ-I και HDL αντίστοιχα (ανασκόπηση στο [267]). Όμως, επειδή δεν γνωρίζουμε ακόμα πως ο ABCG1 δρα στην καταστολή της φλεγμονής με τρόπο που να μην σχετίζεται με την μεταφορά λιπιδίων από το κύτταρο, θα επιθυμούσαμε να βρούμε το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου δρα αυτός ο μεταφορέας. Έτσι αποφασίσαμε να διερευνήσουμε αν η υπερέκφραση του ABCG1 μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNFα, όπου παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης, μέσω του STAT3.

Για αυτόν το λόγο, HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) και επώαστηκαν παρουσία και απουσία 100, 235 και 500 μM του πεπτιδικού αναστολέα της STAT3 PpYLKTK-mts (ενότητα 3.27). Βλέπουμε στην **Εικόνα 4.28** ότι σε HEK293 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα (Mock+100-500μM) δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα του mRNA του TNF-α συγκριτικά με Mock Control. Επώαση HEK293 κυτάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία 100μM αναστολέα (ABCG1 +100μM) δεν είχε κάποια επίδραση στα επίπεδα του mRNA του TNF-α συγκριτικά με κύτταρα που επώαστηκαν απουσία αναστολέα (ABCG1 Control). Αντίθετα, παρουσία μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αναστολέα (235 και 500μM) σε κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 αυξήθηκαν τα επίπεδα του mRNA του TNF-α συγκριτικά με κύτταρα που επώαστηκαν απουσία

αναστολέα (ABCG1 Control). Έτσι, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι στην καταστολή της έκφρασης του TNF-α από τον ABCG1 συμμετέχει η STAT3.

#### 4.2.2.3 Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης pSTAT3 σε HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία και απουσία του αναστολέα της JAK2 και της PI3K

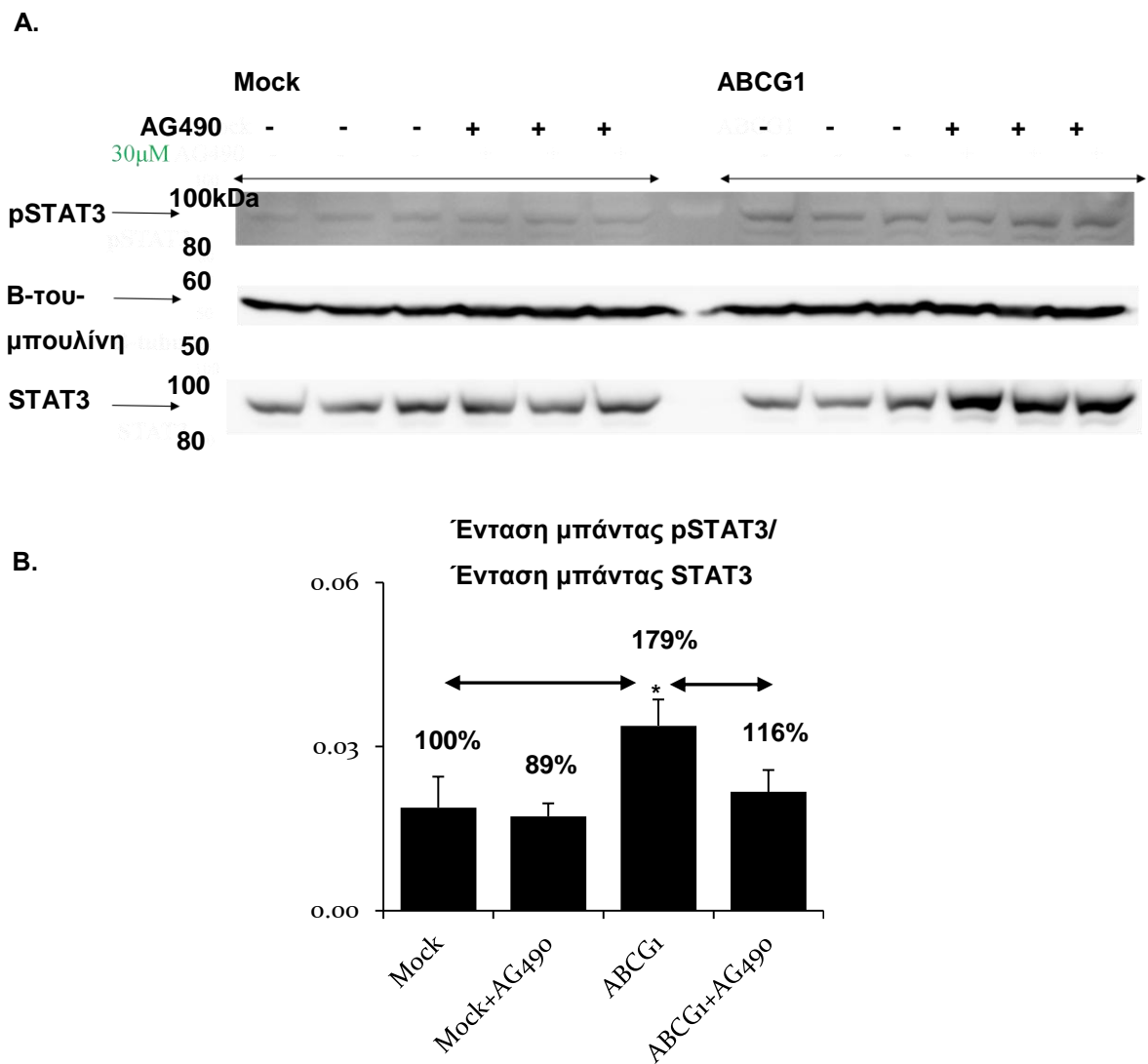
Ο επόμενος μας στόχος ήταν να βρούμε πως ενεργοποιείται η STAT3, ύστερα από την υπερέκφραση του ABCG1, για να καταστείλλει την έκφραση του TNF-α. Η STAT3 φωσφορυλιώνεται και επομένως ενεργοποιείται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της Κινάσης Ιανός 2 (JAK2: JAnus Kinase 2) [224] ή όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της κινάσης της 3 φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase), PI<sub>3</sub>K-AKT-mTOR [225]. Έτσι, σκεφτήκαμε αφού επιμολύνουμε HEK293 κύτταρα με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), να τα επιάσουμε παρουσία και απουσία αναστολέων για την JAK2 ή PI3K και στην συνέχεια να μελετήσουμε τα επίπεδα της pSTAT3 με



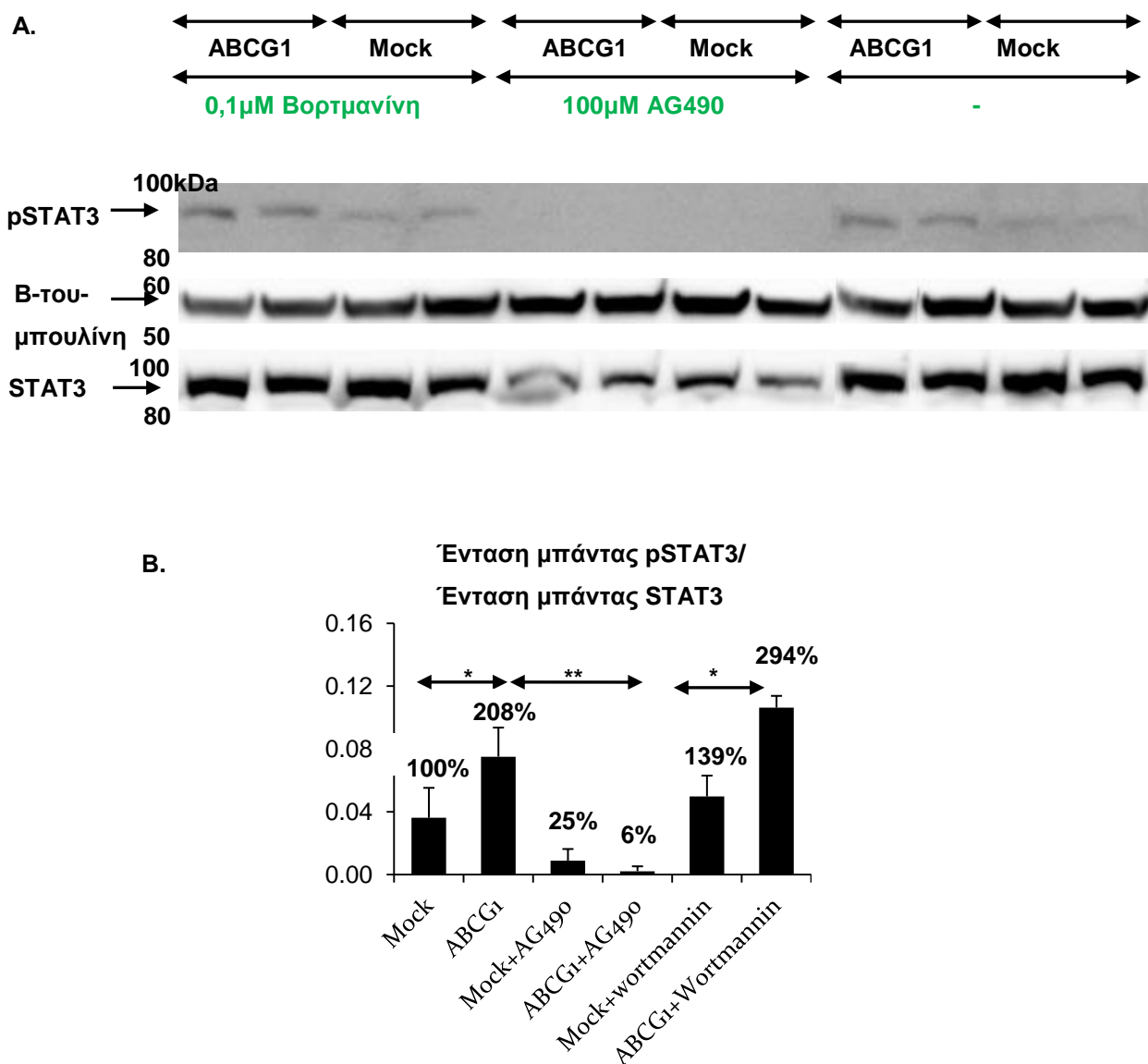
**Εικόνα 4.28. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα του STAT3 στα επίπεδα του mRNA του TNFα σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.** HEK293 κύτταρα επιάζονται για 2 h απουσία και παρουσία 100, 235 και 500 μM του πεπτιδικού αναστολέα της STAT3 PpYLKTK-mts. Στην συνέχεια, τα HEK293 επιμολύνονται με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1) για 4~5 h, έγινε αλλαγή του θρεπτικού και ακολούθησε επώαση για 19-20 h και τελικά επιάστηκαν για 24 h στους 37°C παρουσία ή απουσία 100, 235 και 500 μM του πεπτιδικού αναστολέα της STAT3 PpYLKTK-mts. Έπειτα, απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων, ακολούθησε σύνθεση cDNA από το ολικό RNA και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων με αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση από τρία (100μM PpYLKTK-mts), δυο (235μM PpYLKTK-mts) και τέσσερα ((500μM PpYLKTK-mts)) ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*, p < 0.05 έναντι ABCG1 Control; \*\*, p < 0.01 έναντι ABCG1 Control; \*\*\*, p < 0.001 έναντι Mock Control

ανοσοαποτύπωση κατά western. Ως πρωτεΐνες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν η  $\beta$ -τουμπουλίνη και η STAT3. Στην **Εικόνα 4.29A&B** φαίνεται πως όταν HEK293 κύτταρα επιμολύνονται με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 αυξάνονται τα επίπεδα της pSTAT3 (κανονικοποιημένα ως προς την STAT3) σε κύτταρα που επιμολύνονται με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1. Όταν προστέθηκε ο AG490 (30 $\mu$ M), μειώθηκαν τα επίπεδα της pSTAT3 κανονικοποιημένα προς STAT3 (**Εικόνα 4.29A&B**), ίσως γιατί αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της STAT3 (**Εικόνα 4.29A&B**). Επειδή η αναστολή του JAK2 δεν είχε ξεκάθαρα αποτελέσματα στα επίπεδα της pSTAT3, επαναλάβουμε τα πειράματα παρουσία μεγαλύτερης συκέντρωσης AG490 (100  $\mu$ M) και επίσης χρησιμοποιήσαμε έναν αναστολέα της PI3K (0,1  $\mu$ M Βορτμανίνη).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.30**. Στην **Εικόνα 4.30A&B** φαίνεται πως όταν HEK293 κύτταρα επιμολύνονται με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 αυξάνονται τα επίπεδα της pSTAT3 (κανονικοποιημένα ως προς την STAT3), συγκριτικά με τα κύτταρα που επιμολύνονται με το πλασμίδιο pcDNA3.1. Η χρήση αναστολέα της PI3K (0,1  $\mu$ M Βορτμανίνη) δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στα επίπεδα της pSTAT3 (κανονικοποιημένα ως προς την STAT3), συγκριτικά με τα κύτταρα απουσία αναστολέα, χωρίς να επηρεάζεται έτσι η αύξηση της pSTAT3 ύστερα από την υπερέκφραση του ABCG1 (**Εικόνα 4.30A&B**). Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, όταν τα κύτταρα (Mock ή ABCG1) επώαστηκαν παρουσία 100  $\mu$ M AG490, τα επίπεδα pSTAT3 (κανονικοποιημένα ως προς την STAT3) παρουσίασαν πολύ μεγάλη μείωση (**Εικόνα 4.30A&B**). Τέλος, τα επίπεδα της STAT3 (κανονικοποιημένα ως προς την  $\beta$ -τουμπουλίνη) δεν επηρεάστηκαν ύστερα από υπερέκφραση του ABCG1, απουσία ή παρουσία αναστολέων (**Εικόνα 4.30A**). Η μόνη παρατηρήσιμη αλλαγή στα επίπεδα της STAT3 ήταν η μείωση των επιπέδων της σε κύτταρα (Mock ή ABCG1) ύστερα από επώαση τους με 100  $\mu$ M AG490, συγκριτικά με κύτταρα (Mock ή ABCG1) που δεν επώαστηκαν με κάποιο αναστολέα. Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι ο ABCG1 καταστέλλει την έκφραση του TNF $\alpha$  μέσω του μονοπατιού που συμμετέχει ο STAT3, η οποία ενεργοποιείται από την JAK2 και όχι από την PI3K.



**Εικόνα 4.29. Επίδραση 30 μM αναστολέα του JAK2 (AG490) στα επίπεδα της πρωτεΐνης pSTAT3 σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.** Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν η β-τουμπουλίνη και η STAT3. Κύτταρα HEK 293 επωάζονται για 4 h απουσία και παρουσία 30 μM AG490. Στην συνέχεια, τα HEK293 επιμολύνονται με το πλασμίδιο pcDNA3.1 ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 απουσία και παρουσία 30 μM AG490 για ~4-5 h. Ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού μέσου απουσία και παρουσία 30 μM AG490, επώαση για 19-20 h και την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται και λύνονται με την προσθήκη διαλύματος λύσης και έκθεση σε θάλαμο υπερήχων (ενότητα 3.27). Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7, και οι pSTAT3, STAT3 και β-τουμπουλίνη ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωση κατά western (ενότητα 3.9) (A). Οι εντάσεις των μπαντών των pSTAT3 και STAT3 μετρήθηκαν με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image J και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι του λόγου pSTAT3/ STAT3 (B). Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. \*,  $p < 0.05$  για ABCG1 έναντι Mock και ABCG1+AG490 έναντι ABCG1.



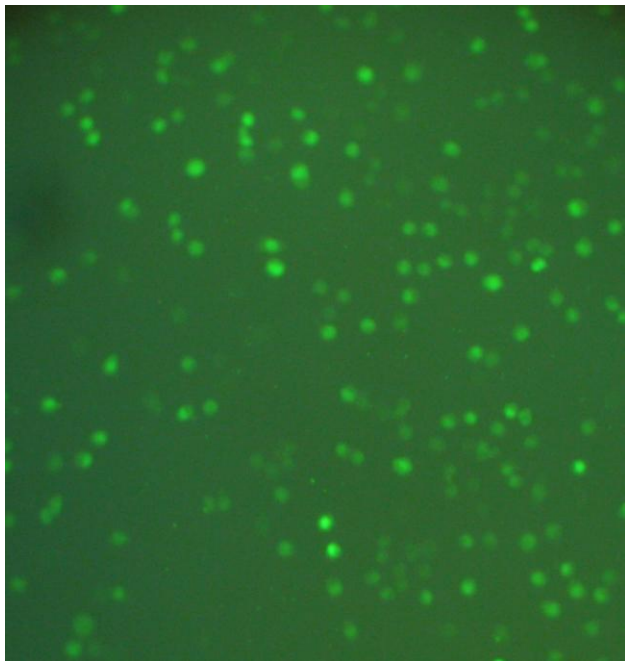
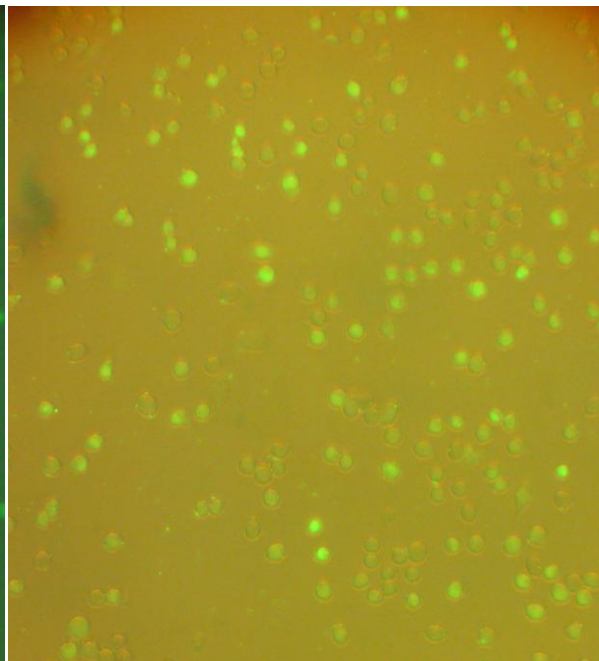
**Εικόνα 4.30. Επίδραση 100  $\mu$ M αναστολέα του JAK2 (AG490) ή 0,1  $\mu$ M αναστολέα της PI3K (Βορτμανίνη) στα επίπεδα της πρωτεΐνης pSTAT3 σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1.** Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν η  $\beta$ -τουμπουλίνη και η STAT3. Κύτταρα HEK 293 επωάζονται για 4 h απουσία και παρουσία 100  $\mu$ M AG490 ή 0,1  $\mu$ M Βορτμανίνη. Στην συνέχεια, τα HEK293 επιμολύνονται με το πλασμίδιο pcDNA3.1 ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 απουσία και παρουσία αναστολέων για ~4-5 h. Ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού μέσου απουσία και παρουσία αναστολέων, επώαση για 19-20 h και την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται και λύνονται με την προσθήκη διαλύματος λύσης και έκθεση σε θάλαμο υπερήχων (ενότητα 3.27). Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7, και οι pSTAT3, STAT3 και  $\beta$ -τουμπουλίνη ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωση κατά western (ενότητα 3.9) (A). Οι εντάσεις των μπαντών των pSTAT3 και STAT3 μετρήθηκαν με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image J και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι του λόγου pSTAT3/ STAT3 (B). Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*,  $p < 0.05$  για ABCG1 έναντι Mock (απουσία ή παρουσία Βορτμανίνης). \*\*  $p < 0.01$  για ABCG1+AG490 έναντι ABCG1

#### 4.2.2.4 Μελέτη των επιπέδων mRNA του TNFα σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ύστερα από τη διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNAi)

Τον ρόλο του ABCG1 στην ρύθμιση των επιπέδων του TNFα θα θέλαμε να εξετάσουμε και σε ένα άλλο πιο φυσιολογικά σχετικό κυτταρικό τύπο. Επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά των μακροφάγων RAW 264.7 μύς, για το λόγο ότι τα μακροφάγα είναι τα κατ'εξοχήν κύτταρα που συμμετέχουν στην έκκριση κυτταροκινών που λαμβάνει χώρα στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο των αρτηριών και γιατί τα συγκεκριμένα μακροφάγα χρησιμοποιούνται εκτενώς από πολλές άλλες ερευνητικές ομάδες. Στα κύτταρα αυτά εκφράζεται φυσιολογικά ο μεταφορέας ABCG1. Επομένως για να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με τον ρόλο του, έπρεπε να παρέμβουμε στην έκφραση του. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNAi) στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (ενότητα 3.21) και στην συνέχεια έγινε επιβεβαίωση της αποσιώπησης του ABCG1 σε επίπεδο mRNA με real-time PCR [268] και έπειτα ελέγχθηκε η επίδραση της αποσιώπησης του ABCG1 στα επίπεδο mRNA του TNFα.

Λόγω έλλειψης εμπειρίας με την εφαρμογή της τεχνικής του RNAi και για διευκόλυνση της πειραματικής διαδικασίας, έγινε εκπαίδευση στα πειράματα του RNAi στο εργαστήριο του καθηγητή Dr Arnold von Eckardstein, στο Ινστιτούτο Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ζυρίχης και κατόπιν η τεχνική εφαρμόστηκε στο εργαστήριο μας. Αφού βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της τεχνικής, απομονώθηκε το ολικό RNA, για να εκτιμηθεί το ποσοστό μείωσης των επιπέδων του mRNA του ABCG1 μέσω real time PCR. Η συγκέντρωση του RNAi που θα χρησιμοποιούνταν θα έπρεπε να ήταν αρκετή για να προκαλέσει τη βέλτιστη δυνατή μείωση του ABCG1, άλλα όχι τόσο υψηλή ώστε να καθιστάται τοξική για τα κύτταρα της καλλιέργειας.

RAW264.7 κύτταρα επιμολύνθηκαν με 67 nM BLOCK-iT™ φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, μαζί με μη κωδικό RNAi ή 100 nM RNAi έναντι του ABCG1 μύς, όπως περιγράφεται στην ενότητα ενότητα 3.21. Το φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού η επίτευξη της επιμόλυνσης, ενώ το μη κωδικό RNAi, είναι ένα δίκλωνο μόριο RNA ίσης συγκέντρωσης και μήκους όσο το RNAi που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί η αποσιώπηση του γονιδίου, με την διαφορά ότι δεν αποσιωπεί κανένα γονίδιο. **Στην Εικόνα 4.31** βλέπουμε φωτογραφία που λήφθηκε από μικροσκόπιο φθορισμού από RAW 264.7 6h μετά την ταυτόχρονη επιμόλυνση τους με BLOCK-iT™ φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, μαζί με RNAi έναντι του ABCG1 μύς.

**A.****B.**

**Εικόνα 4.31.** Φωτογραφία από μικροσκόπιο φθορισμού κυττάρων RAW 264.7 6h μετά την ταυτόχρονη επιμόλυνση τους με BLOCK-iT<sup>TM</sup> φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο, μαζί με RNAi έναντι του ABCG1 μύς A) με ανοιχτή τη λάμπα φθορισμού και B) με κλειστή τη λάμπα φθορισμού.

Η επιμόλυνση των κυττάρων είναι επιτυχής και λαμβάνει χώρα με απόδοση περίπου 75%. Επίσης, φωτογραφίες επιτυχούς επιμόλυνσης λήφθηκαν ύστερα από ταυτόχρονη επιμόλυνση με BLOCK-iT<sup>TM</sup> φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο και μη κωδικό RNAi ή μόνο με BLOCK-iT<sup>TM</sup> φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) των RAW 264.7 κυττάρων. Αφού λύθηκαν τα κύτταρα, ακολούθησε απομόνωση του RNA. Όσον αφορά το RNA που απομονώθηκε και καθαρίστηκε από τα κύτταρα, ελέγχθηκε ως προς τη καθαρότητά, όπως παρουσιάζεται και στην ενότητα 4.2.2.1 και η ποιότητα του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρησή σε πηκτή αγαρόζης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ήταν αντίστοιχο με αυτό της **Εικόνα 4.25**.

Από το ολικό RNA έγινε σύνθεση του cDNA και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων (ABCG1, TNF $\alpha$ ) με real-time PCR. Η επιλογή εκκινητών είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του καθηγητή Dr Arnold von Eckardstein [268]. Τα ζεύγη πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών, οι αλληλουχίες και τα τεχνικά χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον **πίνακα 4.4**. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase,). Οι αλληλουχίες και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών για την GAPDH, παρουσιάζονται επίσης στον **πίνακα 4.4**.



**Πίνακας 4.4.** Η αλληλουχία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και το μήκος των τμημάτων επί των γονιδίων που περικλείουν ανά ζεύγη.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5' → 3'	Tm (°C)	Ποσοστό GC (%)	Μήκος επί του γονιδίου που περικλείουν (bp)
<b>m-ABCG1-F</b>	GCCGCTCCATCGTCTGTA	58	61%	309
<b>m-ABCG1-R</b>	GCCAAAGAAACGGGTTCAC	58	53%	
<b>m-GAPDH-F</b>	CGACCCCTTCATTGAC	58	56%	189
<b>m-GAPDH-R</b>	TCCACGACATACTCAGCAC	58	53%	
<b>m-TNFα-F</b>	GTGGAAGTGGCAGAAGAGGC	62	60%	122
<b>m-TNFα-R</b>	AGACAGAAGAGCGTGGTGGC	62	60%	

Οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης PCR επιλέχθηκαν κατόπιν δοκιμαστικών πειραμάτων κατά τα οποία μελετήθηκαν η ποσότητα του cDNA, η συγκέντρωση των εκκινητών, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης και η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών-cDNA, όσον αφορά τον TNFα, ενώ όσον αφορά τον ABCG1 και την GAPDH οι συνθήκες ήταν αυτές που εφαρμόζανε στο εργαστήριο του καθηγητή Dr Arnold von Eckardstein. Η ποσότητα του cDNA και η συγκέντρωση των εκκινητών που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.5** και στην **Εικόνα 4.32**, αντίστοιχα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2.1. Τα επίπεδα mRNA αυτών των κυτταροκινών είναι κανονικοποιημένα ως προς την GAPDH.

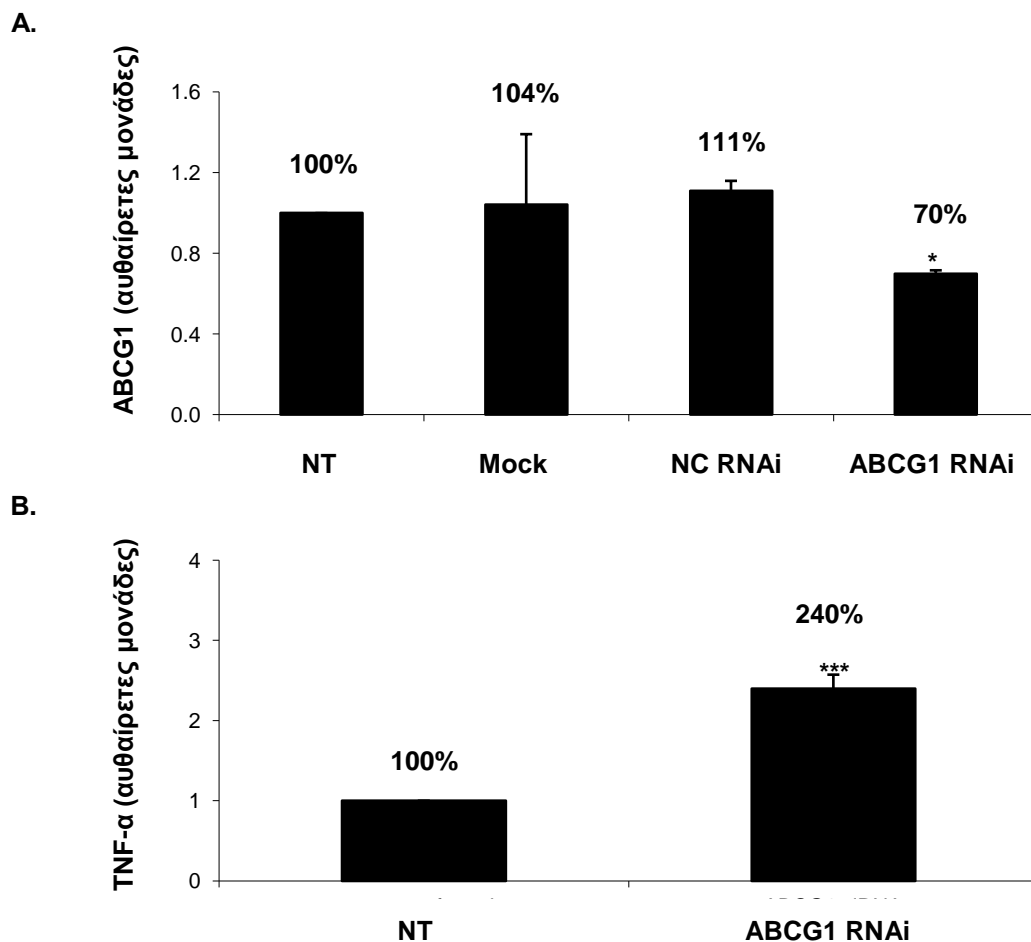
Στην **Εικόνα 4.33** φαίνεται πως όταν με την δοκιμασία παρεμπόδισης του ABCG1 επιτευχθεί 30% μείωση των επιπέδων του mRNA του ABCG1 (**Εικόνα 4.33A**), αυτό είχε σαν αποτέλεσμα στην αύξηση των επιπέδων του mRNA του TNFα κατά 140% (**Εικόνα 4.33B**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο ABCG1 έχει αντιφλεγμονώδη δράση, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα HEK293 κύτταρα.

Πίνακας 4.5. Η ποσότητα cDNA και η συγκέντρωση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια στόχους και τη GAPDH των κυττάρων RAW 264.7

Γονίδιο	cDNA (ng)	Εκκινητών (nM)
ABCG1α	10	400
GAPDH	10	400
TNFα	10	400

Αρχική αποδιάταξη του cDNA	95°C	για 180 s	
Αποδιάταξη του cDNA	95°C	για 3 s	} 35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών- cDNA	α58°C/β62°C	για 20 s	
Επέκταση εκκινητών	72°C	για 10 s	

Εικόνα 4.32. Πρόγραμμα PCR σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων του αABCG1, βTNFα και αGAPDH στα κύτταρα RAW264.7



**Εικόνα 4.33.** Επίδραση της διαδικασίας παρεμπόδισης του ABCG1 (ABCG1 RNAi) στα επίπεδα του mRNA του ABCG1 και του TNFα σε κύτταρα RAW 264.7. Κύτταρα RAW 264.7 δεν επιμολύνθηκαν (NT), επωάστηκαν μόνο με λιποφεκταμίνη 2000 (Mock), επιμολύνθηκαν με το μη κωδικό RNAi (NC RNAi) ή επιμολύνθηκαν με το RNAi έναντι του ABCG1. Το ολικό RNA απομονώθηκε 48 ώρες μετά την επιμόλυνση και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων με αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση από δυο ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. \*,  $p < 0.05$  έναντι NT; \*\*\*,  $p < 0.001$  έναντι NT.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### **5.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HDL από άτομα με συγκεκριμένες διαταραχές του μεταβολισμού της HDL ή από άτομα με στεφανιαία νόσο (ΣΝ).**

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι HDL έχουν προστατευτικές δράσεις, αφού αναστέλλουν ή και υποστρέφουν την αθηροσκλήρωση σε μοντέλα ζώων. Πολλές μελέτες την τελευταία δεκαετία υποδηλώνουν ότι γενετικοί παράγοντες ρυθμίζουν τόσο τα επίπεδα της HDL-c όσο και την λειτουργικότητα της HDL [228]. Βέβαια, δομικές και λειτουργικές αλλαγές της HDL έχουν επίσης αναφερθεί στην χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης (ανασκόπηση στο [171]). Υποστηρίζεται δε τα τελευταία χρόνια ότι οι δράσεις των HDL εξαρτώνται περισσότερο από την ποιότητα των HDL, παρά από την ποσότητα της HDL-χοληστερόλης [228].

#### **5.1.1 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL και των υποπληθυσμών της που περιέχουν αποA-I από άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL**

Μεταλλάξεις σε διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβολισμού της HDL μπορούν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές και να αναστείλλουν την βιογένεση της HDL ή να οδηγήσουν σε σχηματισμό HDL σωματιδίων με ανώμαλη σύσταση, σχήμα, μέγεθος ή λειτουργίες. Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να εξετάσουμε αν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αποA-I, ABCA1 και LCAT επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και τους HDL υποπληθυσμούς που περιέχουν την αποA-I.

Συγκρίναμε τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL ατόμων με μεταλλάξεις στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL και ατόμων αναφοράς με την δοκιμασία του DCF, βασισμένοι στην αρχική δημοσίευση του Navab et al [202]. Η δοκιμασία που χρησιμοποιήσαμε εκτιμάει την ικανότητα της HDL (κανονικοποιημένη ως προς HDL-c) να απενεργοποιήσει την OxLDL. Παρ'όλα αυτά κανονικοποιήσαμε και ως προς HDL-

ris, χωρίς να παρατηρήσουμε καμία διαφορά. Για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL, μετρήσαμε την δραστικότητα των ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση της HDL PON1, PAF-AH και LCAT και τα επίπεδα των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (κυρίως μηλονικής διαλδεΐδης, MDA: malondialdehyde). Τέλος, μετρήσαμε τα επίπεδα των προφλεγμονωδών μορίων PAF και SAA που σχετίζονται με την HDL [141,229]. Τα άτομα με μονογονιδιακά σύνδρομα χαμηλής HDL που μελετήθηκαν ήταν ετεροζυγώτες (Het), διπλά ετεροζυγώτες (Comp) και ομοζυγώτες (Hom) για μεταλλάξεις σε ένα από τα τρία γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL, της apoA-I ή του ABCA1 ή της LCAT. Επίσης, κάποια άτομα των οικογενειών των ασθενών με συγγένεια πρώτου, δεύτερου και τρίτου βαθμού, οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλάξεις για τα παραπάνω γονίδια χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση.

Οι apoA-I Het (apoA-I[r.L202P]) παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα της HDL-c, της apoA-I, της apoA-II και τις ολικής χοληστερόλης (TC) συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Η HDL των apoA-I Het βρέθηκε να έχει μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα (μειωμένη ικανότητα να αναστείλλει την OxLDL, η οποία προκαλεί την οξειδωση του DCFH και την απελευθέρωση του DCF) συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς και αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με τη μείωση της δραστικότητας της PON1, τα αυξημένα επίπεδα του PAF και την αυξημένη συγκέντρωση σε MDA στα σωματίδια της HDL των apoA-I Het. Όσον αφορά την ανάλυση των HDL υποπληθυσμών που περιέχουν apoA-I με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, οι apoA-I Het παρουσίασαν έλλειψη του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού και μια ευδιάκριτη μείωση του  $\alpha_3$  υποπληθυσμού που περιέχει apoA-I, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Παλαιότερη μελέτη έχει δείξει ότι οι apoA-I Het που εξετάσαμε στην παρούσα διατριβή (apoA-I[r.L202P]) παρουσίασαν ένα πολύ επιβλαβές λιποπρωτεϊνικό προφίλ, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, *πάχυνση* του καρωτιδικού τοιχώματος και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [230]. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα μειωμένα επίπεδα της HDL-c, η μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα της HDL και το διαφοροποιημένο προφίλ των HDL υποπληθυσμών των apoA-I Het (apoA-I[r.L202P]) μπορεί να παίζουν ρόλο στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου αυτών των ατόμων.

Οι ABCA1 Het παρουσίασαν μείωση της HDL-c και της apoA-I συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Σε αντίθεση με τους apoA-I Het, δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της apoA-II από τους ABCA1 Het, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Οι ABCA1 Comp

ή Hom εμφάνισαν υπερβολικά χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HDL-c, αποA-I και αποA-II στον ορό τους, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Η HDL των ABCA1 Het (p.C1477R ή p.L1056P) βρέθηκε να έχει μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. Μάλιστα, η HDL των ABCA1 Het (p.C1477R) φαίνεται να έχει ακόμα πιο μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα συγκριτικά με την HDL των ABCA1 Het (p.L1056P). Παλαιότερη μελέτη έχει δείξει πως οι ABCA1 Het (p.C1477R), αλλά όχι οι ABCA1 Het (p.L1056P), έχουν αυξημένη καρδιαγγειακή νόσο συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς [240,241]. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να συσχετιστούν με τα τρέχοντα αποτελέσματα (αν και ο αριθμός των ατόμων που μελετήθηκαν είναι μικρός) που δείχνουν ότι η HDL των ABCA1 Het (p.C1477R) βρέθηκε να είναι πιο οξειδωμένη και να περιέχει υψηλότερα επίπεδα MDA συγκριτικά με την HDL των ABCA1 Het (p. L1056P). Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση στην δραστικότητα της PAF-AH της HDL των ABCA1 Het συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, η οποία θα μπορούσε να δικαιολογήσει εν μέρει την ύπαρξη πιο οξειδωμένων/προφλεγμονωδών HDL, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς.

Οι ABCA1 Comp (p.C1477R/ IVS25+1G>C) και ο ABCA1 Hom (p.L1056P) έχουν παρουσιάσει καρδιαγγειακή νόσο [240,241], σε αντίθεση με τον ABCA1 Comp (p.Q1038X/ p.N1800H) [241]. Η HDL των ABCA1 Comp βρέθηκε να έχει πολύ μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς, το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί από την μεγάλη μείωση της δραστικότητας τόσο της PON1, όσο και της PAF-AH και την εκπληκτικά μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης του SAA και του MDA. Όμοια με τους Comp αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν και στον Hom. Επομένως η μείωση της δραστικότητας της PON1 και της PAF-AH και η αυξημένη συγκέντρωση των SAA και MDA στα HDL σωματίδια θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την ύπαρξη πιο οξειδωμένων/προφλεγμονωδών HDL στους ABCA1 Comp / Hom συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Οι ABCA1 Het παρουσίασαν μια εκτεταμένου βαθμού μείωση του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  και μικρότερου βαθμού μείωσης του  $\alpha_2$  HDL υποπληθυσμών που περιέχει αποA-I, ενώ στους ABCA1 Comp και Hom παρατηρήθηκε ύπαρξη μόνον των υψηλής κινητικότητας  $\alpha_4$  και προ-β HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποA-I, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Έλλειψη του  $\alpha_1$  και μείωση του  $\alpha_2$  HDL υποπληθυσμών που περιέχει αποA-I έχει ήδη αναφερθεί σε ABCA1 Het με διαφορετικές μεταλλάξεις (p.N1800H ή σημειακή μετάλλαξη και μετατροπή του κωδικονίου για το αμινοξύ 217 σε κωδικόνιο τερματισμού), ενώ ομοζυγώτες (ασθενείς με τη νόσο της Τανγκέρης) αναφέρθηκε να παρουσιάζουν μόνο τους προ-β HDL υποπληθυσμούς που περιέχουν αποA-I [269]. Σε

αυτήν την μελέτη είχε αναφερθεί ότι η μείωση του μεγάλου  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού σε Het αυξάνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [269]. Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι μεταλλάξεις στον ABCA1 επηρεάζει την δομή και τις λειτουργίες της HDL και πως ο ABCA1 μπορεί να συνεισφέρει στις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL.

Οι LCAT Het εμφάνισαν μείωση της HDL-c, της αποA-I και της αποA-II συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ η μείωση της HDL-c, της αποA-I και της αποA-II συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς ήταν ακόμα μεγαλύτερη στους LCAT Comp και Hom. Τόσο οι LCAT Het όσο και οι LCAT Comp και Hom βρέθηκε να έχουν μειωμένη αντιοξειδωτική/αντιφλεγμονώδη ικανότητα συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς. Η μείωση των αντιοξειδωτικών / αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της HDL των LCAT Het θα μπορούσε να αποδοθεί στην μειωμένη δραστηριότητα της LCAT και στην αυξημένη συγκέντρωση MDA στα HDL σωματίδια, ενώ στην περίπτωση LCAT Comp και Hom εκτός της δραματικής μείωσης της δραστηριότητας της LCAT, η μείωση της δραστηριότητας της PAF-AH και η αυξημένη συγκέντρωση MDA των HDL σωματιδίων θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την ύπαρξη πιο οξειδωμένων/ προφλεγμονωδών HDL, συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Σε παλαιότερη εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ LCAT και αθηροσκλήρωσης, χρησιμοποιώντας μετρήσεις πάχους των τοιχωμάτων των καρωτιδικών αρτηριών, και βρέθηκε ότι οι LCAT Het (P34Q, T147I, N155D, V333M και IVS4-22T>C) είχαν αυξημένη αθηροσκλήρωση συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς [270]. Σε άλλη μελέτη, αναφέρθηκε ότι οι LCAT Hom (N155D) πάσχουν από πρόωμη αγγειακή νόσο [236]. Έτσι, μπορεί η προχωρημένη αθηροσκλήρωση των ατόμων με μεταλλάξεις στην LCAT να σχετίζεται με μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σε ένα περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα HDL-c.

Σε ανάλυση των HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποA-I οι LCAT Het παρουσίασαν μια εκτεταμένου βαθμού μείωση του χαμηλής κινητικότητας  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμού που περιέχει αποA-I και σε ορισμένες περιπτώσεις εμφάνισαν επίσης μείωση του  $\alpha_2$  υποπληθυσμού. Στους LCAT Comp και Hom η αποA-I βρέθηκε κυρίως στους γρήγορης κινητικότητας  $\alpha_4$  HDL υποπληθυσμούς, ενώ μια μικρή ποσότητα αποA-I βρέθηκε στον  $\alpha_3$  υποπληθυσμό.

Σε παλαιότερη εργασία όπου συγκρίνονται οι HDL υποπληθυσμοί LCAT Het και LCAT Hom (οι ακριβείς μεταλλάξεις δεν αναγνωρίστηκαν και δεν χαρακτηρίστηκαν) με άτομα αναφοράς, οι LCAT Het στερούνταν τους χαμηλής κινητικότητας HDL υποπληθυσμούς που περιέχουν αποA-I, ενώ στους LCAT Hom ανιχνεύτηκαν οι μικροί, φτωχοί λιπιδίων HDL υποπληθυσμοί ( $\alpha_1$  και  $\alpha_4$ ) [270]. Η μείωση των  $\alpha_1$  HDL υποπληθυσμών που

περιέχουν αποΑ-I έχει παρατηρηθεί παλαιότερα σε άτομα με καρδιαγγειακά νοσήματα [126]. Γενικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις της LCAT μπορεί να επηρεάζουν τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL.

Στον **Πίνακα 5.1** παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην HDL σε φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια της αποΑ-I, ABCA1 και LCAT και αφορούν τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και την κατανομή των υποπληθυσμών της.

Συνοπτικά, παρουσιάσαμε εδώ α) τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και β) το προφίλ των HDL υποπληθυσμών σε φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια της αποΑ-I, ABCA1 και LCAT. Η μελέτη μας δείχνει ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό HDL με μειωμένες αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες παρατηρούνται σε συνδυασμό με μειωμένες δραστηριότητες των ενζύμων PON1 ή PAF-AH ή LCAT και σε κάποιες περιπτώσεις με αυξημένα επίπεδα PAF και SAA. Επιπλέον, μεταλλάξεις στα γονίδια της αποΑ-I, ABCA1 και LCAT οδηγούν σε διαφοροποιημένο προφίλ HDL υποπληθυσμών που περιέχουν αποΑ-I. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες που αναφέρουν ότι φορείς κάποιων από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν αυξημένη αθηροσκλήρωση [230,240,241,270]. Τελικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι οι αποΑ-I, ABCA1 και LCAT όχι μόνο επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL-c, αλλά επηρεάζουν και τα λειτουργικά και φυσικά χαρακτηριστικά της HDL. .

### **5.1.2 Χαρακτηρισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από μεγάλο αριθμό ατόμων με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT**

Στην συνέχεια, εξετάστηκε μεγαλύτερο μέγεθος πληθυσμού από άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT με σκοπό να διευκρινίσουμε καλύτερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL στα άτομα αυτά. Η παραπάνω μελέτη έγινε σε συνεργασία με τις ομάδες του Dr. Jan Albert Kuivenhoven από το τμήμα Αγγειακής Ιατρικής, του Ακαδημαϊκού Κέντρου Ιατρικής του Άμστερνταμ και το Κέντρο Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Γκρόνινγκεν, Τμήμα Παθολογίας και Ιατρικής Βιολογίας, Τομέα Ιατρικής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική, του Dr. Stanley Hazen από το Κέντρο Καρδιαγγειακής Διάγνωσης & Πρόληψης, της Κλινικής του Κλίβελαντ στο Οχάιο, του Dr Joseph Witztum και του Dr Sotirios Tsimikas από τους Τομείς Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού και Τομέα Καρδιαγγειακών Ασθενειών, του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας στο Σαν Ντιέγκο.



Πίνακας 5.1. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην HDL σε φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια της αποΑ-I, ABCA1 και LCAT και αφορούν τις αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και την κατανομή των υποπληθυσμών της.

	ΑποΑ-I Het	ABCA1 Het	ABCA1 Com/Hom	LCAT Het	LCAT Com/Hom
Αντιοξειδωτικές/ αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL	Μειωμένες	Μειωμένες	Μειωμένες	Μειωμένες	Μειωμένες
Δραστικότητα PON1	Μειωμένη	Φυσιολογική	Μειωμένη	Φυσιολογική	Φυσιολογική
Δραστικότητα PAF-AH	Φυσιολογική	Μειωμένη	Μειωμένη	Φυσιολογική	Μειωμένη
Δραστικότητα LCAT	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Μειωμένη	Μειωμένη
Επίπεδα SAA/HDL-c	Φυσιολογικά	Φυσιολογικά	Αυξημένα	Φυσιολογικά	Φυσιολογικά
Επίπεδα PAF	Αυξημένα	Φυσιολογικά	Φυσιολογικά ή μη ανιχνεύσιμα	Φυσιολογικά	Φυσιολογικά ή μη ανιχνεύσιμα
Επίπεδα MDA/HDL-c	Αυξημένα	Φυσιολογικά	Αυξημένα	Αυξημένα	Αυξημένα
ΑποΑ-I HDL Υποπληθυσμοί	Έλλειψη του α1, μείωση του α3	Έλλειψη του α1	Έλλειψη του α1, α2, α3	Έλλειψη του α1 (και μείωση του α2)	Έλλειψη του α1, α2, α3 και προβ

Οι LCAT Het εμφάνισαν σημαντική μείωση της HDL-c, της αποΑ-I και της αποΑ-II συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ οι LCAT Comp και Hom είχαν πολύ μεγάλη μείωση της HDL-c, της αποΑ-I και της αποΑ-II συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Εμείς μελετήσαμε τις δραστικότητες των ενζύμων PON1 και PAF-AH και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL με την δοκιμασία του DCF, ενώ οι συνεργάτες μας την δραστικότητα της LCAT, τα επίπεδα του αραχιδονικού και του λινολεϊκού οξέος, καθώς και τα οξειδωμένα παράγωγα τους, τα επίπεδα των ανοσοδραστικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απο(a) και αποB, τα επίπεδα των IgM και IgG αυτοαντισωμάτων έναντι της MDA των LDL και τα επίπεδα των IgG and IgM των αποB ανοσοσυμπλόκων.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η PON1 μπορεί να αναστείλλει την βιολογική δραστηριότητα της ελαφρώς οξειδωμένης LDL (OxLDL) [149] και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (OxPL) [150], υποδηλώνοντας ότι η PON1, όπως και η LCAT και η PAF-AH, μπορεί να υδρολύσει τα OxPL [149,150]. Η πλήρη έλλειψη HDL σε LCAT Hom στην παρούσα μελέτη σχετίζεται με πολύ χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου PON1. Μια μείωση της τάξεως του 40% στα επίπεδα της HDL-c σε LCAT Het παρ'όλα αυτά δεν είχε κάποια επίδραση στην δραστηριότητα της PON1, υποδηλώνοντας ότι η HDL μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για την δραστηριότητα της PON1 μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα της HDL-c. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν επίσης ότι η PON1 είναι απίθανο να συνεισφέρει στην τροποποιημένη οξείδωση των λιπιδίων στους LCAT Het.

Υπάρχουν πολλές ενδείξεις που αναφέρουν ότι η PAF-AH της HDL παρουσιάζει αντιαθηρογόνες και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω της ικανότητας της να παρεμποδίζει την βιολογική δράση της OxLDL μέσω της υδρόλυσης των OxPL [146,271]. Η καθαρά εξατώμενη από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων μείωση της δραστηριότητας της PAF-AH της HDL σε φορείς μεταλλάξεων για την LCAT είναι πιο ευαίσθητη από ότι η PON1 στις διαταραχές της ομοιόστασης της HDL. Η LCAT έχει αναφερθεί να υδρολύει τον PAF, αλλά με ρυθμό 200x μικρότερο συγκριτικά με την PAF-AH [272]. Συνεπώς, είναι απίθανο η απώλεια της δραστηριότητας της LCAT να συνεισφέρει στην μειωμένη υδρόλυση του PAF στην δοκιμασία δραστηριότητας της PAF-AH.

Εκτός από την PAF-AH και την LCAT, η PON1 της HDL έχει επίσης αναφερθεί να υδρολύει τον PAF [273]. Παρ'όλα αυτά στους LCAT Het η συνεισφορά της PON1 στην δραστηριότητα PAF-AH είναι πιθανότατα μικρής σημασίας, επειδή η δραστηριότητα της PAF-AH ήταν σημαντικά μειωμένη σε αυτά τα άτομα συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ η PON1 δραστηριότητα δεν διαφέρει μεταξύ LCAT Het και άτομα αναφοράς. Στον μικρό αριθμό Hom/Comp που εξετάστηκαν, τόσο η δραστηριότητα της PAF-AH όσο και της PON1 μειώθηκαν πάρα πολύ. Έτσι, η μειωμένη δραστηριότητα της PAF-AH στους ασθενείς της παρούσας μελέτης μπορεί να συνεισφέρουν στην τροποποιημένη αποικοδόμηση των OxPL.

Οι μειώσεις στις δραστηριότητες των PAF-AH και PON1 της HDL σε LCAT Hom έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις σε ασθενείς με ολική έλλειψη PAF-AH που είχαν φυσιολογικά επίπεδα HDL-c [274]. Σε αυτούς τους ασθενείς η απώλεια της δραστηριότητας της PAF-AH του πλάσματος δεν συνοδεύεται από μια μείωση στις δραστηριότητες των LCAT και PON1 [146], υποδηλώνοντας ότι η διαταραγμένη

ωρίμανση της HDL εξαιτίας της απώλειας της LCAT υποστηρίζει την παρατηρούμενη μειωμένη δραστικότητα της PAF-AH καθώς και της PON1 της HDL.

Βασισμένοι στην αρχική δημοσίευση του Navab et al [202] χρησιμοποιήσαμε μια δοκιμασία που εκτιμάει την ικανότητα της HDL να απενεργοποιήσει την OxLDL. Σε συμφωνία με τις περισσότερες μελέτες [202,275-280] κανονικοποιήσαμε για την HDL-c. Η HDL των φορέων μεταλλάξεων στην LCAT είχαν αισθητά μειωμένη ικανότητα να αναστείλλουν την OxLDL ως προς την οξειδωση του DCFH και την απελευθέρωση του DCF. Η παρατηρούμενη μείωση μπορεί να έχει προκληθεί απ'ευθείας από την έλλειψη της LCAT της HDL. Επίσης, αυτές οι επιδράσεις μπορεί να σχετίζονται με την εξατώμενη από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων απώλεια της PAF-AH της HDL. Παρ'όλα αυτά, στατιστικές προσαρμογές για την PAF-AH, αλλά επίσης και για τις διαφορές της PON1, καθώς και απόρριψη ατόμων που τους χορηγούνται στατίνες, δεν επηρέασαν σημαντικά την σχέση μεταξύ μειωμένης δραστικότητας LCAT και μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL. Έχει δειχθεί από εμάς και άλλους [281] ότι η HDL των φορέων μεταλλάξεων στην LCAT έχουν τροποποιημένους HDL υποπληθυσμούς με τροποποιημένη σύνθεση απολιποπρωτεϊνών συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς. Έτσι, θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι αλλαγές της σύστασης της HDL μπορεί να επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι φορείς για μεταλλάξεις στην LCAT επιδεικνύουν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα OxPL στις λιποπρωτείνες που περιέχουν αποB, αλλά χωρίς άλλες ενδείξεις εμπλουτισμού οξειδωμένων λιπιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα ότι αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν μόνο ελαφρώς ανεπτυγμένη αθηροσκλήρωση [270]. Από την άλλη, τα αποτελέσματα προκαλούν έκπληξη επειδή η LCAT θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλεκτική μείωση των προϊόντων οξειδωσης των λιπιδίων [145], αλλά επίσης λόγω των παρατηρούμενων σημαντικών μειώσεων της HDL-c και της αποA-I, οι οποίες από μόνες τους έχουν αναφερθεί να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες [282]. Επιπλέον, μια σημαντική και εξαρτώμενη από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων μείωση της PAF-AH της HDL σε φορείς μεταλλάξεων για την LCAT θα περίμενε κανείς να μεταφράζεται σε έναν πιο σοβαρό φαινότυπο. Το ήπιο οξειδωτικό προφίλ των ανθρώπων αυτών θα μπορούσε να σχετίζεται με την ανεπηρέαστη δραστικότητα της PON1 της HDL των LCAT Het. Παρ'όλα αυτά, μια σημαντική μείωση της PON1 των LCAT Hom δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση των οξειδωμένων λιπιδίων των ατόμων αυτών. Από την άλλη, τα άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT παρουσίασαν μια σημαντική μείωση στην

ικανότητα της HDL τους να αναστείλλει την εξογενώς απομονωμένη OxLDL από την απελευθέρωση του φθορίζοντος DCF, αλλά είναι δύσκολο να προβλέψει κανείς τι επίδραση κάτι τέτοιο έχει in vivo. Είναι πιθανόν ότι σε ασθενείς με FLD και FED (ενότητα 1.6), τα OxPL απομακρύνονται γρήγορα από το νεφρό, όπου ελαφρώς λιπιδιωμένες HDL και προ-β HDL καταβολίζονται [283]. Από την άλλη, ο ρυθμός σύνθεσης της apoA-I είναι φυσιολογικός σε ασθενείς με FLD και FED [283] και σε συνδυασμένο με τη μειωμένη δραστηριότητα LCAT και PAF-AH, όπως βρέθηκε στην παρούσα εργασία, δεν είναι πιθανό αυτό να αποτελεί σημαντικό μονοπάτι για τον καταβολισμό των OxPL. Συνολικά, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι εναλλακτικοί μηχανισμοί, όπως απομάκρυνση της OxLDL από τον CD36 και άλλους υποδοχείς εκκαθαριστές [284], μπορεί να είναι σημαντικοί στην προστασία από την οξειδωση των λιπιδίων.

### **5.1.3 Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL από άτομα με στεφανιαία νόσο και της ικανότητας της να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων ABCA1 και ABCG1**

Μελετήθηκαν άτομα με χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσο (SCAD: Stable Coronary Artery Disease), άτομα με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), καθώς και άτομα αναφοράς (δεν έχουν κάποιο από τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου). Η HDL ατόμων με ACS και ατόμων με SCAD ( $HDL_{CAD}$ ) βρέθηκε να έχει μειωμένη δραστηριότητα PON1 και αυξημένα επίπεδα MDA, συγκριτικά με την HDL των ατόμων αναφοράς ( $HDL_{Healthy}$ ). Για αυτόν τον λόγο αναρωτηθήκαμε αν η μείωση της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου στην HDL οδηγεί γενικά σε μεγαλύτερη οξειδωση των λιπιδίων της  $HDL_{CAD}$ . Έτσι εξετάσαμε αν η  $HDL_{CAD}$  παρουσίασε αλλαγές στην ικανότητα της να απενεργοποιήσει την OxLDL μέσω της δοκιμασίας του DCF. Η  $HDL_{CAD}$  παράγαγε παρουσία και απουσία LDL φθορισμό μικρότερο από την OxLDL, αλλά ήταν μεγαλύτερος από τον φθορισμό της  $HDL_{Healthy}$ , κάτι το οποίο σημαίνει ότι η  $HDL_{CAD}$  είναι πιο οξειδωμένη από την  $HDL_{Healthy}$ , αλλά παρόλα αυτά απενεργοποιεί σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό την OxLDL. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο φθορισμός της HDL ατόμων με SCAD δεν ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος συγκριτικά με τον φθορισμό της  $HDL_{Healthy}$ , εν αντιθέση της HDL ατόμων με ACS. Το δεδομένο αυτό έρχεται σε συμφωνία με μια άλλη δημοσιευμένη εργασία που αναφέρει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL είναι μειωμένη σε άτομα με ACS, αλλά όχι με SCAD [285], ίσως γιατί στα άτομα με SCAD χορηγείται φαρμακευτική αγωγή προκειμένου να αποφευχθεί η πρόοδος της ασθένειας και η επανεμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων [286] και ίσως

ο αριθμός των υπό εξέταση ασθενών δεν ήταν πολύ μεγάλος. Το γεγονός ότι παρά την μειωμένη δραστηριότητα της PON1, η HDL ατόμων με ΣΝ μπορεί να απενεργοποιήσει την OxLDL, μπορεί να οφείλεται στην δράση άλλων ενζύμων της HDL με αντιοξειδωτική δράση, όπως η PAF-AH και η LCAT. Ο λόγος για τον οποίο η ικανότητα της HDL ατόμων με ACS και ατόμων με SCAD να απενεργοποιήσει την OxLDL διαφέρει κάπως μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική σύσταση της HDL ή διαφορετική δραστηριότητα ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση.

Στη συνέχεια, για να βρούμε αν η απώλεια της ικανότητας της HDL<sub>CAD</sub> να διεγείρει την παραγωγή του NO συνδέεται με αλλαγές στην ικανότητα της HDL να προάγει εκροή χοληστερόλης, συγκρίναμε την επίδραση των HDL<sub>Healthy</sub> και HDL<sub>CAD</sub> στην εκροή χοληστερόλης. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήσαμε σημαντική διαφορά στην ικανότητα της HDL<sub>Healthy</sub> και της HDL<sub>CAD</sub> να προάγουν εκροή χοληστερόλης. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την άποψη ότι η μειωμένη ικανότητα της HDL να διεγείρει την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO σχετίζεται με την εξαρτώμενη από τον υποδοχέα LOX-1 ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)-β<sub>2</sub> και όχι από την μειωμένη εκροή χοληστερόλης. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται περαιτέρω από την παρατήρηση ότι η ικανότητα της HDL<sub>CAD</sub> να διεγείρει τα μονοπάτια ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής eNOS και ενδοθηλιακής παραγωγής NO μπορεί να ανακτηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, από την παρεμπόδιση του ενδοθηλιακού LOX-1 ή την αναστολή της PKC-β<sub>2</sub>. Είναι πιθανόν ότι η μείωση της ικανότητας της HDL, η οποία προάγει εκροή χοληστερόλης, να συμβαίνει μετά από εκτενή οξειδωτική τροποποίηση της HDL, για παράδειγμα στην αθηροσκληρωτική πλάκα [287,288] – είναι ένας παθοφυσιολογικός μηχανισμός που συμβαίνει κυρίως εντός της αθηροσκληρωτικής πλάκας. Όντως, η HDL που απομονώνεται από αθηροσκληρωτικές πλάκες έχει βρεθεί να έχει μειωμένη ικανότητα να προάγει εκροή χοληστερόλης [287,288].

## **5.2 Μελέτη του ρόλου της αποA-I στην αλληλεπίδραση μεταξύ της HDL και του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 που οδηγεί στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Μελέτη του ρόλου του ABCG1 σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις**

### **5.2.1 Μελέτη του ρόλου της αποA-I αγρίου τύπου (WT) και διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της ως απαραίτητο συστατικό των ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL (rHDL) στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή στερολών**

Η HDL έχει δειχθεί να προάγει εκροή χοληστερόλης από κυτταρικές μεμβράνες με μια διαδικασία επαγόμενη από τον ABCG1 [86,87]. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν

να αναγνωρίσουμε κρίσιμες περιοχές ή αμινοξέα της αποΑ-I, οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα των rHDL να προάγουν εκροή στερολών εξαρτώμενη από τον ABCG1 και έτσι να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους ο ABCG1 προάγει την απομάκρυνση χοληστερόλης ή οξυστερολών από τα κύτταρα. Έχουμε παράξει έναν μεγάλο αριθμό μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I που μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες 1) ελλείψεις στο αμινο- ή καρβοξυ-τελικό άκρο, 2) διπλές ελλείψεις στην αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο, 3) εσωτερικές ελλείψεις στις έλικες H1, H2, H3 και H6 (οι έλικες έχουν προσδιοριστεί στο [11]) και 4) σημειακές μεταλλάξεις στις έλικες H4, H5, H6. Με τόσο εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση κάποιος θα μπορούσε να περιμένει να αναγνωρίσει εάν υπάρχουν κρίσιμες περιοχές ή αμινοξέα της αποΑ-I, οι οποίες να εμπλέκεται στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης. Επιπλέον, αυτές οι μεταλλάξεις της αποΑ-I στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της έχουν μελετηθεί προηγουμένως για την ικανότητα τους να προάγουν εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης [38,43,289]. Έτσι, η χρήση αυτών των μεταλλάξεων στην παρούσα μελέτη μας επιτρέπει να εξετάσουμε εάν οι μεταφορείς χοληστερόλης ABCA1 και ABCG1 μοιράζονται την ίδια ή διαφορετική εξειδίκευση για περιοχές της αποΑ-I που απαιτούνται για την εκροή χοληστερόλης.

Η ανάλυση μας έδειξε ότι σε HEK293 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον ABCG1 ή σε μακροφάγα μυός J774 που επωάστηκαν με AICAR η εκροή χοληστερόλης επηρεάστηκε πολύ παρουσία rHDL που περιέχουν την ελλειμματική στο καρβοξυ-τελικό άκρο αποΑ-I[Δ(185-243)] (rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)]). Έχει αναφερθεί σε παλαιότερες μελέτες ότι υπάρχει μικρή ή καθόλου εξειδίκευση για τους αποδέκτες χοληστερόλης μέσω ABCG1, καθώς οι LDL, HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub>, τα σωματίδια φωσφολιπιδίων/αποΑ-I διαφορετικού μεγέθους και μικρά μονόστοιβα (unilamellar) σωματίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως αποδέκτες χοληστερόλης από κύτταρα μέσω ABCG1 [255,290]. Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι η αποΑ-I στα rHDL σωματίδια εμπλέκεται στην διαδικασία της επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης. Η ανάλυση της σύστασης και του μεγέθους των rHDL υποδεικνύουν ότι η μείωση της επαγόμενης από τον ABCG1 εκροή χοληστερόλης δεν σχετίζεται με διαφορές της σύστασης ή του μεγέθους μεταξύ rHDL-WT αποΑ-I και rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)]. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι δομικές αλλαγές της αποΑ-I των rHDL μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ικανότητας της rHDL να προάγει εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1.

Η επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης δεν επηρεάστηκε από ελλειματικές στο αμινο-τελικό άκρο μορφές της αποΑ-I (αποΑ-I[Δ(1-41)] και αποΑ-I[Δ(1-59)]), ενώ μειώθηκε μέτρια από αρκετές ελλειματικές αποΑ-I σε εσωτερικές έλικες ή αποΑ-I που έφεραν σημειακές μεταλλάξεις. Έκπληξη προκάλεσε το γεγονός ότι η ικανότητα της ελλειματικής αποΑ-I των rHDL να προάγει εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 επανήλθε στο 69-99% συγκριτικά με την WT αποΑ-I, όταν εκτός από το καρβοξυ-τελικό και το αμινο-τελικό άκρο έλειπε. Φυσικοχημική ανάλυση της αποΑ-I[Δ(1-41)Δ(185-243)] που βρισκόταν μέσα σε rHDL έχει δείξει ότι το περιεχόμενο της σε α-έλικες ήταν 78%, ενώ της WT αποΑ-I που βρισκόταν σε rHDL ήταν 67% [38]. Σε άλλη μελέτη, αντίστοιχη ανάλυση σε POPC/αποΑ-I σωματίδια έδειξε ότι το περιεχόμενο α-ελίκων της ελλειματικής στο αμινο-τελικό άκρο αποΑ-I[Δ(1-43)] παρουσίασε μια μικρή μείωση (73% ελικότητα), ενώ το περιεχόμενο σε α-έλικες της ελλειματικής στο καρβοξυ-τελικό άκρο αποΑ-I[Δ(190-243)] παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση (71% ελικότητα), συγκριτικά με την WT αποΑ-I (76% ελικότητα) [291]. Συνεπώς, είναι πιθανόν οι αλλαγές της διαμόρφωσης της αποΑ-I των rHDL να επηρεάζουν την ικανότητα της rHDL να προάγει εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1.

Σε παλαιότερη μελέτη η ομάδα μας είχε βρει ότι η εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1 ήταν εξαιρετικά μειωμένη παρουσία των ελλειματικών στο καρβοξυ-τελικό άκρο αποΑ-I μορφών αποΑ-I[Δ(185-243)] ή αποΑ-I[Δ(220-243)], σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή, ενώ ήταν ελαφρώς μειωμένη παρουσία των ελλειματικών στο αμινο-τελικό της άκρο αποΑ-I μορφών αποΑ-I[Δ(1-41)] ή αποΑ-I[Δ(1-59)] και επανήλθε στο 75-80% της WT αποΑ-I παρουσία ελλειματικών μορφών στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο αποΑ-I[Δ(1-41)Δ(185-243)] ή αποΑ-I[Δ(1-59)Δ(185-243)] [38]. Αρκετές εσωτερικές ελλείψεις και σημειακές μεταλλάξεις της αποΑ-I (αποΑ-I[Δ(61-78)], αποΑ-I[Δ(89-99)], αποΑ-I[Δ(144-165)], αποΑ-I[D102A/D103A], αποΑ-I[E110A/E111A], αποΑ-I[L141R] και αποΑ-I[R160V/H162A]) στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της αποΑ-I δεν επηρέασαν ή μείωσαν μέτρια την εκροή χοληστερόλης μέσω ABCA1 [43,289]. Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι όλες οι μεταλλάξεις της αποΑ-I που μελετήθηκαν ως συστατικά rHDL επηρεάζουν την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης με παρόμοιο τρόπο όπως οι μεταλλάξεις της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I επηρεάζουν την εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης. Το δεδομένο ότι όλες οι ελεύθερες λιπιδίων μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I που προάγουν την εξαρτώμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης προάγουν επίσης με τον ίδιο τρόπο την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης ως συστατικό των rHDL υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες, οι οποίες

προτείνουν ότι η λιπιδίωση της αποΑ-I από τον ABCA1 παράγει έναν αποδέκτη χοληστερόλης για την επαγόμενη από τον ABCG1 εκροή χοληστερόλης [257,268,292].

Βασισμένοι στις παρόμοιες επιδράσεις των μεταλλάξεων της αποΑ-I στην επαγόμενη από ABCA1 και ABCG1 εκροή χοληστερόλης κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι οι μεταφορείς χοληστερόλης ABCA1 και ABCG1 μπορεί να ακολουθούν παρόμοια βήματα στην διαδικασία εκροής χοληστερόλης. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο ABCG1 προάγει την εκροή στερολών σε εξωκυττάριους αποδέκτες δεν έχει ξεκαθαρίσει ακόμα. Αρχικές μελέτες είχαν υποθέσει ότι ο ABCG1 εντοπίζεται και στην κυτταρική μεμβράνη και σε εσωτερικές μεμβρανικές δομές [85,89,293], ενώ πιο πρόσφατες μελέτες υποθέτουν ότι ο ABCG1 εντοπίζεται σε ενδοσώματα και ανακυκλώσιμα ενδοσώματα [105,106]. Έχει προταθεί ότι ο ABCG1 θα μπορούσε να μεταφέρει στερόλες δια μέσου της διπλοστιβάδας των ενδοσωμάτων πριν την τήξη τους με την πλασματική μεμβράνη, επιδρώντας στην ανακατανομή αυτών των στερολών στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας έτσι την εκροή στερολών στην HDL ή άλλους αποδέκτες [85,105]. Σε αντίθεση με τον προτεινόμενο ενδοκυτταρικό εντοπισμό του ABCG1, ο ABCA1 εντοπίζεται στην κύτταρική μεμβράνη [26], όπου αλληλεπιδρά με την αποΑ-I και προάγει εκροή φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης [43]. Εάν η επαγόμενη από ABCA1 εκροή λιπιδίων είναι ένα γεγονός που συμβαίνει καθαρά στην κυτταρική μεμβράνη ή περιλαμβάνει ρετροενδοκυττάρωση και ενδοκυττάρια λιπιδίωση δεν είναι ξεκάθαρο (ανασκόπηση στο [294]). Δεν είναι επίσης ξεκάθαρο αν ο ABCA1 μεταφέρει ταυτόχρονα φωσφολιπίδια και χοληστερόλη ή επάγει μόνο εκροή φωσφολιπιδίων, η οποία ακολουθείται από την εκροή χοληστερόλης με μια ρυθμιζόμενη, αλλά ανεξάρτητη από τον ABCA1 διαδικασία [294]. Η παρόμοια ικανότητα εκροής χοληστερόλης από ελεύθερες λιπιδίων και λιπιδιωμένες μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I θα μπορούσε να ευνοήσει ένα μοντέλο εξαρτώμενης από ABCA1 εκροής λιπιδίων, στο οποίο η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I προσλαμβάνει λιπίδια σε μια διαδικασία επαγόμενη από τον ABCA1, λιπιδιώνεται, αλλάζει η δομική της διαμόρφωση με την παρουσία λιπιδίων και ακολούθως δέχεται περισσότερη χοληστερόλη από μεμβρανικές δεξαμενές που έχουν παραχθεί από τον ABCA1. Παρομοίως, η HDL μπορεί να προσλάβει χοληστερόλη από τις δεξαμενές της κυτταρικής μεμβράνης που έχουν σχηματιστεί από τον ABCG1.

Εκτός από την εκροή χοληστερόλης, ο ABCG1 προάγει εκροή 7-κετο-χοληστερόλης και σχετιζόμενων οξυστερολών [98,295]. Η υπερέκφραση του ABCG1 σε κύτταρα είναι αναμενόμενο να αυξάνει την συγκέντρωση της 7-κετο-χοληστερόλης της εξωτερικής πλευράς της κυτταρικής μεμβράνης όπου γίνεται προσβάσιμη σε εξωγενείς αποδέκτες



[105]. Η 7-κετο-χοληστερόλη περιέχει ένα επιπρόσθετο μόριο οξυγόνου συγκριτικά με την χοληστερόλη, το οποίο αλλάζει την τρισδιάστατη μορφή του μορίου, αυξάνει την πολικότητα του και αλλάζει τον προσανατολισμό του μορίου στην μεμβράνη [296]. Εντοπίσαμε διαφορές στις ιδιότητες της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ κυττάρων που υπερεκφράζουν τον ABCG1 και σημάνθηκαν με χοληστερόλη ή 7-κετο-χοληστερόλη. Άλλες μελέτες που αφορούσαν την επίδραση της χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης στις ιδιότητες της μεμβράνης υποδηλώνουν ότι συγκριτικά με την χοληστερόλη, η 7-κετο-χοληστερόλη μπορεί να διαμορφώσει διαφορετικά τις βιοφυσικές ιδιότητες της μεμβράνης και έτσι να επηρεάσει τις λειτουργίες που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και μεμβράνης [297,298]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η 7-κετο-χοληστερόλη μετακινείται πιο γρήγορα συγκριτικά με την χοληστερόλη μεταξύ φωσφολιπιδικών κυστιδίων και αυτή η συμπεριφορά της μπορεί να αποδοθεί από την ασθενή σύνδεση της με την μεμβρανική διπλοστιβάδα [299]. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η ελλειμματική στο καρβοξυ-τελικό άκρο μορφή της αποΑ-I αποΑ-I[Δ(185-243)], εμφανίζει μεγάλη μείωση της ικανότητας να προάγει επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, αλλά μικρή μείωση στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης. Έτσι, προτείνεται ότι σε αντίθεση με την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης η επαγόμενη από ABCG1 εκροή 7-κετο-χοληστερόλης παρουσιάζει η μικρή ή καθόλου εξειδίκευση στην διαμόρφωση της αποΑ-I της rHDL.

Βασισμένοι στην διαφορετική ικανότητα της αποΑ-I της rHDL που στερείται του καρβοξυ-τελικού της άκρου να προάγει επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης και 7-κετο-χοληστερόλης, κάποιος θα μπορούσε να προτείνει τα ακόλουθα βήματα για την επαγόμενη από ABCG1 εκροή στερολών: πρώτον, ότι ο ABCG1, ασχέτως του κυτταρικού του εντοπισμού, μεταφέρει στερόλες στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και ακολούθως η rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)] αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη με σκοπό να συνδέσει και να απομακρύνει 7-κετο-χοληστερόλη, η οποία συνδέεται χαλαρά με την κυτταρική μεμβράνη συγκριτικά με την χοληστερόλη [300]. Αντιθέτως, η rHDL-αποΑ-I[Δ(185-243)] δεν μπορεί να απομακρύνει εύκολα την πιο σθεναρά συνδεόμενη με την κυτταρική μεμβράνη χοληστερόλη, η οποία απαιτεί ως αποδέκτη rHDL, όπου η αποΑ-I να έχει μια ευνοϊκή δομική διαμόρφωση. Εναλλακτικά, βασισμένοι στην ίδια ικανότητα των μεταλλαγμένων αποΑ-I της rHDL να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης με αυτήν που παρατηρήθηκε στην ελεύθερη λιπιδίων μεταλλαγμένη αποΑ-I και στην επαγόμενη από ABCA1 εκροή χοληστερόλης, κάποιος θα μπορούσε να προτείνει τον εντοπισμό του ABCG1 στην κυτταρική μεμβράνη και αλληλεπίδραση με λιποπρωτεϊνικούς αποδέκτες. Παρ'όλα αυτά,

αυτός ο εντοπισμός πρέπει να είναι παροδικός, τουλάχιστον σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1, καθώς προηγούμενες μελέτες απέτυχαν να εντοπίσουν ειδική σύνδεση με την HDL σε BHK ή HEK293 που υπερέκφραζαν τον ανθρώπινο ABCG1 [86,290]. Σε κάθε περίπτωση, η παρατήρηση ότι η αποΑ-I της rHDL που στερείται του καρβοξυ-τελικού της άκρου έχει μειωμένη ικανότητα να προάγει επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης συγκριτικά με την αποΑ-I πλήρους μήκους της rHDL πρέπει να ληφθεί υπόψη στην προσπάθεια μας να εξηγήσουμε τον μηχανισμό της επαγόμενης από ABCG1 εκροή χοληστερόλης.

Η πρωτεόλυση της αποΑ-I της HDL στο καρβοξυ-τελικό της άκρο έχει δειχθεί να συμβαίνει από την δράση της πλασμίνης ή διάφορων άλλων ανασυνδυασμένων μεταλλοπρωτεασών *in vitro* ή από μεταλλοπρωτεάσες που εκκρίνονται από μακροφάγα [172,173,301]. Η πρωτεόλυση της αποΑ-I από μεταλλοπρωτεάσες παράγει διάφορα θραύσματα, περιλαμβανομένου και θραύσματος μήκους περίπου 22kDa που αντιστοιχούν σε πέψη της αποΑ-I μετά τα κατάλοιπα 191 ή 188 [173,301]. Τέτοια πρωτεόλυση της αποΑ-I της HDL *in vivo* από πρωτεάσες (μέταλλοπρωτεάσες και πλασμίνη) που είναι παρόν στον ανθρώπινο αρτηριακό υπο-ενδοθηλιακό χώρο [302,303] μπορούν να αποφέρουν θραύσματα της αποΑ-I παρόμοια με την αποΑ-I[Δ(185-243)] που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη και έτσι να επηρεάσει την ικανότητά τους, όταν βρίσκονται στην HDL, να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα. Στα μακροφάγα, ο ABCG1 και όχι ο SR-BI ή ο ABCA1 έχει δειχθεί πρόσφατα να είναι κυρίως υπεύθυνος για την μεταφορά ελεύθερης χοληστερόλης στην rHDL [304]. Επιπλέον, η πλασμίνη και οι μεταλλοπρωτεάσες απελευθερώνονται επίσης από φατνιακά (alveolar) μακροφάγα [305,306]. Καθώς, οι πνεύμονες των μυών που στερούνται τον ABCG1 συσσωρεύουν αφρώδη μακροφάγα που περιέχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης [87,95], η πέψη του καρβοξυ-τελικού άκρου της αποΑ-I της HDL από πρωτεάσες φατνιακών μακροφάγων θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την διαδικασία της επαγόμενης από ABCG1 εκροής χοληστερόλης και να οδηγήσει στην συσσώρευση λιπιδίων στους πνεύμονες.

Συνοπτικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, αλλά όχι 7-κετο-χοληστερόλης παρουσιάζει εξειδίκευση για δομικές περιοχές της αποΑ-I της rHDL. Πιο ειδικά, δείξαμε ότι αν και μόνο οι εσωτερικές περιοχές της αποΑ-I της rHDL μπορούν να προάγουν επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης, έλλειψη της καρβοξυ-τελικής περιοχής 185-243 της πλήρους μήκους αποΑ-I μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης. Αυτά τα

αποτελέσματα μπορεί να έχουν φυσιολογική σημασία, καθώς η πρωτεόλυση της αποΑ-I της HDL in vivo μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της HDL να προάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Για την εύρεση του ακριβούς μηχανισμού που σχετίζεται με την επίδραση των δομικών αλλαγών της αποΑ-I της HDL και την επίδραση της πρωτεόλυσης της HDL στην επαγόμενη από ABCG1 εκροή χοληστερόλης απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

### **5.2.2 Σχέση ABCG1 και φλεγμονής - ABCG1 & φλεγμονώδεις – αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες**

Ο ABCG1 έχει προταθεί πως έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς τα μακροφάγα που στερούνται του ABCG1, εκκρίνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών [262,263]. Έτσι αποφασίσαμε να διερευνήσουμε αν η υπερέκφραση του ABCG1 επηρεάζει την έκφραση φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. HEK293 επιμολύνθηκαν με το pcDNA3.1 πλασμίδιο (Mock) ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (ABCG1), επωάστηκαν παρουσία και απουσία 1  $\mu$ M rHDL WT αποΑ-I για 24 ώρες και κατόπιν απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων, συντέθηκε cDNA και μελετήθηκε η ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων στόχων (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-10) με real-time PCR.

Όταν κύτταρα HEK293 επιμολυνθούν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 ή όταν Mock κύτταρα επωάστηκαν με rHDL WT αποΑ-I, τα επίπεδα mRNA των κυτταροκινών με προτεινόμενη φλεγμονώδη δράση TNF $\alpha$  και IL-1 $\beta$  μειώθηκαν, ενώ τα επίπεδα mRNA της κυτταροκίνης με προτεινόμενη αντιφλεγμονώδη δράση IL-10 αυξήθηκαν συγκριτικά με τα Mock κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση του ABCG1 ή η παρουσία rHDL WT αποΑ-I σε Mock κύτταρα έχουν αντιφλεγμονώδη δράση ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Θα περίμενε κανείς να δει πως σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 η προσθήκη rHDL WT αποΑ-I θα είχε ακόμα μεγαλύτερη επίπτωση στην μείωση του TNF $\alpha$  και IL-1 $\beta$  και στην αύξηση IL-10, συγκριτικά με κύτταρα που μόνο υπερεκφράζουν τον ABCG1. Τα αποτελέσματα μας δεν έδειξαν διαφορές στα επίπεδα TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-10 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 παρουσία ή απουσία rHDL WT αποΑ-I. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των κυτταροκινών (μείωση των TNF- $\alpha$  και IL-1B και αύξηση της IL-10), ύστερα από την υπερέκφραση του ABCG1, είναι ανεξάρτητος της μεταφοράς λιπιδίων από το κύτταρο από τον ABCG1, αφού η παρουσία rHDL δεν έχει καμία επιπρόσθετη δράση.

Μια σειρά από μελέτες υποστηρίζουν ότι οι αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των ABCA1 και ABCG1 οφείλονται στην ικανότητα τους να συντονίζουν την μεταφορά της ελεύθερης

χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη και την συγκρότηση λιπιδικών σχεδίων [50,307]. Παρ'όλα αυτά πρόσφατη μελέτη από τους Tang et al. προτείνει ότι όλες οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ABCA1 δεν είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας του στην μεταφορά λιπιδίων [51]. Η φωσφορυλιωμένη STAT3, βρέθηκε να δεσμεύεται με τον ABCA1 με έναν αποΑ-I εξαρτώμενο τρόπο. Μεταλλάξεις στον ABCA1 που επηρεάζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου ABCA1/STAT3, δεν επηρέασε την μέσω ABCA1 εκροή χοληστερόλης, αλλά εμπόδισε την ικανότητα του ABCA1 να καταστείλει την έκκριση κυτταροκινών σε απόκριση του LPS [51]. Για το αν ο ABCG1 δρα στην καταστολή της φλεγμονής με τρόπο που να μην σχετίζεται με την μεταφορά λιπιδίων από το κύτταρο δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής στην βιβλιογραφία. Είναι πιθανόν ο ABCG1 να δρα με τρόπο αντίστοιχο με τον ABCA1. Έτσι αποφασίσαμε να διερευνήσουμε αν η υπερέκφραση του ABCG1 μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF $\alpha$ , όπου παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης, μέσω του STAT3. Χρησιμοποιήσαμε για αυτό το σκοπό αναστολέα για την STAT3 σε κύτταρα HEK293 που υπερεκφράζουν τον ABCG1 και μελετήσαμε αν τα επίπεδα του mRNA του TNF $\alpha$  επηρεάζονται.

Τα HEK293 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 παρουσία του αναστολέα της STAT3 αύξησαν τα επίπεδα του mRNA του TNF- $\alpha$  συγκριτικά με κύτταρα που επωάστηκαν απουσία αναστολέα, υποδηλώνοντας ότι στην καταστολή της έκφρασης του TNF- $\alpha$  από τον ABCG1 συμμετέχει η STAT3. Φαίνεται, λοιπόν ότι τόσο ο ABCA1 όσο και ο ABCG1 μπορούν να καταστείλουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω της ενεργοποίησης της STAT3. Όμως ύστερα από την υπερέκφραση του ABCG1 από ποιόν ενεργοποιείται η STAT3 για να καταστείλει την έκφραση του TNF- $\alpha$ ; Η STAT3 φωσφορυλιώνεται και επομένως ενεργοποιείται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της Κινάσης Ιανός 2 (JAK2: JAnus Kinase 2) [224] ή όπως αυτό που ενεργοποιείται μέσω της κινάσης της 3 φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase), PI<sub>3</sub>K-AKT-mTOR [225]. Για αυτόν το λόγο αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τον αναστολέα της JAK2 ή της PI3K σε HEK293 κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ABCG1 και να μελετήσουμε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης STAT3 (pSTAT3) με ανοσοαποτύπωση κατά western.

Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η υπερέκφραση του ABCG1 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της pSTAT3. Επίσης, η αναστολή της PI3K δεν επηρέασε τα επίπεδα της pSTAT3, σε αντίθεση με την αναστολή της JAK2. Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν

ότι ο ABCG1 καταστέλλει την έκφραση του TNFα μέσω του μονοπατιού που συμμετέχει ο STAT3, η οποία ενεργοποιείται από την JAK2 και όχι από την PI3K. Έτσι βλέπουμε ότι ο ABCG1, όπως και ο ABCA1 καταστέλουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, με τρόπο που να μην σχετίζεται με την μεταφορά λιπιδίων από το κύτταρο, ύστερα από ενεργοποίηση του ίδιου σηματοδοτικού μονοπατιού. Είναι πιθανόν πως αυτοί οι δυο μεταφορείς, εκτός από την συνεργασία τους, όπως προτείνετε από παλαιότερες μελέτες [257,268,292], στην διαδικασία της εκροής χοληστερόλης να συνεργάζονται και να αλληλοσυμπληρώνονται στην καταστολή της φλεγμονής.

Τέλος, επειδή θα θέλαμε να εξετάσουμε και σε ένα άλλο πιο φυσιολογικά σχετικό κυτταρικό τύπο τον ρόλο του ABCG1 στην ρύθμιση των επιπέδων φλεγμονωδών κυτταροκινών, μελετήσαμε σε προκαταρκτικά πειράματα τα επίπεδα του mRNA του TNFα σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ύστερα από τη διαδικασία παρεμπόδισης του mRNA του ABCG1 (ABCG1 RNAi). Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα αποτελέσματα στα HEK293 υποδεικνύοντας για άλλη μια φορά την αντιφλεγμονώδη δράση του ABCG1. Στόχος μας αποτελεί η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα HEK293 κύτταρα ή η εύρεση ενός άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού, εμβαθύνοντας έτσι τις γνώσεις για τον τρόπο με τον οποίο ο μεταφορέας ABCG1 ασκεί τις αντιφλεγμονώδεις του δράσεις, καταστέλοντας ή ενεργοποιώντας φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αντίστοιχα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

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

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
AcLDL	Ακετυλιωμένη LDL
Acute Coronary Syndrome	Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο
ATP-Binding Cassette Transporter A1	Μεταφορέας με Κασέτα Δέσμευσης ATP A1
ATP-Binding Cassette Transporter G1	Μεταφορέας με Κασέτα Δέσμευσης ATP G1
Acyl-Coenzyme A:cholesterol acyl Transferase	Ακυλο-ΣυνένζυμοA:χοληστερόλης ακυλο-Τρανσφεράσης
Bilayer	Διπλοστοιβάδα
Chylomicrons	Χυλομικρά
Cholesterol Esters	Εστέρες Χοληστερόλης
Cholesteryl Ester Transfer Protein	Πρωτεΐνη Μεταφοράς Εστέρων Χοληστερόλης
Compound Heterozygote	Διπλά Ετεροζυγώτης
Control	Αναφοράς
DCF	2,7 Διχλωροφθοροσκεΐνη
DCFH	2,7- Διχλωροφθοροσκίνη
H <sub>2</sub> DCFDA	2,7-Διχλωρο-διϋδρο-φθοροσκεΐνο-διοξικός εστέρας
Fish-Eye Disease	Νόσος «Το μάτι του ψαριού»
Familial LCAT Deficiency	Οικογενή Έλλειψη της LCAT
GlycerAldehyde-3-Phosphate dehydrogenase	Αφυδρογονάσης της 3-Φωσφορικής Γλυκεραλδεΐδης
Heterozygote	Ετεροζυγώτης
High-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
Homozygote	Ομοζυγώτης
Intermediate-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Ενδιάμεσης Πυκνότητας

IntraVascular UltraSound	Ενδοαγγειακοί Υπέρηχοι
Janus Kinase 2	Κινάση Ιανός 2
Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase	Ακυλο-Τρανσφεράση Λεκιθίνης: Χοληστερόλης
Lipopolysaccharides	Λιποπολυσακχαρίτες
Lipoprotein (a)	Λιποπρωτεΐνη a
Low-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
Malondialdehyde	Μηλονική-διαλδεΐδη
Model Spheroidal HDL Particles	Μοντέλα Σφαιροειδών HDL Σωματιδίων
Myeloperoxidase	Μυελοϋπεροξειδάση
Nitric Oxide	Μονοξειδίου του Αζώτου
Nucleotide Binding Domain	Περιοχή Πρόσδεσης Νουκλεοτιδίου
OxLDL	Οξειδωμένη LDL
Platelet Activating Factor	Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase	Ακετυλοϋδρολάση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
PON1	Παραοξονάση 1
Phosphoinositide 3-kinase	Κινάση της 3 Φωσφορικής Ινοσιτόλης
PhosphoLipid Transfer Protein	Πρωτεΐνη Μεταφοράς Φωσφολιπιδίων
Protein Kinase A / Protein Kinase C-β <sub>2</sub>	Πρωτεϊνική Κινάση A / Πρωτεϊνική Κινάση C-β <sub>2</sub>
Reactive Oxygen Species	Δραστικές Οξυγονούχες Ενώσεις
Real Time Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο
Reconstituted HDL	Ανασυγκροτημένα Σωματίδια HDL
Reverse Cholesterol Transport	Ανάστροφη Μεταφορά Χοληστερόλης
Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής
sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Ένζυμο-Σύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμασία τύπου «sandwich»
Scavenger Receptor class B type I	Υποδοχέας Εκκαθαριστής τάξη B τύπος I
Serum Amyloid A	Αμυλοειδές A του Ορού

Smooth Muscle Cells	Λεία Μυϊκά Κύτταρα
Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Μεταγωγέα Σήματος και Ενεργοποιητή της Μεταγραφής 3
Stable Coronary Artery Disease	Χρόνια (Σταθερή) Στεφανιαία Νόσο
Toll Like Receptor 4	Υποδοχέας που Ομοιάζει με τον Toll 4
TriGlycerides	Τριγλυκερίδια
Tumor Necrosis Factor $\alpha$	Νεκρωτικός Παράγοντας του Όγκου $\alpha$
Very Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας
Walker A, B, C	Περιπατητής A, B, C
Wild Type	Αγρίου Τύπου



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 6.2. Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

αποΑ-I	απολιποπρωτεΐνη Α-I
ΣΝ	Στεφανιαία Νόσος
ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
ABCG1	ATP-Binding cassette Transporter G1
ACS	Acute Coronary Syndrome
ACAT	Acyl-Coenzyme A (acyl-coA):cholesterol acylTransferase
AICAR	5-Aminolimidazole-4-CarboxyAmide Ribonucleoside
CE	Cholesterol Esters
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
Comp	Compound Heterozygote
cpt-cAMP	(8- (4- chlorophenylthio) Adenosine 3' : 5'-cyclic MonoPhosphate sodium salt)
FED	Fish-Eye Disease
FLD	Familial LCAT Deficiency
GAPDH	GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
HDL	High-Density Lipoprotein
Het	Heterozygote
Hom	Homozygote
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
IL	InterLeucine
INSIG	INSulin-Induced gene 2
IPTG	IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
IVUS	IntraVascular UltraSound
JAK2	Janus Kinase 2
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase

LDL	Low-Density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPS	LipoPolySaccharides
MDA	MalonDiAldehyde
MPO	MyeloPerOxidase
NBD	Nucleotide Binding Domain
NO	Nitric Oxide
PAF-AH	Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PKA / PKC- $\beta_2$	Protein Kinase A / Protein Kinase C- $\beta_2$
PLTP	PhosphoLipid Transfer Protein
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidyl-Cholines
RCT	Reverse Cholesterol Transport
Real Time PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
rHDL	reconstituted HDL
rTEV	reconstituted Tobacco Etched Viral
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA	Serum Amyloid A
sandwich ELISA	sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
SCAD	Stable Coronary Artery Disease
SCAP	Sterol Cleavage-Activating Protein
SMCs	Smooth Muscle Cells
SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
STAT <sub>3</sub>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TLR-4	Toll Like Receptor 4

TG	TriGlycerides
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wild Type

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Zannis,V.I., Kardassis,D., and Zanni,E.E. 1993. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv.Hum.Genet.* 21:145-319.
2. Havel,J.H. and Kane,J.P. 2001. Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R.Scriver, Beaudet,A.L., Sly,W.S., and Valle,D., editors. McGraw-Hill, New York. 2705-2716.
3. Zannis,V.I., Kypreos,K.E., Chroni,A., Kardassis,D., and Zanni,E.E. 2004. Lipoproteins and atherogenesis. In *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*. J.Loscalzo, editor. Taylor & Francis, Abington, UK. 111-174.
4. Mahley,R.W., Innerarity,T.L., Rall,S.C., Jr., and Weisgraber,K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J.Lipid Res.* 25:1277-1294.
5. Zannis,V.I., Chroni,A., and Krieger,M. 2006. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J.Mol.Med.* 84:276-294.
6. Tall,A.R., Breslow,J.L., and Rubin,E.M. 2001. Genetic disorders affecting plasma high-density lipoproteins. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R.Scriver, Beaudet,A.L., Valle,D., and Sly,W.S., editors. McGraw-Hill, New York. 2915-2936.
7. Kane,J.P. and Havel,R.J. 2001. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R.Scriver, Beaudet,A.L., Valle,D., and Sly,W.S., editors. McGraw-Hill, New York. 2717-2752.
8. Karathanasis,S.K., Zannis,V.I., and Breslow,J.L. 1983. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:6147-6151.
9. Zannis,V.I., Karathanasis,S.K., Keutmann,H.T., Goldberger,G., and Breslow,J.L. 1983. 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* 80:2574-2578.

10. Borhani,D.W., Rogers,D.P., Engler,J.A., and Brouillette,C.G. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:12291-12296.
11. Mei,X. and Atkinson,D. 2011. Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J.Biol.Chem.* 286:38570-38582.
12. Borhani,D.W., Engler,J.A., and Brouillette,C.G. 1999. Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 55 ( Pt 9):1578-1583.
13. Banka,C.L., Bonnet,D.J., Black,A.S., Smith,R.S., and Curtiss,L.K. 1991. Localization of an apolipoprotein A-I epitope critical for activation of lecithin-cholesterol acyltransferase. *J.Biol.Chem.* 266:23886-23892.
14. Andreola,A., Bellotti,V., Giorgetti,S., Mangione,P., Obici,L., Stoppini,M., Torres,J., Monzani,E., Merlini,G., and Sunde,M. 2003. Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein a-I. *J.Biol.Chem.* 278:2444-2451.
15. Segrest,J.P., Jones,M.K., Klom,A.E., Sheldahl,C.J., Hellinger,M., De Loof,H., and Harvey,S.C. 1999. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 274:31755-31758.
16. Gursky,O. 2013. 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.* 425:1-16.
17. Martin,D.D., Budamagunta,M.S., Ryan,R.O., Voss,J.C., and Oda,M.N. 2006. Apolipoprotein A-I assumes a looped belt conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.*
18. Silva,R.A., Huang,R., Morris,J., Fang,J., Gracheva,E.O., Ren,G., Kontush,A., Jerome,W.G., Rye,K.A., and Davidson,W.S. 2008. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:12176-12181.
19. Huang,R., Silva,R.A., Jerome,W.G., Kontush,A., Chapman,M.J., Curtiss,L.K., Hodges,T.J., and Davidson,W.S. 2011. Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 18:416-422.
20. Catta,A., Patterson,J.C., Bashtovyy,D., Jones,M.K., Gu,F., Li,L., Rampioni,A., Sengupta,D., Vuorela,T., Niemela,P. *et al.* 2008. Structure of spheroidal HDL particles revealed by combined atomistic and coarse-grained simulations. *Biophys.J.* 94:2306-2319.
21. Fitzgerald,M.L., Mendez,A.J., Moore,K.J., Andersson,L.P., Panjeton,H.A., and Freeman,M.W. 2001. 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.* 276:15137-15145.

22. Dean,M., Hamon,Y., and Chimini,G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J.Lipid Res.* 42:1007-1017.
23. Bungert,S., Molday,L.L., and Molday,R.S. 2001. 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.* 276:23539-23546.
24. Oram,J.F. and Heinecke,J.W. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 85:1343-1372.
25. Kim,W.S., Weickert,C.S., and Garner,B. 2008. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J.Neurochem.* 104:1145-1166.
26. Neufeld,E.B., Remaley,A.T., Demosky,S.J., Stonik,J.A., Cooney,A.M., Comly,M., Dwyer,N.K., Zhang,M., Blanchette-Mackie,J., Santamarina-Fojo,S. *et al.* 2001. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J.Biol.Chem.* 276:27584-27590.
27. Chen,W., Wang,N., and Tall,A.R. 2005. A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *J.Biol.Chem.* 280:29277-29281.
28. Neufeld,E.B., Stonik,J.A., Demosky,S.J., Jr., Knapper,C.L., Combs,C.A., Cooney,A., Comly,M., Dwyer,N., Blanchette-Mackie,J., Remaley,A.T. *et al.* 2004. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J.Biol.Chem.* 279:15571-15578.
29. Mendez,A.J., Anantharamaiah,G.M., Segrest,J.P., and Oram,J.F. 1994. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. *J.Clin.Invest* 94:1698-1705.
30. Yamauchi,Y., Chang,C.C., Hayashi,M., Abe-Dohmae,S., Reid,P.C., Chang,T.Y., and Yokoyama,S. 2004. Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *J.Lipid Res.* 45:1943-1951.
31. Oram,J.F. and Heinecke,J.W. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 85:1343-1372.
32. Gillotte,K.L., Zaiou,M., Lund-Katz,S., Anantharamaiah,G.M., Holvoet,P., Dhoest,A., Palgunachari,M.N., Segrest,J.P., Weisgraber,K.H., Rothblat,G.H. *et al.* 1999. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J.Biol.Chem.* 274:2021-2028.
33. Vaughan,A.M. and Oram,J.F. 2003. ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J.Lipid Res.* 44:1373-1380.

34. Santamarina-Fojo,S., Remaley,A.T., Neufeld,E.B., and Brewer,H.B., Jr. 2001. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J.Lipid Res.* 42:1339-1345.
35. Takahashi,Y. and Smith,J.D. 1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:11358-11363.
36. 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. *et al.* 2001. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 280:818-823.
37. Fitzgerald,M.L., Morris,A.L., Chroni,A., Mendez,A.J., Zannis,V.I., and Freeman,M.W. 2004. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J.Lipid Res.* 45:287-294.
38. Chroni,A., Liu,T., Gorshkova,I., Kan,H.Y., Uehara,Y., von Eckardstein,A., and Zannis,V.I. 2003. 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.* 278:6719-6730.
39. Tang,C., Vaughan,A.M., Anantharamaiah,G.M., and Oram,J.F. 2006. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1. *J.Lipid Res.* 47:107-114.
40. Yancey,P.G., Bielicki,J.K., Johnson,W.J., Lund-Katz,S., Palgunachari,M.N., Anantharamaiah,G.M., Segrest,J.P., Phillips,M.C., and Rothblat,G.H. 1995. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry* 34:7955-7965.
41. 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. *et al.* 2003. Synthetic amphipathic helical peptide mediated efflux of lipid from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. *J.Lipid Res.* 44:828-836.
42. Arakawa,R., Hayashi,M., Remaley,A.T., Brewer,B.H., Yamauchi,Y., and Yokoyama,S. 2004. Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. *J.Biol.Chem.* 279:6217-6220.
43. Chroni,A., Liu,T., Fitzgerald,M.L., Freeman,M.W., and Zannis,V.I. 2004. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry* 43:2126-2139.
44. Chambenoit,O., Hamon,Y., Marguet,D., Rigneault,H., Rosseneu,M., and Chimini,G. 2001. Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J.Biol.Chem.* 276:9955-9960.
45. Rigot,V., Hamon,Y., Chambenoit,O., Alibert,M., Duverger,N., and Chimini,G. 2002. Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. *J.Lipid Res.* 43:2077-2086.

46. Vedhachalam,C., Duong,P.T., Nickel,M., Nguyen,D., Dhanasekaran,P., Saito,H., Rothblat,G.H., Lund-Katz,S., and Phillips,M.C. 2007. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J.Biol.Chem.* 282:25123-25130.
47. Vedhachalam,C., Ghering,A.B., Davidson,W.S., Lund-Katz,S., Rothblat,G.H., and Phillips,M.C. 2007. ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27:1603-1609.
48. Francone,O.L., Royer,L., Boucher,G., Haghpassand,M., Freeman,A., Brees,D., and Aiello,R.J. 2005. Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1198-1205.
49. Koseki,M., Hirano,K., Masuda,D., Ikegami,C., Tanaka,M., Ota,A., Sandoval,J.C., Nakagawa-Toyama,Y., Sato,S.B., Kobayashi,T. *et al.* 2007. Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in Abca1-deficient macrophages. *J.Lipid Res.* 48:299-306.
50. Zhu,X., Lee,J.Y., Timmins,J.M., Brown,J.M., Boudyguina,E., Mulya,A., Gebre,A.K., Willingham,M.C., Hiltbold,E.M., Mishra,N. *et al.* 2008. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific Abca1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J.Biol.Chem.* 283:22930-22941.
51. Tang,C., Liu,Y., Kessler,P.S., Vaughan,A.M., and Oram,J.F. 2009. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J.Biol.Chem.* 284:32336-32343.
52. McGillicuddy,F.C., de la Llera,M.M., Hinkle,C.C., Joshi,M.R., Chiquoine,E.H., Billheimer,J.T., Rothblat,G.H., and Reilly,M.P. 2009. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 119:1135-1145.
53. Glomset,J.A. 1962. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim.Biophys.Acta* 65:128-135.
54. Fielding,C.J., Shore,V.G., and Fielding,P.E. 1972. Lecithin: cholesterol acyltransferase: effects of substrate composition upon enzyme activity. *Biochim.Biophys.Acta* 270:513-518.
55. Glomset,J.A., Janssen,E.T., Kennedy,R., and Dobbins,J. 1966. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J.Lipid Res.* 7:638-648.
56. Glomset,J.A. 1968. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J.Lipid Res.* 9:155-167.
57. Remaley,A.T., Amar,M., and Sviridov,D. 2008. HDL-replacement therapy: mechanism of action, types of agents and potential clinical indications. *Expert.Rev.Cardiovasc.Ther.* 6:1203-1215.
58. McLean,J., Fielding,C., Drayna,D., Dieplinger,H., Baer,B., Kohr,W., Henzel,W., and Lawn,R. 1986. Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2335-2339.

59. Murata,Y., Maeda,E., Yoshino,G., and Kasuga,M. 1996. Cloning of rabbit LCAT cDNA: increase in LCAT mRNA abundance in the liver of cholesterol-fed rabbits. *J.Lipid Res.* 37:1616-1622.
60. Warden,C.H., Langner,C.A., Gordon,J.I., Taylor,B.A., McLean,J.W., and Lusi,A.J. 1989. Tissue-specific expression, developmental regulation, and chromosomal mapping of the lecithin: cholesterol acyltransferase gene. Evidence for expression in brain and testes as well as liver. *J.Biol.Chem.* 264:21573-21581.
61. Hixson,J.E., Driscoll,D.M., Birnbaum,S., and Britten,M.L. 1993. Baboon lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT): cDNA sequences of two alleles, evolution, and gene expression. *Gene* 128:295-299.
62. Smith,K.M., Lawn,R.M., and Wilcox,J.N. 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J.Lipid Res.* 31:995-1004.
63. Peelman,F., Goethals,M., Vanloo,B., Labeur,C., Brasseur,R., Vandekerckhove,J., and Rosseneu,M. 1997. Structural and functional properties of the 154-171 wild-type and variant peptides of human lecithin-cholesterol acyltransferase. *Eur.J.Biochem.* 249:708-715.
64. Cho,K.H. and Jonas,A. 2000. A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *J.Biol.Chem.* 275:26821-26827.
65. Rousset,X., Vaisman,B., Amar,M., Sethi,A.A., and Remaley,A.T. 2009. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 16:163-171.
66. Yang,C.Y., Manoogian,D., Pao,Q., Lee,F.S., Knapp,R.D., Gotto,A.M., Jr., and Pownall,H.J. 1987. Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 262:3086-3091.
67. Adimoolam,S., Jin,L., Grabbe,E., Shieh,J.J., and Jonas,A. 1998. Structural and functional properties of two mutants of lecithin-cholesterol acyltransferase (T123I and N228K). *J.Biol.Chem.* 273:32561-32567.
68. Peelman,F., Vinaimont,N., Verhee,A., Vanloo,B., Verschelde,J.L., Labeur,C., Seguret-Mace,S., Duverger,N., Hutchinson,G., Vandekerckhove,J. *et al.* 1998. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci.* 7:587-599.
69. Jin,L., Shieh,J.J., Grabbe,E., Adimoolam,S., Durbin,D., and Jonas,A. 1999. Surface plasmon resonance biosensor studies of human wild-type and mutant lecithin cholesterol acyltransferase interactions with lipoproteins. *Biochemistry* 38:15659-15665.
70. Brasseur,R., Pillot,T., Lins,L., Vandekerckhove,J., and Rosseneu,M. 1997. Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. *Trends Biochem.Sci.* 22:167-171.



71. Francone,O.L. and Fielding,C.J. 1991. Effects of site-directed mutagenesis at residues cysteine-31 and cysteine-184 on lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:1716-1720.
72. Miller,K.R., Wang,J., Sorci-Thomas,M., Anderson,R.A., and Parks,J.S. 1996. Glycosylation structure and enzyme activity of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma, HepG2 cells, and baculoviral and Chinese hamster ovary cell expression systems. *J.Lipid Res.* 37:551-561.
73. Ayyobi,A.F., Lacko,A.G., Murray,K., Nair,M., Li,M., Molhuizen,H.O., and Pritchard,P.H. 2000. Biochemical and compositional analyses of recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) obtained from a hepatic source. *Biochim.Biophys.Acta* 1484:1-13.
74. Francone,O.L., Evangelista,L., and Fielding,C.J. 1993. Lecithin-cholesterol acyltransferase: effects of mutagenesis at N-linked oligosaccharide attachment sites on acyl acceptor specificity. *Biochim.Biophys.Acta* 1166:301-304.
75. Kosman,J. and Jonas,A. 2001. Deletion of specific glycan chains affects differentially the stability, local structures, and activity of lecithin-cholesterol acyltransferase. *J.Biol.Chem.* 276:37230-37236.
76. Schindler,P.A., Settineri,C.A., Collet,X., Fielding,C.J., and Burlingame,A.L. 1995. Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci.* 4:791-803.
77. Francone,O.L., Evangelista,L., and Fielding,C.J. 1996. Effects of carboxy-terminal truncation on human lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J.Lipid Res.* 37:1609-1615.
78. Czarnecka,H. and Yokoyama,S. 1996. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J.Biol.Chem.* 271:2023-2028.
79. Sorci-Thomas,M.G. and Thomas,M.J. 2002. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc.Med.* 12:121-128.
80. Strang,A.C., Hovingh,G.K., Stroes,E.S., and Kastelein,J.J. 2009. The genetics of high-density lipoprotein metabolism: clinical relevance for therapeutic approaches. *Am.J.Cardiol.* 104:22E-31E.
81. von Eckardstein,A. 2006. Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis* 186:231-239.
82. Kuivenhoven,J.A., Pritchard,H., Hill,J., Frohlich,J., Assmann,G., and Kastelein,J. 1997. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J.Lipid Res.* 38:191-205.
83. Tarling,E.J. 2013. Expanding roles of ABCG1 and sterol transport. *Curr.Opin.Lipidol.* 24:138-146.

84. Nakamura,K., Kennedy,M.A., Baldan,A., Bojanic,D.D., Lyons,K., and Edwards,P.A. 2004. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 279:45980-45989.
85. Vaughan,A.M. and Oram,J.F. 2005. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by HDL but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J.Biol.Chem.* 280:30150-30157.
86. Wang,N., Lan,D., Chen,W., Matsuura,F., and Tall,A.R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:9774-9779.
87. Kennedy,M.A., Barrera,G.C., Nakamura,K., Baldan,A., Tarr,P., Fishbein,M.C., Frank,J., Francone,O.L., and Edwards,P.A. 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 1:121-131.
88. Oram,J.F. and Vaughan,A.M. 2006. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ.Res.* 99:1031-1043.
89. Wang,N., Ranalletta,M., Matsuura,F., Peng,F., and Tall,A.R. 2006. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1310-1316.
90. Kobayashi,A., Takanezawa,Y., Hirata,T., Shimizu,Y., Misasa,K., Kioka,N., Arai,H., Ueda,K., and Matsuo,M. 2006. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J.Lipid Res.* 47:1791-1802.
91. Wang,X., Collins,H.L., Ranalletta,M., Fuki,I.V., Billheimer,J.T., Rothblat,G.H., Tall,A.R., and Rader,D.J. 2007. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J.Clin.Invest* 117:2216-2224.
92. Out,R., Hoekstra,M., Meurs,I., De Vos,P., Kuiper,J., Van Eck,M., and van Berkel,T.J. 2007. Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27:594-599.
93. Burgess,B., Naus,K., Chan,J., Hirsch-Reinshagen,V., Tansley,G., Matzke,L., Chan,B., Wilkinson,A., Fan,J., Donkin,J. *et al.* 2008. Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 28:1731-1737.
94. Baldan,A., Pei,L., Lee,R., Tarr,P., Tangirala,R.K., Weinstein,M.M., Frank,J., Li,A.C., Tontonoz,P., and Edwards,P.A. 2006. Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice transplanted with Abcg1<sup>-/-</sup> bone marrow. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:2301-2307.
95. Out,R., Hoekstra,M., Hildebrand,R.B., Kruit,J.K., Meurs,I., Li,Z., Kuipers,F., van Berkel,T.J., and Van Eck,M. 2006. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:2295-2300.

96. Ranalletta,M., Wang,N., Han,S., Yvan-Charvet,L., Welch,C., and Tall,A.R. 2006. Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*<sup>-/-</sup> bone marrow. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:2308-2315.
97. Wojcik,A.J., Skafien,M.D., Srinivasan,S., and Hedrick,C.C. 2008. A critical role for ABCG1 in macrophage inflammation and lung homeostasis. *J.Immunol.* 180:4273-4282.
98. Terasaka,N., Wang,N., Yvan-Charvet,L., and Tall,A.R. 2007. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:15093-15098.
99. Li,D., Wang,D., Wang,Y., Ling,W., Feng,X., and Xia,M. 2010. Adenosine monophosphate-activated protein kinase induces cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells and alleviates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 285:33499-33509.
100. Xu,Y., Wang,W., Zhang,L., Qi,L.P., Li,L.Y., Chen,L.F., Fang,Q., Dang,A.M., and Yan,X.W. 2011. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis* 219:648-654.
101. Schou,J., Frikke-Schmidt,R., Kardassis,D., Thymiakou,E., Nordestgaard,B.G., Jensen,G., Grande,P., and Tybjaerg-Hansen,A. 2012. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 32:506-515.
102. Matsuura,F., Wang,N., Chen,W., Jiang,X.C., and Tall,A.R. 2006. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J.Clin.Invest* 116:1435-1442.
103. Yvan-Charvet,L., Matsuura,F., Wang,N., Bamberger,M.J., Nguyen,T., Rinninger,F., Jiang,X.C., Shear,C.L., and Tall,A.R. 2007. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27:1132-1138.
104. Yvan-Charvet,L., Kling,J., Pagler,T., Li,H., Hubbard,B., Fisher,T., Sparrow,C.P., Taggart,A.K., and Tall,A.R. 2010. Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:1430-1438.
105. Tarling,E.J. and Edwards,P.A. 2011. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:19719-19724.
106. Sturek,J.M., Castle,J.D., Trace,A.P., Page,L.C., Castle,A.M., Evans-Molina,C., Parks,J.S., Mirmira,R.G., and Hedrick,C.C. 2010. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J.Clin.Invest* 120:2575-2589.

107. Gao,X., Gu,H., Li,G., Rye,K.A., and Zhang,D.W. 2012. Identification of an amino acid residue in ATP-binding cassette transport G1 critical for mediating cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta* 1821:552-559.
108. Radhakrishnan,A., Ikeda,Y., Kwon,H.J., Brown,M.S., and Goldstein,J.L. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:6511-6518.
109. Tarling,E.J. and Edwards,P.A. 2012. Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. *Biochim.Biophys.Acta* 1821:386-395.
110. Γκίμπα-Τζιαμπήρη Ο. 1999. Η φυσιολογία του ανθρώπου, Τόμος Β. Η λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος ως σύνολο. 7-20. Εκδόσεις Ζυγός.
111. Lusis,A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
112. Weber,C. and Noels,H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat.Med.* 17:1410-1422.
113. Eren,E., Yilmaz,N., and Aydin,O. 2012. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open.Biochem.J.* 6:78-93.
114. Negre-Salvayre,A., Dousset,N., Ferretti,G., Bacchetti,T., Curatola,G., and Salvayre,R. 2006. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic.Biol.Med.* 41:1031-1040.
115. Bowry,V.W., Stanley,K.K., and Stocker,R. 1992. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:10316-10320.
116. Vaisar,T., Pennathur,S., Green,P.S., Gharib,S.A., Hoofnagle,A.N., Cheung,M.C., Byun,J., Vuletic,S., Kassim,S., Singh,P. *et al.* 2007. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J.Clin.Invest* 117:746-756.
117. Vickers,K.C., Palmisano,B.T., Shoucri,B.M., Shamburek,R.D., and Remaley,A.T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat.Cell Biol.* 13:423-433.
118. Selbach,M., Schwanhausser,B., Thierfelder,N., Fang,Z., Khanin,R., and Rajewsky,N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58-63.
119. Baek,D., Villen,J., Shin,C., Camargo,F.D., Gygi,S.P., and Bartel,D.P. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455:64-71.
120. Bartel,D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
121. Chapman,M.J., Goldstein,S., LAGRANGE,D., and LAPLAUD,P.M. 1981. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J.Lipid Res.* 22:339-358.

122. Anderson,D.W., Nichols,A.V., Forte,T.M., and Lindgren,F.T. 1977. Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 493:55-68.
123. Asztalos,B.F., Sloop,C.H., Wong,L., and Roheim,P.S. 1993. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim.Biophys.Acta* 1169:291-300.
124. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J.Lipid Res.* 36:211-228.
125. Nanjee,M.N., Cooke,C.J., Olszewski,W.L., and Miller,N.E. 2000. Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:2148-2155.
126. Asztalos,B.F., Roheim,P.S., Milani,R.L., Lefevre,M., McNamara,J.R., Horvath,K.V., and Schaefer,E.J. 2000. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:2670-2676.
127. Asztalos,B.F., Collins,D., Cupples,L.A., Demissie,S., Horvath,K.V., Bloomfield,H.E., Robins,S.J., and Schaefer,E.J. 2005. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:2185-2191.
128. Asztalos,B.F., Cupples,L.A., Demissie,S., Horvath,K.V., Cox,C.E., Batista,M.C., and Schaefer,E.J. 2004. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:2181-2187.
129. Gordon,D.J., Probstfield,J.L., Garrison,R.J., Neaton,J.D., Castelli,W.P., Knoke,J.D., Jacobs,D.R., Jr., Bangdiwala,S., and Tyroler,H.A. 1989. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79:8-15.
130. Brewer,H.B., Jr. 2004. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:387-391.
131. Ansell,B.J., Fonarow,G.C., and Fogelman,A.M. 2006. High-density lipoprotein: is it always atheroprotective? *Curr.Atheroscler.Rep.* 8:405-411.
132. Barter,P.J., Nicholls,S., Rye,K.A., Anantharamaiah,G.M., Navab,M., and Fogelman,A.M. 2004. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ.Res.* 95:764-772.
133. Mineo,C., Deguchi,H., Griffin,J.H., and Shaul,P.W. 2006. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ.Res.* 98:1352-1364.
134. 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. *et al.* 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat.Med.* 7:853-857.

135. Nofer, J.R., van der, G.M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck, L.K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B. *et al.* 2004. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J.Clin.Invest* 113:569-581.
136. Tso, C., Martinic, G., Fan, W.H., Rogers, C., Rye, K.A., and Barter, P.J. 2006. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1144-1149.
137. Noor, R., Shuaib, U., Wang, C.X., Todd, K., Ghani, U., Schwindt, B., and Shuaib, A. 2007. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis* 192:92-99.
138. Brewer, H.B., Jr. 2004. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:387-391.
139. Fogelman, A.M. 2005. When pouring water on the fire makes it burn brighter. *Cell Metab* 2:6-8.
140. Subbanagounder, G., Leitinger, N., Schwenke, D.C., Wong, J.W., Lee, H., Rizza, C., Watson, A.D., Faull, K.F., Fogelman, A.M., and Berliner, J.A. 2000. Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:2248-2254.
141. Navab, M., Berliner, J.A., Subbanagounder, G., Hama, S., Lusis, A.J., Castellani, L.W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A.D. *et al.* 2001. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:481-488.
142. Leitinger, N. 2003. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 14:421-430.
143. Jonas, A. 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta* 1529:245-256.
144. Glomset, J.A. and Verdery, R.B. 1977. Role of LCAT in cholesterol metabolism. *Expos.Annu.Biochim.Med.* 33:137-142.
145. Goyal, J., Wang, K., Liu, M., and Subbaiah, P.V. 1997. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J.Biol.Chem.* 272:16231-16239.
146. Subramanian, V.S., Goyal, J., Miwa, M., Sugatami, J., Akiyama, M., Liu, M., and Subbaiah, P.V. 1999. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. *Biochim.Biophys.Acta* 1439:95-109.
147. Vohl, M.C., Neville, T.A., Kumarathasan, R., Braschi, S., and Sparks, D.L. 1999. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 38:5976-5981.

148. Klimov,A.N., Nikiforova,A.A., Pleskov,V.M., Kuz'min,A.A., and Kalashnikova,N.N. 1989. [Protective effect of high density lipoproteins, their subfractions and lecithin-cholesterol-acyltransferases on the peroxidation modification of low density lipoproteins]. *Biokhimiia*. 54:118-123.
149. Watson,A.D., Berliner,J.A., Hama,S.Y., La Du,B.N., Faull,K.F., Fogelman,A.M., and Navab,M. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J.Clin.Invest* 96:2882-2891.
150. Navab,M., Hama,S.Y., Anantharamaiah,G.M., Hassan,K., Hough,G.P., Watson,A.D., Reddy,S.T., Sevanian,A., Fonarow,G.C., and Fogelman,A.M. 2000. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J.Lipid Res*. 41:1495-1508.
151. Kontush,A. and Chapman,M.J. 2006. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol.Rev*. 58:342-374.
152. Rosenblat,M., Vaya,J., Shih,D., and Aviram,M. 2005. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 179:69-77.
153. Tward,A., Xia,Y.R., Wang,X.P., Shi,Y.S., Park,C., Castellani,L.W., Lusis,A.J., and Shih,D.M. 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106:484-490.
154. Shih,D.M., Gu,L., Xia,Y.R., Navab,M., Li,W.F., Hama,S., Castellani,L.W., Furlong,C.E., Costa,L.G., Fogelman,A.M. *et al*. 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284-287.
155. Marathe,G.K., Zimmerman,G.A., and McIntyre,T.M. 2003. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J.Biol.Chem*. 278:3937-3947.
156. Connelly,P.W., Draganov,D., and Maguire,G.F. 2005. Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite. *Free Radic.Biol.Med*. 38:164-174.
157. Noto,H., Hara,M., Karasawa,K., Iso,O., Satoh,H., Togo,M., Hashimoto,Y., Yamada,Y., Kosaka,T., Kawamura,M. *et al*. 2003. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 23:829-835.
158. Navab,M., Imes,S.S., Hama,S.Y., Hough,G.P., Ross,L.A., Bork,R.W., Valente,A.J., Berliner,J.A., Drinkwater,D.C., Laks,H. *et al*. 1991. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J.Clin.Invest* 88:2039-2046.

159. Steinberg,D., Parthasarathy,S., Carew,T.E., Khoo,J.C., and Witztum,J.L. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med.* 320:915-924.
160. Nathan,C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest* 79:319-326.
161. Steinberg,D. 2002. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat.Med.* 8:1211-1217.
162. Navab,M., Hama,S.Y., Cooke,C.J., Anantharamaiah,G.M., Chaddha,M., Jin,L., Subbanagounder,G., Faull,K.F., Reddy,S.T., Miller,N.E. *et al.* 2000. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J.Lipid Res.* 41:1481-1494.
163. Miyazaki,A., Rahim,A.T., Ohta,T., Morino,Y., and Horiuchi,S. 1992. High density lipoprotein mediates selective reduction in cholesteryl esters from macrophage foam cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1126:73-80.
164. von Eckardstein,A. and Rohrer,L. 2009. Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins. *Curr.Opin.Lipidol.* 20:197-205.
165. Besler,C., Heinrich,K., Rohrer,L., Doerries,C., Riwanto,M., Shih,D.M., Chroni,A., Yonekawa,K., Stein,S., Schaefer,N. *et al.* 2011. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J.Clin.Invest* 121:2693-2708.
166. Ruggeri,Z.M. 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J.Thromb.Haemost.* 1:1335-1342.
167. Nogami,K., Shima,M., Nishiya,K., Hosokawa,K., Saenko,E.L., Sakurai,Y., Shibata,M., Suzuki,H., Tanaka,I., and Yoshioka,A. 2002. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood* 99:3993-3998.
168. Lipe,B. and Ornstein,D.L. 2011. Deficiencies of natural anticoagulants, protein C, protein S, and antithrombin. *Circulation* 124:e365-e368.
169. Kastelein,J.J., van Leuven,S.I., Burgess,L., Evans,G.W., Kuivenhoven,J.A., Barter,P.J., Revkin,J.H., Grobbee,D.E., Riley,W.A., Shear,C.L. *et al.* 2007. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N.Engl.J.Med.* 356:1620-1630.
170. Van Lenten,B.J., Hama,S.Y., de Beer,F.C., Stafforini,D.M., McIntyre,T.M., Prescott,S.M., La Du,B.N., Fogelman,A.M., and Navab,M. 1995. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J.Clin.Invest* 96:2758-2767.
171. Otocka-Kmiecik,A., Mikhailidis,D.P., Nicholls,S.J., Davidson,M., Rysz,J., and Banach,M. 2012. Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Prog.Lipid Res.* 51:314-324.



172. Kunitake,S.T., Chen,G.C., Kung,S.F., Schilling,J.W., Hardman,D.A., and Kane,J.P. 1990. Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis. *Arteriosclerosis* 10:25-30.
173. Lindstedt,L., Saarinen,J., Kalkkinen,N., Welgus,H., and Kovanen,P.T. 1999. Matrix metalloproteinases-3, -7, and -12, but not -9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux. *J.Biol.Chem.* 274:22627-22634.
174. Lindstedt,L. and Kovanen,P.T. 2000. Plasmin and kallikrein reduce HDL-induced cholesterol efflux from foam cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 277:552-557.
175. Lee,M., von Eckardstein,A., Lindstedt,L., Assmann,G., and Kovanen,P.T. 1999. Depletion of pre beta 1LpA1 and LpA4 particles by mast cell chymase reduces cholesterol efflux from macrophage foam cells induced by plasma. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:1066-1074.
176. Kaartinen,M., Penttila,A., and Kovanen,P.T. 1994. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas. *Arterioscler.Thromb.* 14:966-972.
177. Lindstedt,L., Lee,M., Castro,G.R., Fruchart,J.C., and Kovanen,P.T. 1996. Chymase in exocytosed rat mast cell granules effectively proteolyzes apolipoprotein AI-containing lipoproteins, so reducing the cholesterol efflux-inducing ability of serum and aortic intimal fluid. *J.Clin.Invest* 97:2174-2182.
178. Lamarche,B., Rashid,S., and Lewis,G.F. 1999. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin.Chim.Acta* 286:145-161.
179. Khovidhunkit,W., Kim,M.S., Memon,R.A., Shigenaga,J.K., Moser,A.H., Feingold,K.R., and Grunfeld,C. 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J.Lipid Res.* 45:1169-1196.
180. Greene,D.J., Skeggs,J.W., and Morton,R.E. 2001. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J.Biol.Chem.* 276:4804-4811.
181. Khovidhunkit,W., Memon,R.A., Feingold,K.R., and Grunfeld,C. 2000. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J.Infect.Dis.* 181 Suppl 3:S462-S472.
182. Ryan,R.O. 2010. Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein. *J.Nanobiotechnology.* 8:28.
183. Tardif,J.C., Gregoire,J., L'Allier,P.L., Ibrahim,R., Lesperance,J., Heinonen,T.M., Kouz,S., Berry,C., Bassar,R., Lavoie,M.A. *et al.* 2007. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 297:1675-1682.

184. Plump,A.S., Scott,C.J., and Breslow,J.L. 1994. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:9607-9611.
185. Ameli,S., Hultgardh-Nilsson,A., Cercek,B., Shah,P.K., Forrester,J.S., Ageland,H., and Nilsson,J. 1994. Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 90:1935-1941.
186. Li,D., Weng,S., Yang,B., Zander,D.S., Saldeen,T., Nichols,W.W., Khan,S., and Mehta,J.L. 1999. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:378-383.
187. Nissen,S.E., Tsunoda,T., Tuzcu,E.M., Schoenhagen,P., Cooper,C.J., Yasin,M., Eaton,G.M., Lauer,M.A., Sheldon,W.S., Grines,C.L. *et al.* 2003. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:2292-2300.
188. Navab,M., Anantharamaiah,G.M., Reddy,S.T., Hama,S., Hough,G., Grijalva,V.R., Wagner,A.C., Frank,J.S., Datta,G., Garber,D. *et al.* 2004. Oral D-4F Causes Formation of Pre-beta High-Density Lipoprotein and Improves High-Density Lipoprotein-Mediated Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport From Macrophages in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation*.
189. Navab,M., Ananthramaiah,G.M., Reddy,S.T., Van Lenten,B.J., Ansell,B.J., Fonarow,G.C., Vahabzadeh,K., Hama,S., Hough,G., Kamranpour,N. *et al.* 2004. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J.Lipid Res.* 45:993-1007.
190. Bloedon,L.T., Dunbar,R., Duffy,D., Pinell-Salles,P., Norris,R., DeGroot,B.J., Movva,R., Navab,M., Fogelman,A.M., and Rader,D.J. 2008. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J.Lipid Res.* 49:1344-1352.
191. Navab,M., Anantharamaiah,G.M., Reddy,S.T., Van Lenten,B.J., Wagner,A.C., Hama,S., Hough,G., Bachini,E., Garber,D.W., Mishra,V.K. *et al.* 2005. An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1932-1937.
192. Kutter,D., Devaquet,P., Vanderstocken,G., Paulus,J.M., Marchal,V., and Gothot,A. 2000. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol.* 104:10-15.
193. Le Goff,W., Guerin,M., and Chapman,M.J. 2004. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol.Ther.* 101:17-38.
194. Asztalos,B.F., Horvath,K.V., Kajinami,K., Nartsupha,C., Cox,C.E., Batista,M., Schaefer,E.J., Inazu,A., and Mabuchi,H. 2004. Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J.Lipid Res.* 45:448-455.
195. Kontush,A., de Faria,E.C., Chantepie,S., and Chapman,M.J. 2005. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by

- elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis* 182:277-285.
196. Basisoendial,R.J., Hovingh,G.K., El Harchaoui,K., Levels,J.H., Tsimikas,S., Pu,K., Zwinderman,A.E., Kuivenhoven,J.A., Kastelein,J.J., and Stroes,E.S. 2005. Consequences of cholesteryl ester transfer protein inhibition in patients with familial hypoalphalipoproteinemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:e133-e134.
  197. Barter,P.J., Caulfield,M., Eriksson,M., Grundy,S.M., Kastelein,J.J., Komajda,M., Lopez-Sendon,J., Mosca,L., Tardif,J.C., Waters,D.D. *et al.* 2007. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N.Engl.J.Med.* 357:2109-2122.
  198. Forrest,M.J., Bloomfield,D., Briscoe,R.J., Brown,P.N., Cumiskey,A.M., Ehrhart,J., Hershey,J.C., Keller,W.J., Ma,X., McPherson,H.E. *et al.* 2008. Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br.J.Pharmacol.* 154:1465-1473.
  199. Fayad,Z.A., Mani,V., Woodward,M., Kallend,D., Abt,M., Burgess,T., Fuster,V., Ballantyne,C.M., Stein,E.A., Tardif,J.C. *et al.* 2011. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet* 378:1547-1559.
  200. Cannon,C.P., Shah,S., Dansky,H.M., Davidson,M., Brinton,E.A., Gotto,A.M., Stepanavage,M., Liu,S.X., Gibbons,P., Ashraf,T.B. *et al.* 2010. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 363:2406-2415.
  201. Warnick,G.R., Benderson,J., and Albers,J.J. 1982. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin.Chem.* 28:1379-1388.
  202. Navab,M., Hama,S.Y., Hough,G.P., Subbanagounder,G., Reddy,S.T., and Fogelman,A.M. 2001. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J.Lipid Res.* 42:1308-1317.
  203. Δανιήλ Γ. 2009. Ανάλυση της σύστασης και της λειτουργίας της HDL απο ασθενείς με οικογενή σύνδρομα χαμηλών και υψηλών επιπέδων HDL. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων της απολιποπρωτεΐνης A-I με τον μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης. Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.
  204. Tsimihodimos,V., Karabina,S.A., Tambaki,A.P., Bairaktari,E., Goudevenos,J.A., Chapman,M.J., Elisaf,M., and Tselepis,A.D. 2002. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 22:306-311.
  205. Armstrong,D. and Browne,R. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv.Exp.Med.Biol.* 366:43-58.

206. Yagi,K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol.Biol.* 108:101-106.
207. Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
208. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 1996. Two-dimensional nondenaturing electrophoresis of lipoproteins: applications to high-density lipoprotein speciation. *Methods Enzymol.* 263:251-259.
209. Davidson,W.S., Sparks,D.L., Lund-Katz,S., and Phillips,M.C. 1994. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta- and alpha-migrating high density lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 269:8959-8965.
210. Nichols,A.V., Krauss,R.M., and Musliner,T.A. 1986. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 128:417-431.
211. Asztalos,B.F. and Schaefer,E.J. 2003. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am.J.Cardiol.* 91:12E-17E.
212. Matz,C.E. and Jonas,A. 1982. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J.Biol.Chem.* 257:4535-4540.
213. Laccotripe,M., Makrides,S.C., Jonas,A., and Zannis,V.I. 1997. 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.* 272:17511-17522.
214. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
215. Haidar,B., Denis,M., Krimbou,L., Marcil,M., and Genest,J., Jr. 2002. cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J.Lipid Res.* 43:2087-2094.
216. Bligh,E.G. and Dyer,W.J. 1959. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-918.
217. Kobayashi Y and Mandsley DV. 1974. Applications of liquid scintillation counting. Academic Press, London.
218. Hashimoto,M., Hossain,S., and Masumura,S. 1999. Effect of aging on plasma membrane fluidity of rat aortic endothelial cells. *Exp.Gerontol.* 34:687-698.
219. Galla,H.J. and Luisetti,J. 1980. Lateral and transversal diffusion and phase transitions in erythrocyte membranes. An excimer fluorescence study. *Biochim.Biophys.Acta* 596:108-117.
220. Δάφνης Ι. 2010 Μελέτη της σχέσης δομής και λειτουργίας της απολιποπρωτεΐνης Ε στον εγκέφαλο. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.
221. Lee,M., Sommerhoff,C.P., von Eckardstein,A., Zettl,F., Fritz,H., and Kovanen,P.T. 2002. Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 22:2086-2091.

222. Kubista,M., Andrade,J.M., Bengtsson,M., Forootan,A., Jonak,J., Lind,K., Sindelka,R., Sjoback,R., Sjogreen,B., Strombom,L. *et al.* 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.* 27:95-125.
223. Hankey,P.A. 2009. Regulation of hematopoietic cell development and function by Stat3. *Front Biosci.* 14:5273-5290.
224. Murphy,A.J., Westerterp,M., Yvan-Charvet,L., and Tall,A.R. 2012. Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: effects on myeloid cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1821:513-521.
225. Zhou,J., Wulfkuhle,J., Zhang,H., Gu,P., Yang,Y., Deng,J., Margolick,J.B., Liotta,L.A., Petricoin,E., III, and Zhang,Y. 2007. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:16158-16163.
226. Anderson,J.L., Adams,C.D., Antman,E.M., Bridges,C.R., Califf,R.M., Casey,D.E., Jr., Chavey,W.E., Fesmire,F.M., Hochman,J.S., Levin,T.N. *et al.* 2007. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation* 116:e148-e304.
227. Antman,E.M., Anbe,D.T., Armstrong,P.W., Bates,E.R., Green,L.A., Hand,M., Hochman,J.S., Krumholz,H.M., Kushner,F.G., Lamas,G.A. *et al.* 2004. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 110:e82-292.
228. Holleboom,A.G., Vergeer,M., Hovingh,G.K., Kastelein,J.J., and Kuivenhoven,J.A. 2008. The value of HDL genetics. *Curr.Opin.Lipidol.* 19:385-394.
229. Benveniste,J., Nunez,D., Duriez,P., Korth,R., Bidault,J., and Fruchart,J.C. 1988. Preformed PAF-acether and lyso PAF-acether are bound to blood lipoproteins. *FEBS Lett.* 226:371-376.
230. Hovingh,G.K., Brownlie,A., Bisioendial,R.J., Dube,M.P., Levels,J.H., Petersen,W., Dullaart,R.P., Stroes,E.S., Zwinderman,A.H., de Groot,E. *et al.* 2004. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 44:1429-1435.
231. Kuivenhoven,J.A., Stalenhoef,A.F., Hill,J.S., Demacker,P.N., Errami,A., Kastelein,J.J., and Pritchard,P.H. 1996. Two novel molecular defects in the LCAT

- gene are associated with fish eye disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 16:294-303.
232. Klein,H.G., Lohse,P., Duverger,N., Albers,J.J., Rader,D.J., Zech,L.A., Santamarina-Fojo,S., and Brewer,H.B., Jr. 1993. Two different allelic mutations in the lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene resulting in classic LCAT deficiency: LCAT (tyr83-->stop) and LCAT (tyr156-->asn). *J.Lipid Res.* 34:49-58.
  233. Funke,H., von Eckardstein,A., Pritchard,P.H., Hornby,A.E., Wiebusch,H., Motti,C., Hayden,M.R., Dchet,C., Jacotot,B., Gerdes,U. *et al.* 1993. Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. Six newly identified defective alleles further contribute to the structural heterogeneity in this disease. *J.Clin.Invest* 91:677-683.
  234. Funke,H., von Eckardstein,A., Pritchard,P.H., Albers,J.J., Kastelein,J.J., Droste,C., and Assmann,G. 1991. A molecular defect causing fish eye disease: an amino acid exchange in lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) leads to the selective loss of alpha-LCAT activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:4855-4859.
  235. Kuivenhoven,J.A., Weibusch,H., Pritchard,P.H., Funke,H., Benne,R., Assmann,G., and Kastelein,J.J. 1996. An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *J.Clin.Invest* 98:358-364.
  236. Kuivenhoven,J.A., van Voorst tot Voorst EJ, Wiebusch,H., Marcovina,S.M., Funke,H., Assmann,G., Pritchard,P.H., and Kastelein,J.J. 1995. A unique genetic and biochemical presentation of fish-eye disease. *J.Clin.Invest* 96:2783-2791.
  237. Recalde,D., Cenarro,A., Garcia-Otin,A.L., Gomez-Coronado,D., Civeira,F., and Pocovi,M. 2002. Analysis of apolipoprotein A-I, lecithin:cholesterol acyltransferase and glucocerebrosidase genes in hypoalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 163:49-58.
  238. Calabresi,L., Pisciotta,L., Costantin,A., Frigerio,I., Eberini,I., Alessandrini,P., Arca,M., Bon,G.B., Boscutti,G., Busnach,G. *et al.* 2005. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1972-1978.
  239. Kuivenhoven,J.A., Hovingh,G.K., van Tol,A., Jauhiainen,M., Ehnholm,C., Fruchart,J.C., Brinton,E.A., Otvos,J.D., Smelt,A.H., Brownlee,A. *et al.* 2003. Heterozygosity for ABCA1 gene mutations: effects on enzymes, apolipoproteins and lipoprotein particle size. *Atherosclerosis* 171:311-319.
  240. Clee,S.M., Kastelein,J.J., van Dam,M., Marcil,M., Roomp,K., Zwarts,K.Y., Collins,J.A., Roelants,R., Tamasawa,N., Stulc,T. *et al.* 2000. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J.Clin.Invest* 106:1263-1270.
  241. Candini,C., Schimmel,A.W., Peter,J., Bochem,A.E., Holleboom,A.G., Vergeer,M., Dullaart,R.P., Dallinga-Thie,G.M., Hovingh,G.K., Khoo,K.L. *et al.* 2010. Identification and characterization of novel loss of function mutations in ATP-

- binding cassette transporter A1 in patients with low plasma high-density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis* 213:492-498.
242. Utermann,G. 2001. Lipoprotein(a). In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R.Scriver, Beaudet,A.L., Sly,W.S., and Valle,D., editors. McGraw-Hill, New York. 2753-2787.
  243. Kriska,T., Marathe,G.K., Schmidt,J.C., McIntyre,T.M., and Girotti,A.W. 2007. Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J.Biol.Chem.* 282:100-108.
  244. Negre-Salvayre,A., Dousset,N., Ferretti,G., Bacchetti,T., Curatola,G., and Salvayre,R. 2006. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic.Biol.Med.* 41:1031-1040.
  245. Rohrer,L., Hersberger,M., and von Eckardstein,A. 2004. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 15:269-278.
  246. Montrucchio,G., Alloatti,G., and Camussi,G. 2000. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 80:1669-1699.
  247. Phedonos A. 2009. Role of lipids and lipid metabolism proteins in atherosclerosis and Alzheimer's disease. Analyses of composition and properties of HDL obtained from family subjects carrying ABCA1 mutations. Τμήμα της Βιολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Bath, Ηνωμένο Βασίλειο.
  248. Holleboom,A.G., Daniil,G., Fu,X., Zhang,R., Hovingh,G.K., Schimmel,A.W., Kastelein,J.J., Stroes,E.S., Witztum,J.L., Hutten,B.A. *et al.* 2012. Lipid oxidation in carriers of lecithin:cholesterol acyltransferase gene mutations. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 32:3066-3075.
  249. Terasaka,N., Yu,S., Yvan-Charvet,L., Wang,N., Mzhavia,N., Langlois,R., Pagler,T., Li,R., Welch,C.L., Goldberg,I.J. *et al.* 2008. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J.Clin.Invest* 118:3701-3713.
  250. Assanasen,C., Mineo,C., Seetharam,D., Yuhanna,I.S., Marcel,Y.L., Connelly,M.A., Williams,D.L., Llera-Moya,M., Shaul,P.W., and Silver,D.L. 2005. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J.Clin.Invest* 115:969-977.
  251. Terasaka,N., Westerterp,M., Koetsveld,J., Fernandez-Hernando,C., Yvan-Charvet,L., Wang,N., Sessa,W.C., and Tall,A.R. 2010. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:2219-2225.
  252. Liu,T., Krieger,M., Kan,H.Y., and Zannis,V.I. 2002. The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J.Biol.Chem.* 277:21576-21584.

253. Panagotopoulos,S.E., Witting,S.R., Horace,E.M., Hui,D.Y., Maiorano,J.N., and Davidson,W.S. 2002. The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J.Biol.Chem.* 277:39477-39484.
254. Vedhachalam,C., Liu,L., Nickel,M., Dhanasekaran,P., Anantharamaiah,G.M., Lund-Katz,S., Rothblat,G.H., and Phillips,M.C. 2004. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J.Biol.Chem.* 279:49931-49939.
255. Favari,E., Calabresi,L., Adorni,M.P., Jessup,W., Simonelli,S., Franceschini,G., and Bernini,F. 2009. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry* 48:11067-11074.
256. Favari,E., Lee,M., Calabresi,L., Franceschini,G., Zimetti,F., Bernini,F., and Kovanen,P.T. 2004. Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 279:9930-9936.
257. Gelissen,I.C., Harris,M., Rye,K.A., Quinn,C., Brown,A.J., Kockx,M., Cartland,S., Packianathan,M., Kritharides,L., and Jessup,W. 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:534-540.
258. Wang,M.D., Kiss,R.S., Franklin,V., McBride,H.M., Whitman,S.C., and Marcel,Y.L. 2007. Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J.Lipid Res.* 48:633-645.
259. Galla,H.J. and Luisetti,J. 1980. Lateral and transversal diffusion and phase transitions in erythrocyte membranes. An excimer fluorescence study. *Biochim.Biophys.Acta* 596:108-117.
260. Hashimoto,M., Hossain,S., and Masumura,S. 1999. Effect of aging on plasma membrane fluidity of rat aortic endothelial cells. *Exp.Gerontol.* 34:687-698.
261. Dafnis,I., Tzinia,A.K., Tsilibary,E.C., Zannis,V.I., and Chroni,A. 2012. An apolipoprotein E4 fragment affects matrix metalloproteinase 9, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and cytokine levels in brain cell lines. *Neuroscience* 210:21-32.
262. Yvan-Charvet,L., Welch,C., Pagler,T.A., Ranalletta,M., Lamkanfi,M., Han,S., Ishibashi,M., Li,R., Wang,N., and Tall,A.R. 2008. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* 118:1837-1847.
263. Baldan,A., Gomes,A.V., Ping,P., and Edwards,P.A. 2008. Loss of ABCG1 results in chronic pulmonary inflammation. *J.Immunol.* 180:3560-3568.
264. Pfaffl,M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.



265. Rasmussen,R. 2001. Quantification on the LightCycler. In Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, editor. Heidelberg. 21-34.
266. Ihle,J.N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13:211-217.
267. Fitzgerald,M.L., Mujawar,Z., and Tamehiro,N. 2010. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis* 211:361-370.
268. Lorenzi,I., von Eckardstein,A., Radosavljevic,S., and Rohrer,L. 2008. Lipidation of apolipoprotein A-I by ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 generates an interaction partner for ABCG1 but not for scavenger receptor BI. *Biochim.Biophys.Acta* 1781:306-313.
269. Asztalos,B.F., Brousseau,M.E., McNamara,J.R., Horvath,K.V., Roheim,P.S., and Schaefer,E.J. 2001. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis* 156:217-225.
270. Hovingh,G.K., Hutten,B.A., Holleboom,A.G., Petersen,W., Rol,P., Stalenhoef,A., Zwinderman,A.H., de Groot,E., Kastelein,J.J., and Kuivenhoven,J.A. 2005. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation* 112:879-884.
271. Tselepis,A.D. and John,C.M. 2002. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler.Suppl* 3:57-68.
272. Liu,M. and Subbaiah,P.V. 1994. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:6035-6039.
273. Rodrigo,L., Mackness,B., Durrington,P.N., Hernandez,A., and Mackness,M.I. 2001. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem.J.* 354:1-7.
274. Miwa,M., Miyake,T., Yamanaka,T., Sugatani,J., Suzuki,Y., Sakata,S., Araki,Y., and Matsumoto,M. 1988. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J.Clin.Invest* 82:1983-1991.
275. Sutherland,W.H., de Jong,S.A., and Walker,R.J. 2004. Hypochlorous acid and low serum paraoxonase activity in haemodialysis patients: an in vitro study. *Nephrol.Dial.Transplant.* 19:75-82.
276. McMahon,M., Grossman,J., FitzGerald,J., Dahlin-Lee,E., Wallace,D.J., Thong,B.Y., Badsha,H., Kalunian,K., Charles,C., Navab,M. *et al.* 2006. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54:2541-2549.
277. Tan,K.C., Chow,W.S., Lam,J.C., Lam,B., Wong,W.K., Tam,S., and Ip,M.S. 2006. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 184:377-382.

278. Charles-Schoeman,C., Khanna,D., Furst,D.E., McMahon,M., Reddy,S.T., Fogelman,A.M., Paulus,H.E., Park,G.S., Gong,T., and Ansell,B.J. 2007. Effects of high-dose atorvastatin on antiinflammatory properties of high density lipoprotein in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J.Rheumatol.* 34:1459-1464.
279. Moradi,H., Pahl,M.V., Elahimehr,R., and Vaziri,N.D. 2009. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl.Res.* 153:77-85.
280. Ansell,B.J., Navab,M., Hama,S., Kamranpour,N., Fonarow,G., Hough,G., Rahmani,S., Mottahedeh,R., Dave,R., Reddy,S.T. *et al.* 2003. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 108:2751-2756.
281. Asztalos,B.F., Schaefer,E.J., Horvath,K.V., Yamashita,S., Miller,M., Franceschini,G., and Calabresi,L. 2007. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J.Lipid Res.* 48:592-599.
282. Garner,B., Waldeck,A.R., Witting,P.K., Rye,K.A., and Stocker,R. 1998. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J.Biol.Chem.* 273:6088-6095.
283. Rader,D.J., Ikewaki,K., Duverger,N., Schmidt,H., Pritchard,H., Frohlich,J., Clerc,M., Dumon,M.F., Fairwell,T., Zech,L. *et al.* 1994. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J.Clin.Invest* 93:321-330.
284. Boullier,A., Bird,D.A., Chang,M.K., Dennis,E.A., Friedman,P., Gillotre-Taylor,K., Horkko,S., Palinski,W., Quehenberger,O., Shaw,P. *et al.* 2001. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:214-222.
285. Patel,P.J., Khera,A.V., Jafri,K., Wilensky,R.L., and Rader,D.J. 2011. The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 58:2068-2075.
286. Pflieger,M., Winslow,B.T., Mills,K., and Dauber,I.M. 2011. Medical management of stable coronary artery disease. *Am.Fam.Physician* 83:819-826.
287. Zheng,L., Nukuna,B., Brennan,M.L., Sun,M., Goormastic,M., Settle,M., Schmitt,D., Fu,X., Thomson,L., Fox,P.L. *et al.* 2004. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J.Clin.Invest* 114:529-541.
288. Shao,B., Pennathur,S., Pagani,I., Oda,M.N., Witztum,J.L., Oram,J.F., and Heinecke,J.W. 2010. Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *J.Biol.Chem.* 285:18473-18484.

289. Chroni,A., Kan,H.Y., Kypreos,K.E., Gorshkova,I.N., Shkodrani,A., and Zannis,V.I. 2004. 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* 43:10442-10457.
290. Sankaranarayanan,S., Oram,J.F., Asztalos,B.F., Vaughan,A.M., Lund-Katz,S., Adorni,M.P., Phillips,M.C., and Rothblat,G.H. 2009. Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J.Lipid Res.* 50:275-284.
291. Saito,H., Dhanasekaran,P., Nguyen,D., Deridder,E., Holvoet,P., Lund-Katz,S., and Phillips,M.C. 2004. Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J.Biol.Chem.* 279:20974-20981.
292. Vaughan,A.M. and Oram,J.F. 2006. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J.Lipid Res.* 47:2433-2443.
293. Xie,Q., Engel,T., Schnoor,M., Niehaus,J., Hofnagel,O., Buers,I., Cullen,P., Seedorf,U., Assmann,G., and Lorkowski,S. 2006. Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:e143-e144.
294. Cavelier,C., Lorenzi,I., Rohrer,L., and von Eckardstein,A. 2006. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim.Biophys.Acta* 1761:655-666.
295. Li,D., Zhang,Y., Ma,J., Ling,W., and Xia,M. 2010. Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:1354-1362.
296. Massey,J.B. 2006. Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr.Opin.Lipidol.* 17:296-301.
297. Massey,J.B. and Pownall,H.J. 2005. The polar nature of 7-ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolvubilization by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 44:10423-10433.
298. Bach,D., Epand,R.F., Epand,R.M., and Wachtel,E. 2008. Interaction of 7-ketocholesterol with two major components of the inner leaflet of the plasma membrane: phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Biochemistry* 47:3004-3012.
299. Kan,C.C., Yan,J., and Bittman,R. 1992. Rates of spontaneous exchange of synthetic radiolabeled sterols between lipid vesicles. *Biochemistry* 31:1866-1874.
300. Kan,C.C., Yan,J., and Bittman,R. 1992. Rates of spontaneous exchange of synthetic radiolabeled sterols between lipid vesicles. *Biochemistry* 31:1866-1874.
301. Eberini,I., Calabresi,L., Wait,R., Tedeschi,G., Pirillo,A., Puglisi,L., Sirtori,C.R., and Gianazza,E. 2002. Macrophage metalloproteinases degrade high-density-

lipoprotein-associated apolipoprotein A-I at both the N- and C-termini. *Biochem.J.* 362:627-634.

302. Grainger,D.J., Kemp,P.R., Liu,A.C., Lawn,R.M., and Metcalfe,J.C. 1994. Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 370:460-462.
303. Galis,Z.S., Muszynski,M., Sukhova,G.K., Simon-Morrissey,E., and Libby,P. 1995. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 748:501-507.
304. Cuchel,M., Lund-Katz,S., Llera-Moya,M., Millar,J.S., Chang,D., Fuki,I., Rothblat,G.H., Phillips,M.C., and Rader,D.J. 2010. Pathways by which reconstituted high-density lipoprotein mobilizes free cholesterol from whole body and from macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:526-532.
305. Khalil,N., Corne,S., Whitman,C., and Yacyshyn,H. 1996. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 15:252-259.
306. Russell,R.E., Culpitt,S.V., DeMatos,C., Donnelly,L., Smith,M., Wiggins,J., and Barnes,P.J. 2002. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 26:602-609.
307. Yvan-Charvet,L., Ranalletta,M., Wang,N., Han,S., Terasaka,N., Li,R., Welch,C., and Tall,A.R. 2007. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J.Clin.Invest* 117:3900-3908.